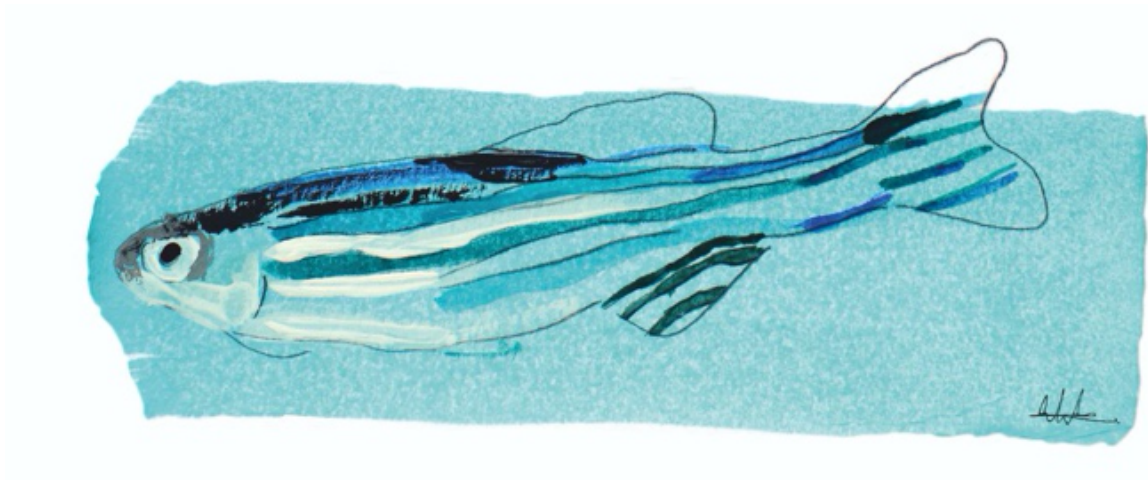


**Αγωνιστική συμπεριφορά, ηθολογικά πρότυπα και ο
ρόλος των γλυκοκορτικοστεροειδών υποδοχέων**



**Διδακτορική διατριβή
Αντωνία Θεοδωρίδη**



**Πανεπιστήμιο Κρήτης
Ιούνιος 2022**

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

Επιβλέπων: Παυλίδης Μιχαήλ, Καθηγητής

Τσιγγενόπουλος Κωνσταντίνος, Διευθυντής Ερευνών

Τζαμαρίας Δημήτρης, Καθηγητής

Επταμελής εξεταστική επιτροπή:

Παυλίδης Μιχαήλ, Καθηγητής (Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας)

Τσιγγενόπουλος Κωνσταντίνος, Διευθυντής Ερευνών (Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών, ΙΘΑΒΒΥΚ)

Τζαμαρίας Δημήτρης, Καθηγητής (Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας)

Δερμών Αικατερίνη, Καθηγήτρια (Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Βιολογίας)

Μπέης Δημήτρης, Ερευνητής Β (Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, Κέντρο Βασικής Έρευνας)

Ξεκούκη Παρασκευή, Επίκουρη Καθηγήτρια (Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Ιατρικής)

Σιδηροπούλου Κυριακή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας)

Αντωνία Θεοδωρίδη

Αγωνιστική συμπεριφορά, ηθολογικά πρότυπα και ο ρόλος των γλυκοκορτικοστεροειδών
υποδοχέων

Διδακτορική διατριβή

Εργαστήριο Φυσιολογίας Ιχθύων, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ελλάδα

Πρόλογος

Η εκπόνηση της συγκεκριμένης διατριβής πραγματοποιήθηκε με χρηματοδότηση του ΕΛΙΔΕΚ και έγινε υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Μιχαήλ Παυλίδη, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση και τη βοήθειά του. Είμαι ευγνώμων για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από τα πρώτα βήματα της ερευνητικής μου πορείας καθώς και την ελευθερία την οποία προσέφερε να εξερευνήσω τους τομείς εκείνους της φυσιολογίας που μου κινούν την περιέργεια. Με ενθάρρυνε να αναπτύξω ανεξαρτησία και σεβασμό στην ερευνητική διαδικασία και τον ευχαριστώ πολύ για όλα. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τον Καθηγητή Δημήτρη Τζαμαρία και τον Διευθυντή Ερευνών Κωνσταντίνο Τσιγγενόπουλο, για τα σχόλιά τους και την τροφή για σκέψη που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της συγκεκριμένης διατριβής.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Αλέκα Τσαλαφούτα για την υπέροχη συνεργασία μας, αλλά και για τη φιλία της. Όλες αυτές οι ώρες που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο είναι μία πολύ ζεστή ανάμνηση. Φυσικά ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας το οποίο δημιούργησαν. Ευχαριστώ ιδιαιτέρως την Δρ. Ελευθερία Φανουράκη και τον Δρ. Θανάση Σαμαρά για τη βοήθεια και συμπαράστασή τους. Δεν θα μπορούσα να ξεχάσω τον Νίκο Μητριζάκη για την υλική και ψυχολογική στήριξη που προσέφερε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου γιατί χωρίς την αγάπη και την εμπιστοσύνη τους, δεν θα είχα την τύχη να περιηγηθώ στον κόσμο της βιολογίας όλα αυτά τα χρόνια. Αν και δεν το λέμε συχνά, η επιμονή και υπομονή μου ήρθαν θαυμάζοντάς σας. Ευχαριστώ πολύ τα αδέρφια μου, Άρτεμις και Γιώργο για την πίστη τους ότι θα τα καταφέρω ακόμα κι όταν εγώ αμφέβαλα για αυτό. Ευχαριστώ πολύ τους φίλους μου για όλη την ψυχολογική στήριξη και τις ώρες που έχουν περάσει να με ακούν να μιλάω για τα πειράματά μου.

Τα χρόνια του διδακτορικού μου δεν θα ήταν ίδια χωρίς τον Τρύφωνα, ο οποίος με βοήθησε να εστιάζω στα ουσιώδη και να σκέφτομαι με δημιουργικότητα και φαντασία πέρα από στενά περιοριστικά πλαίσια. Ένα μεγάλο ευχαριστώ για την υπομονή και τη δύναμη που μου προσέφερε απλόχερα.

Τέλος οφείλω να ευχαριστήσω όλα τα zebrafish που θυσιάστηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής και μας βοήθησαν να καταλάβουμε λίγο καλύτερα τους μηχανισμούς εκείνους που διέπουν το στρες.

Περιεχόμενα

Περίληψη	10
Abstract	13
Κεφάλαιο 1. Γενική εισαγωγή	16
1.1. Στρες - Καταπόνηση	16
1.1.1. Ορισμοί και παράγοντες καταπόνησης	18
1.1.2. Σύγχρονες θεωρίες απόκρισης στην Καταπόνηση	19
1.2. Φυσιολογία καταπόνησης στους τελεόστεους	20
1.2.1. Πρωτογενής Απόκριση	21
1.2.2. Δευτερογενής Απόκριση	21
1.2.3. Τριτογενής Απόκριση	22
1.2.4. Μοριακή απόκριση στο στρες	23
1.3. Γλυκοκορτικοστεροειδής υποδοχέας (GR)	24
1.4. Αλατοκορτικοστεροειδής υποδοχέας (MR)	26
1.5. Υπόθεση ισορροπίας MR:GR	29
1.6. Zebrafish	30
1.6.1 Φυσική Ιστορία	31
1.6.2. Εκτροφή του zebrafish σε εργαστηριακές συνθήκες	34
1.6.3. Μορφολογία	35
1.6.4. Αναπτυξιακά στάδια	35
1.6.5. Σημασία	37
1.6.6. Zebrafish ως οργανισμός μοντέλο για τις ανθρώπινες ασθένειες	39
1.6.7. Εργαλεία γενετικής τροποποίησης στο zebrafish	40
1.7. Σύστημα CRISPR/Cas9	41
1.7.1. Κατηγοριοποίηση των συστημάτων CRISPR-Cas	42
1.7.2. Μηχανισμός δράσης των συστημάτων CRISPR-Cas	43
1.8 Σκοπός διατριβής	44
Κεφάλαιο 2. Ηθολογικά πρότυπα zebrafish	46
2.1. Εισαγωγή	46
2.2. Υλικά και Μέθοδοι	48
2.2.1. Χειρισμός και προέλευση πειραματόζωνων	48

2.2.2. Συμπεριφορικές δοκιμασίες	48
2.2.3. Στατιστική ανάλυση	51
2.3. Αποτελέσματα	52
2.4. Συζήτηση	54
<i>Κεφάλαιο 3. Επίδραση φλουοξετίνης στην αγωνιστική συμπεριφορά σε ενήλικα zebrafish</i>	<i>60</i>
3.1. Εισαγωγή	60
3.2. Υλικά & Μέθοδοι	61
3.2.1. Χειρισμός και προέλευση πειραματόζωνων	61
3.2.2. Πειραματικός σχεδιασμός	61
3.2.3. Συμπεριφορική ανάλυση	62
3.2.4. Προσδιορισμός Κορτιζόλης	63
3.2.5. Απομόνωση RNA από εγκέφαλο zebrafish	64
3.2.6. Σύνθεση cDNA από RNA	64
3.2.7. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων RNA στα δείγματα	65
3.2.8. Στατιστική ανάλυση	66
3.3. Αποτελέσματα	67
3.4. Συζήτηση	72
<i>Κεφάλαιο 4. Επίδραση της φλουοξετίνης στην αγχώδους τύπου συμπεριφορά των προνυμφών zebrafish.</i>	<i>77</i>
4.1. Εισαγωγή	77
4.2. Υλικά και μέθοδοι.....	79
4.2.1. Χειρισμός και προέλευση πειραματόζωνων	79
4.2.2. Χημικές ουσίες και διαλύματα έκθεσης	80
4.2.3. Πειραματικός σχεδιασμός	81
4.2.4. Προσδιορισμός κορτιζόλης.....	83
4.2.5. Στατιστική ανάλυση	84
4.3. Αποτελέσματα	85
4.4. Συζήτηση	88
<i>Κεφάλαιο 5. Αγχώδους τύπου και κοινωνική συμπεριφορά σε ενήλικα zebrafish με σίγαση γονιδίων υποδοχέων γλυκοκορτικοστεροειδών</i>	<i>95</i>

5.1. Εισαγωγή	95
5.2. Υλικά & Μέθοδοι	98
5.2.1. Χειρισμός και προέλευση πειραματόζων	98
5.2.2. Διαδικασία εκκόλαψης και αποκελυφοποίησης της γαρίδας <i>Artemia salina</i>	100
5.2.3. Γονοτυπική ανάλυση	100
5.2.4. Συμπεριφορικές δοκιμασίες	101
5.2.5. Προσδιορισμός Κορτιζόλης	107
5.2.6. Στατιστική ανάλυση	107
5.3. Αποτελέσματα	108
5.4. Συζήτηση	116
Κεφάλαιο 6. Αγχώδους τύπου συμπεριφορά σε προνύμφες zebrafish και ο ρόλος των γλυκοκορτικοστεροειδών και αλατοκορτικοστεροειδών υποδοχέων.	126
6.1. Εισαγωγή	126
6.2. Υλικά και μέθοδοι	127
6.2.1 Χειρισμός και προέλευση πειραματόζων	127
6.2.2. Συμπεριφορικές δοκιμασίες	128
6.2.4. Προσδιορισμός Κορτιζόλης	130
6.2.5. Στατιστική ανάλυση	130
6.3. Αποτελέσματα	130
6.4. Συζήτηση	138
7. Συμπεράσματα	145
Βιβλιογραφία	147

Περίληψη

Στα ζωικά είδη με έντονες κοινωνικές αλληλεπιδράσεις και ιεραρχίες, παρατηρούνται δύο κύριες στρατηγικές αντιμετώπισης καταστάσεων ή αλλιώς ηθολογικά πρότυπα: η προδραστική και η αναδραστική. Τα χαρακτηριζόμενα ως προδραστικά άτομα θεωρείται πως ακολουθούν κυρίως μία κυριαρχική, επιθετική, τολμηρή και στερεοτυπική συμπεριφορά, ενώ τα αναδραστικά, μία υποτακτική, επιφυλακτική, φοβική και ευέλικτη συμπεριφορά. Οι συγκεκριμένες στρατηγικές είναι πολύ σημαντικές για την επιβίωση, την ομοίωση, την κοινωνική μάθηση, τη διερεύνηση, την αξιοποίηση διαθέσιμων πόρων καθώς και την αναπαραγωγή. Η συσχέτιση της επιθετικής συμπεριφοράς με άλλες εκφάνσεις της προσωπικότητας έχει διερευνηθεί σε πτηνά, τρωκτικά και θηλαστικά, όπου η επιθετική συμπεριφορά φάνηκε να συνδέεται με την εξερευνητική συμπεριφορά και την τολμηρότητα.

Η απόκριση των οργανισμών σε δυσμενή ερεθίσματα και προκλήσεις του φυσικού και κοινωνικού περιβάλλοντος διέπεται από περίπλοκους μοριακούς και νευροενδοκρινικούς μηχανισμούς. Η απόκριση των τελεόστεων στην καταπόνηση ρυθμίζεται μέσω της ενεργοποίησης του άξονα Υποθαλάμου – Υπόφυσης – Μεσονέφρου (Hypothalamic – pituitary – interrenal axis, HPI), οδηγώντας τελικά στην έκκριση της κορτιζόλης. Η επίδραση της κορτιζόλης κατά την απόκριση στο στρες ρυθμίζεται μέσω δύο υποδοχέων, του γλυκοκορτικοστεροειδούς (GR) και του αλατοκορτικοστεροειδούς (MR), με γενωμική και μη γενωμική δράση στη φυσιολογία και συμπεριφορά. Το zebrafish αν και στη φύση αποτελεί ένα κοινωνικό είδος, με ισχυρή τάση σχηματισμού κοπαδιού, σε πληθυσμούς χαμηλής συγκέντρωσης, εμφανίζει επιθετικές αλληλεπιδράσεις οι οποίες στην πλειοψηφία τους καταλήγουν σε σχέσεις κυριαρχίας – υποτέλειας και στα δύο φύλα. Επιπλέον, έκθεση σε οξύ και χρόνια στρες πυροδοτεί στο zebrafish συγκεκριμένα ηθολογικά πρότυπα και μετρήσιμες συμπεριφορές που το καθιστούν πολύτιμο οργανισμό μοντέλο για τη μελέτη μηχανισμών που ρυθμίζουν το στρες. Σκοπός της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη της αγωνιστικής συμπεριφοράς και των ηθολογικών προτύπων στο zebrafish, καθώς και ο ρόλος των γλυκοκορτικοστεροειδών υποδοχέων στην απόκριση στην καταπόνηση τόσο σε ενήλικα zebrafish όσο και σε προνύμφες.

Αρχικά (Κεφάλαιο 2), ενήλικα αρσενικά zebrafish τα οποία εκτέθηκαν σε δοκιμασία δυαδικής αγωνιστικής συμπεριφοράς και χαρακτηρίστηκαν ως κυρίαρχα και υποτελή, εκτέθηκαν στη συνέχεια σε μία σειρά συμπεριφορικών δοκιμασιών προκειμένου να διερευνηθεί η υπόθεση σχετικά με τη συνέπεια της απόκρισης στα διαφορετικά ηθολογικά πρότυπα του zebrafish. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα υποτελή άτομα εμφάνισαν μεγαλύτερη άνεση εξερεύνησης της κάθετης στήλης του νερού σε άγνωστο περιβάλλον σε σύγκριση με τα κυρίαρχα. Παράλληλα, τα άτομα που εμφάνισαν αυξημένη εξερευνητική τάση σε κατάλληλα σχεδιασμένη συμπεριφορική δοκιμασία έδειξαν και έναν

πιο αγχώδη φαινότυπο σε σχέση με τα μη εξερευνητικά. Με δεδομένο πως οι συμπεριφορικές αποκρίσεις των ατόμων δεν ακολούθησαν τα πρότυπα που έχουν οριστεί στη βιβλιογραφία, δεν ήταν εφικτός ο εντοπισμός κάποιας συνέπειας στην απόκριση των δύο ηθολογικών προτύπων. Συμπερασματικά, οι νικητές ή οι χαμένοι μίας δυαδικής αγωνιστικής αλληλεπίδρασης δεν αντικατοπτρίζουν ένα προδραστικό ή αναδραστικό ηθολογικό πρότυπο αντίστοιχα, καθώς η έκβαση μίας δυαδικής αγωνιστικής αλληλεπίδρασης και η θέση που θα καταλάβει κάθε άτομο στην κοινωνική αυτή ιεραρχία εξαρτώνται και από άλλους παράγοντες πέρα από το ηθολογικό πρότυπο του ατόμου.

Στη συνέχεια (Κεφάλαιο 3), διερευνήθηκαν οι διαφορές σε μοριακούς και ενδοκρινικούς ρυθμιστές στα διαφορετικά ηθολογικά πρότυπα καθώς και η σχέση της αγωνιστικής συμπεριφοράς με το σεροτονεργικό σύστημα. Ενήλικα αρσενικά zebrafish εκτέθηκαν σε δοκιμασία δυαδικής αγωνιστικής συμπεριφοράς και στα κυρίαρχα και υποτελή άτομα που προέκυψαν ακολούθησε μία σύντομη χορήγηση φλουοξετίνης. Ύστερα από τον φαρμακολογικό χειρισμό παρατηρήθηκε εκ νέου η αγωνιστική τους συμπεριφορά καθώς και η δομή της κοινωνικής τους ιεραρχίας και τελικά τα άτομα θανατώθηκαν προκειμένου να εκτιμηθούν τόσο η συγκέντρωση της κορτιζόλης όσο και η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Η οξεία χορήγηση φλουοξετίνης επηρέασε σημαντικά τη συμπεριφορά των zebrafish και τα επίπεδα έκφρασης διαφόρων γονιδίων, καθώς μείωσε σημαντικά την επιθετική συμπεριφορά των κυρίαρχων ατόμων και εξάλειψε την ακινητοποιημένη και αμυντική συμπεριφορά των υποτελών ατόμων. Αν και δεν εντοπίστηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση της κορτιζόλης μεταξύ των κυρίαρχων και υποτελών ατόμων, τα άτομα στα οποία χορηγήθηκε φλουοξετίνη εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση κορτιζόλης σε σύγκριση με τα άτομα χωρίς κάποιο φαρμακολογικό χειρισμό. Τέλος, η φλουοξετίνη άσκησε ισχυρή επίδραση και σε μοριακούς ρυθμιστές της νευρωνικής λειτουργίας, του στρες και των ηθολογικών προτύπων.

Η επίδραση της φλουοξετίνης στον άξονα HPI διερευνήθηκε περαιτέρω στο Κεφάλαιο 4, όπου χορηγήθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας σε προνύμφες zebrafish, οι οποίες στη συνέχεια εκτέθηκαν σε μία δοκιμασία εναλλαγής φωτός – σκότους προκειμένου να εκτιμηθεί η συμπεριφορική τους απόκριση στην καταπόνηση. Η σύντομη χορήγηση υψηλής συγκέντρωσης φλουοξετίνης είχε ως αποτέλεσμα τη στατιστικά σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης στις προνύμφες καθώς και τη μείωση της κινητικότητας τους ως απόκριση στις εναλλαγές φωτεινότητας.

Στόχος των επόμενων πειραμάτων αποτέλεσε η διερεύνηση του ρόλου των GR και MR στους νευροενδοκρινικούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν την απόκριση των οργανισμών σε συνθήκες καταπόνησης, αλλά και σε κοινωνικές προκλήσεις του περιβάλλοντος. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν γενετικές γραμμές zebrafish με σίγαση στους GR και MR, προκειμένου να

χαρακτηριστούν ηθολογικά ενήλικα άτομα των συγκεκριμένων στελεχών και να εντοπιστούν τυχόν διαφορές στην απόκρισή τους τόσο σε συνθήκες οξείας καταπόνησης όσο και χρόνιας (Κεφάλαιο 5). Από τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων πειραμάτων φάνηκε μία συμπληρωματική δράση των δύο υποδοχέων στη συμπεριφορική απόκριση των ενηλίκων zebrafish στο στρες. Τα $mr^{-/-}$ άτομα εμφάνισαν έναν πιο αγχώδη φαινότυπο σε σύγκριση με τα $gr^{-/-}$, ενώ δεν εντοπίστηκε κάποια διαφορά ως προς την κοινωνική προτίμηση των δύο στελεχών σε σύγκριση με τα άτομα αγρίου τύπου. Τα $gr^{-/-}$ εμφάνισαν υπερκορτιζολαιμία σε συνθήκες ηρεμίας, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή του GR στο σύστημα αρνητικής ανάδρασης της κορτιζόλης. Η υψηλή ενεργότητα του HPI άξονα που εμφάνισαν τα $gr^{-/-}$ άτομα συνοδεύτηκε και από έναν έντονα αναδραστικό φαινότυπο σε δοκιμασίες που επιτρέπουν την έκφραση της αγωνιστικής συμπεριφοράς του είδους.

Τέλος (Κεφάλαιο 6), μελετήθηκε και η συμπεριφορική και ενδοκρινική απόκριση σε οξεία καταπόνηση σε προνύμφες zebrafish αγρίου τύπου, $gr^{-/-}$, $mr^{-/-}$ και $gr^{-/-}mr^{-/-}$. Η υπερκορτιζολαιμία που παρατηρήθηκε στα ενήλικα $gr^{-/-}$, εντοπίστηκε και στις προνύμφες τόσο σε κατάσταση ηρεμίας όσο και σε συνθήκες οξείας καταπόνησης. Οι συμπεριφορικές δοκιμασίες στις οποίες εκτέθηκαν οι προνύμφες ήταν μία δοκιμασία απόκρισης σε μηχανική καταπόνηση και δύο δοκιμασίες εναλλαγής φωτός – σκότους με δύο διαφορετικές εντάσεις φωτεινότητας. Οι τρεις γενετικές γραμμές με μετάλλαξη στους υποδοχείς των γλυκοκορτικοστεροειδών εμφάνισαν μία διαταραγμένη ένταση απόκρισης στα μηχανικά ερεθίσματα αλλά και στο επίπεδο εξοικείωσής τους. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει μία πιθανή αλληλεπίδραση των υποδοχέων των γλυκοκορτικοστεροειδών με την ενεργότητα των νευρώνων Mauthner, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τη συμπεριφορική απόκριση των προνυμφών σε αυτού του είδους τα ερεθίσματα. Επιπλέον φάνηκε πως η ένταση του φωτισμού στον οποίο εκτίθενται οι προνύμφες σε δοκιμασίες εναλλαγής φωτός – σκότους διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο τόσο στην ένταση όσο και στο μοτίβο της συμπεριφορικής απόκρισης. Οι διαφορές στην απόκριση των προνυμφών με σίγαση στα γονίδια των γλυκοκορτικοστεροειδών υποδοχέων στις διαφορετικές εντάσεις φωτεινότητας ενδεχομένως οφείλονται σε προβλήματα στην οπτική επεξεργασία και στην προσαρμογή στην εναλλαγή των φωτεινών ερεθισμάτων.

Abstract

Animal species with strong social interactions and hierarchies exhibit two distinct coping styles, which comprise a group of consistent behavioral and physiological characteristics. Individuals with a proactive coping style are considered dominant, aggressive, bold and with a stereotypic behavior, whereas reactive individuals exhibit a more subordinate, fearful, shy, and flexible behavior. These coping styles are important for survival, homeostasis, social learning, use of the available resources and reproduction. The correlation between aggressive behavior and other behavioral characteristics has been studied in avian species, rodents, and mammals, where aggressive behavior was linked to exploratory behavior and boldness.

There are several molecular and neuroendocrinological mechanisms that underlie an animal's response to negative stimuli and challenges of the natural and social environment. Teleost's response to stress is regulated through the activation of the Hypothalamic – pituitary – interrenal axis (HPI), leading to the production of cortisol. The effect of cortisol in stress response is regulated through two receptors, the glucocorticoid (GR) and the mineralocorticoid receptor (MR), through genomic and non-genomic effects on physiology and behavior. Zebrafish possesses characteristics that render it an ideal model organism for studying stress. It is a social species, forming schools in nature, yet when kept in pairs, it expresses an aggressive behavior that most of the time leads in the formation of hierarchies. Additionally, under exposure to acute and chronic stress the species has a robust and quantifiable behavioral and physiological response. The overall aim of the present study was to investigate the agonistic behavior and coping styles of zebrafish, as well as the role of the glucocorticoid receptors in the stress response of adult zebrafish and larvae.

Initially (Chapter 2), adult male zebrafish characterized as dominants and subordinates through a paired aggression test, were exposed to a battery of behavioral assays, aiming to detect a correlation between the behavioral characteristics of the two coping styles. Results showed that subordinates explored the upper parts of a novel tank more freely than dominants, while individuals with exploratory tendencies exhibited a more anxious phenotype compared to the non – explorers. Given that the behavioral responses observed were not in accordance with the literature, we were not able to detect a consistency in the behavioral response of the two coping styles. The winners and losers of a dyadic fight do not necessary reflect a proactive or reactive coping style, respectively, since the outcome of a fight and the social rank of an animal depend on factors other than the individual's coping style.

In accordance with this, we investigated associated differences in molecular and endocrine regulators of coping styles as well as the role of serotonin in the aggressive behavior of zebrafish. Adult male zebrafish were exposed to a paired aggression test and the resulting dominant and subordinate

fish were administered fluoxetine for two hours. After further observing their agonistic behavior and the state of their social hierarchy, fish were euthanized for cortisol determination and gene analysis studies. Acute exposure to fluoxetine had a significant effect on the behavior of the fish, by reducing the aggressive behavior of dominants and the defensive behavior of subordinates. There was no statistically significant difference in cortisol concentration between the two coping styles, however zebrafish exposed to fluoxetine had significantly lower cortisol concentration compared to the fish that were not exposed to the antidepressant. In addition, fluoxetine affected the expression levels of genes related to neural activity, stress and coping styles. The effect of fluoxetine on the HPI axis was further studied in Chapter 4, where after exposing zebrafish larvae to three different doses of fluoxetine for two hours, we subjected them to a behavioral assessment of alternating light and dark conditions. This acute administration of fluoxetine significantly increased the cortisol concentration of larvae and reduced the swimming activity in response to the alternating lighting conditions.

The aim of the following experiments was to investigate the role of GR and MR in the neuroendocrine mechanisms that regulate the organism's response to stress and social challenges of the environment. More specifically, zebrafish mutant lines for *gr* and *mr* were used to observe potential differences between the behavioral and endocrine response of these genetic strains under acute and chronic stress conditions (Chapter 5). The results showed a complementary action of the two receptors in regard to the behavioral stress response of adult zebrafish. While there was no difference in the social preference of the two strains compared to the wild type adults, *mr*^{-/-} adults exhibited a more anxious phenotype compared to *gr*^{-/-}. Moreover, the higher cortisol concentration under baseline conditions in *gr*^{-/-} adults, points to the important role of GR in the negative feedback loop of the HPI axis. Along with the higher HPI activity of *gr*^{-/-} zebrafish, we also observed a more reactive behavioral phenotype of these individuals when exposed to tests that trigger the expression of the species' agonistic behavior.

Finally (Chapter 6), we studied the behavioral and endocrinological response to acute stress in wild type, *gr*^{-/-}, *mr*^{-/-} and *gr*^{-/-} *mr*^{-/-} zebrafish larvae. Similar to adults, *gr*^{-/-} larvae exhibited higher cortisol concentrations under baseline and stress conditions. Behavioral tests used in this set of experiments were two light – dark alteration protocols of two different light intensities and a vibrational startle response assay. Larvae knockouts displayed a disturbed response to a series of mechanical stimuli and a significant difference in their habituation levels compared to wild type larvae. This observation suggests an involvement of the glucocorticoid receptors in the activity of the neurons that are responsible for the behavioral response of larvae to these stressors. Furthermore, it was shown that the brightness of the light in assays that expose zebrafish larvae to alternating light and dark conditions, severely affects the intensity of the response as well as the pattern. While the higher light

intensity used in these experiments is often chosen for these assays in the literature, our observations suggested that low intensity light could be considered as a mild stressor, while higher intensity could be perceived as an extreme stressor. The differences observed in the response of larvae knockouts under different light conditions could be due to defects in visual processing of stimuli and visual adaptation.

Κεφάλαιο 1. Γενική εισαγωγή

1.1. Στρες - Καταπόνηση

Το στρες αποτελεί μία έννοια η οποία έχει μελετηθεί εκτενώς τόσο από τις επιστήμες της Βιολογίας και Φυσιολογίας, όσο και από την πλευρά των κοινωνικών επιστημών, κυρίως εκείνες της Ψυχολογίας και της Φιλοσοφίας. Αν και η μελέτη των Αρχαίων κειμένων δείχνει πως ο Αριστοτέλης και ο Ιπποκράτης είχαν εγείρει συζητήσεις και σκέψεις γύρω από την έννοια της καταπόνησης και των επιπτώσεων της στον οργανισμό (Fink, 2016), η έννοια του στρες εισήχθη από τον Γάλλο Φυσιολόγο Claude Bernard (Bernard, 1859). Η εμφάνιση της έννοιας συνέπεσε με μία εποχή όπου οι Κοινωνικές με τις Βιολογικές Επιστήμες χωρίζονταν από χάσματα που τότε θεωρούνταν ακόμα αγεφύρωτα (Hinkle, 1974). Μόλις το 1910 διατυπώθηκε επίσημα στους ιατρικούς κύκλους η υπόθεση πως συγκεκριμένα κλινικά προβλήματα, τα οποία αποτελούν διαταραχές της φυσιολογίας του σώματος, ενδέχεται να σχετίζονται με καταστάσεις ψυχολογικής καταπόνησης (Osler, 1910). Η πρώτη σύνδεση του όρου στρες με την έννοια της καταπόνησης, όπως αυτή ορίζεται σήμερα από την επιστημονική κοινότητα, έγινε το 1935 από τον Walter Cannon, ο οποίος σε εργαστηριακά πειράματα παρατήρησε τις μεταβολές στη φυσιολογία ζώων και ανθρώπων όταν τα σώματά τους εκτίθενται σε καταστάσεις πιθανού κινδύνου (Cannon, 1935). Η μελέτη του τρόπου με τον οποίο τα άτομα επιλέγουν να αντιμετωπίσουν επικίνδυνες καταστάσεις οδήγησε στην παρατήρηση πως οι οργανισμοί τείνουν είτε να παλέψουν είτε να διαφύγουν της κατάστασης. Τότε δόθηκε και η πρώτη περιγραφή της αντίδρασης «πάλης ή φυγής» (fight or flight response).

Η πρώτη προσπάθεια σαφούς ορισμού του στρες ήρθε το 1936 από τον ενδοκρινολόγο Hans Selye ύστερα από έρευνες συσχέτισης του στρες με την εμφάνιση συγκεκριμένων ασθενειών στον άνθρωπο αλλά και σε πειραματόζωα (Selye, 1936). Ο πρώτος αυτός ορισμός περιορίστηκε στη γενική θεώρηση μίας μη ειδικής απόκρισης του σώματος σε απαιτήσεις του περιβάλλοντος. Από τότε έχουν γίνει πολυάριθμες προσπάθειες περιγραφής και σαφούς οριοθέτησης του στρες και ως αποτέλεσμα έχουν προκύψει πολλοί διαφορετικοί ορισμοί ανάλογα με τη σκοπιά της Επιστήμης από την οποία μελετάται. Από την πλευρά της Ψυχολογίας, το στρες έχει οριστεί ως η αντίληψη μίας απειλής, η οποία προκαλεί δυσφορία άγχους, συναισθηματική ένταση και δυσκολία στην προσαρμογή (Fink, 2009). Υπό αυτή τη θεώρηση, το στρες προκύπτει όταν οι περιβαλλοντικές απαιτήσεις ξεπερνούν την αντίληψη κάποιου ως προς την ικανότητά του να ανταπεξέρθει σε αυτές (Lazarus and Folkman, 1984). Από την πλευρά των κοινωνιολόγων, το στρες αποτελεί μία κοινωνική ανισορροπία, η οποία διαταράσσει την κοινωνική δομή εντός της οποίας οι άνθρωποι ζουν και δραστηριοποιούνται (Fink, 2016).

Το στρες έχει αποδειχθεί πως αποτελεί έναν ισχυρότατο παράγοντα επιδείνωσης της ψυχικής και σωματικής υγείας των ανθρώπων. Ως εκ τούτου, του έχει αποδοθεί ο χαρακτηρισμός της επιδημίας

ενώ πλέον έχει στοιχειοθετηθεί πως οι επιπτώσεις του επεκτείνονται και στον οικονομικό τομέα, καθώς επιδρά δραματικά στην παραγωγικότητα των εργαζομένων. Σύμφωνα με τα στατιστικά δεδομένα των τελευταίων χρόνων, πάνω από το 50% των εργάσιμων ημερών χάνονται στην Ευρώπη λόγω του έντονου στρες με το οποίο επιβαρύνεται το εργατικό δυναμικό (Hassard *et al.*, 2014). Άρρηκτα συνδεδεμένο με το άγχος, το στρες διαδραματίζει έναν κεντρικό ρόλο σε ψυχικές παθήσεις, μεταξύ αυτών φοβίες (Ribas *et al.*, 2018), μείζων κατάθλιψη (Hammen, 2005) και διπολική διαταραχή (Post, 1992; Johnson and Roberts, 1995; Dienes *et al.*, 2006). Οι αγχώδεις διαταραχές αποτελούν ενδεχομένως την εμφανέστερη επίπτωση του στρες στην ανθρώπινη ψυχική υγεία. Αποτελούν μία ευρεία κατηγορία ψυχικών ασθενειών, με υψηλότερη συχνότητα καθώς η πιθανότητα εμφάνισής της στον γενικό ενήλικο πληθυσμό κατά μέσο όρο κυμαίνεται μεταξύ του 10.6 και 16.6% (Somers *et al.*, 2006). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας τις έχει κατατάξει στην 9η πιο συχνή αιτία αναπηρίας (Vos *et al.*, 2017), ενώ το κόστος τους στις Ευρωπαϊκές Χώρες έχει υπολογιστεί πως είναι περίπου στα 74 δισεκατομμύρια ευρώ (Gustavsson *et al.*, 2011). Η συσχέτιση των διαφόρων εκφάνσεων της αγχώδους διαταραχής με την φυσική υγεία έχει αποδειχθεί πλέον ισχυρή (Sareen *et al.*, 2005), αν και το ευρύ φάσμα του όρου αγχώδεις διαταραχές δυσκολεύει τις σχετικές έρευνες. Ολοένα και αυξανόμενος είναι όμως ο αριθμός των ερευνών που συνδέουν τις παθήσεις του θυρεοειδούς αδένος (Simon *et al.*, 2002), τις καρδιαγγειακές παθήσεις (Bennett *et al.*, 2001), την παχυσαρκία και τα μεταβολικά σύνδρομα (Κyrou and Tsigos, 2009) με τις αγχώδεις διαταραχές. Μάλιστα, η συσχέτιση του χρόνιου πόνου με τις αγχώδεις διαταραχές (Stubbs *et al.*, 2016; Vachon-Preseau, 2018) έχει φανεί ισχυρότερη από τη συσχέτισή του με την κατάθλιψη (McWilliams *et al.*, 2003; McWilliams *et al.*, 2004).

Οι μηχανισμοί δράσης και αλληλεπίδρασης που διέπουν τις αγχώδεις διαταραχές παραμένουν σε μεγάλο βαθμό ακόμα άγνωστοι, επομένως υπάρχει μεγάλη ανάγκη έρευνας ώστε να έρθουν στο φως άγνωστες πτυχές τους και να καλυφθούν ιατρικές ανάγκες. Έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμα ζωικά μοντέλα τα οποία χρησιμοποιούνται στις βιοϊατρικές έρευνες για την κατανόηση των μηχανισμών, όπως και για τις τοξικολογικές και φαρμακολογικές μελέτες ουσιών με πιθανή θεραπευτική δράση (Ohi, 2005). Είναι πολλά τα ζωικά είδη που έχουν χρησιμοποιηθεί ως οργανισμοί - μοντέλα για τη μελέτη του άγχους και των διαταραχών του, όπως πρωτεύοντα (Barros and Tomaz, 2002), μύες, επίμυες (Steimer, 2011) και φυσικά το zebrafish (Steenbergen *et al.*, 2011b; Kalueff *et al.*, 2014).

Η έρευνα του στρες όμως στα ζώα δεν έχει περιοριστεί μόνο στον τομέα των βιοϊατρικών ερευνών και τη μοντελοποίηση ανθρώπινων ασθενειών, αλλά και σε άλλους τομείς. Η μελέτη του στρες αποτελεί μια σημαντική παράμετρο της ευρωστίας, ευζωίας και ευημερίας τόσο των εργαστηριακών όσο και των οικόσιτων και παραγωγικών ζώων προσφέροντας χρήσιμες πληροφορίες για τον σχεδιασμό καλύτερων πρωτοκόλλων και συνθηκών εκτροφής (Kumar *et al.*, 2012). Όσον αφορά στο

zebrafish καθώς και στους εκτρεφόμενους ιχθύες, η έρευνα της φυσιολογίας του στρες έχει συμβάλει τα τελευταία χρόνια στη βελτίωση των συνθηκών εκτροφής τους (Pavlidis and Samaras, 2020; Piferrer and Ribas, 2020; Stien *et al.*, 2020).

1.1.1. Ορισμοί και παράγοντες καταπόνησης

Η εκτενής μελέτη του στρες από τη σκοπιά της Φυσιολογίας έχει οδηγήσει σε πολυάριθμους ορισμούς (Brett, 1958; Chrousos, 1998; Koolhaas *et al.*, 2011). Εκείνος ο οποίος φαίνεται να κυριαρχεί τα τελευταία χρόνια προτείνει πως το στρες είναι «η φυσιολογική αλληλουχία γεγονότων που προκύπτει όταν ο οργανισμός προσπαθεί να αντισταθεί στον θάνατο ή να επανεγκαθιδρύσει την ομοιόστασή του μπροστά σε μία απειλή» (Schreck, 2000). Το στρες αποτελεί βασικό παράγοντα της ικανότητας ενός οργανισμού να αντιμετωπίζει αλλαγές στο περιβάλλον του και να προσαρμόζεται στις απειλές της ομοιόστασης. Η βιολογική θεώρηση αρχικά αντιλαμβανόταν το στρες ως μία συνεχή μεταβλητή η οποία έχει την τάση να κυμαίνεται μεταξύ υψηλών και χαμηλών τιμών (Duffy, 1962). Οι συνεχείς έρευνες στον τομέα οδήγησαν στην αναγνώριση πως το στρες ενδέχεται να μην είναι ούτε τόσο μονοδιάστατο, ούτε και πάντα καταστροφικό. Σχηματίστηκαν θεωρίες οι οποίες επιδίωκαν τον διαχωρισμό του στρες σε επιμέρους κατηγορίες, με αποτέλεσμα το ευεργετικό «ευ-στρες» (eustress) να διαχωριστεί από το καταστροφικό στρες (distress) (Selye, 1973).

Όσο και αν διαφέρει το θεωρητικό πλαίσιο γύρω από το οποίο το στρες ορίζεται και μελετάται, η γενική παραδοχή είναι πως το στρες αποτελεί μία συνθήκη κατά την οποία το ζώο αδυνατεί να διατηρήσει την κανονική κατάσταση της φυσιολογίας του εξαιτίας ποικίλων παραγόντων που επιδρούν δυσμενώς στην ευημερία του. Επομένως ένα ψάρι θα βρεθεί σε κατάσταση καταπόνησης όταν οι συνθήκες στο περιβάλλον του είναι εκτός του φυσιολογικού εύρους ανοχής του (Rottmann *et al.*, 1992). Ως παράγοντας καταπόνησης ορίζεται ένα αποσταθεροποιητικό ερέθισμα, στο οποίο το ζώο αντιδρά μέσω της απόκρισής του, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μίας κατάστασης καταπόνησης. Στην περίπτωση των ιχθύων, ένας τέτοιος παράγοντας μπορεί να είναι φυσικο - χημικός, βιολογικός αλλά και διαχειριστικός. Στους χημικούς στρεσογόνους παράγοντες που μπορεί εν δυνάμει να εκτεθεί ένα εκτρεφόμενο είδος, ανήκουν τοξικές ουσίες και ρύποι, κακή ποιότητα του νερού εκτροφής, ακατάλληλη σύσταση τροφής, καθώς και τα μεταβολικά απόβλητα των ψαριών τα οποία μπορεί να επηρεάσουν τη συγκέντρωση αμμωνίας και νιτρικών στη δεξαμενή εκτροφής. Στους βιολογικούς παράγοντες συγκαταλέγονται βιοτικές αλληλεπιδράσεις με μικροοργανισμούς και μακροοργανισμούς, όπως παράσιτα, καθώς και οι γενικότερες ηθολογικές σχέσεις στον πληθυσμό. Επιπλέον, η φυσιολογική κατάσταση του ψαριού, η οντογενετική του φάση, το γενετικό του υπόβαθρο και η κατάσταση της υγείας του συγκαταλέγονται σε πιθανούς βιολογικούς παράγοντες καταπόνησης. Το φως, η θερμοκρασία του νερού, οι διάφοροι ήχοι καθώς και αέρια διαλυμένα στο νερό μπορούν να διαδραματίσουν ρόλο φυσικών στρεσογόνων παραγόντων. Ποικίλοι

διαχειριστικοί παράγοντες, όπως η μεταφορά σε δεξαμενές, οι εμβολιασμοί, το ζύγισμα και η διαλογή συμβάλλουν κατά ένα σημαντικό βαθμό στην καταπόνηση των εκτρεφόμενων ψαριών.

1.1.2. Σύγχρονες θεωρίες απόκρισης στην Καταπόνηση

Από τη μελέτη του Selye σε αρουραίους υπό συνθήκες στρες προέκυψαν παρατηρήσεις και συμπεράσματα που οδήγησαν στη διατύπωση του «Συνδρόμου Γενικής Προσαρμογής» (General Adaptation Syndrome, GAS) (Selye, 1950). Η θεωρία αυτή βασίζεται στην παρατήρηση πως το στρες προκαλεί μία γενικευμένη αντίδραση, η οποία αποτελείται από τρία διακριτά στάδια, αυτά του συναγερμού, της αντίστασης και τελικά της αντιστάθμισης ή εξάντλησης (παθολογική κατάσταση ή θάνατος). Αρκετοί ήταν οι ερευνητές οι οποίοι δεν συμφώνησαν με τη συγκεκριμένη θεώρηση του Selye ως προς τη μη ειδικότητα της απόκρισης στο στρες. Η συνεχώς αυξανόμενη γνώση σχετικά με τα νευρικά και ενδοκρινικά συστήματα, σε συνδυασμό με τις σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές, οδήγησαν σταδιακά στην εγκατάλειψη της θεωρίας του GAS. Οι σύγχρονες θεωρίες αναγνωρίζουν την ειδικότητα της απόκρισης στην εκάστοτε καταπόνηση καθώς και τη σημασία των παρελθοντικών εμπειριών στον τρόπο με τον οποίο θα αποκριθούν οι οργανισμοί στις μελλοντικές προκλήσεις (McCarty, 2016).

Οι Lazarus και Folkman εισήγαγαν το 1984 την έννοια της εκτίμησης (appraisal) του ερεθίσματος/πρόκλησης, η οποία επιδρά στη συναισθηματική εμπειρία του στρες (Lazarus and Folkman, 1984). Η θεωρία αυτή πηγάζει από την ψυχολογική έρευνα του στρες και προτείνει πως η εκτίμηση του παράγοντα καταπόνησης συμβαίνει σε δύο γνωστικά επίπεδα. Στο πρωτεύον επίπεδο (primary appraisal) το άτομο αξιολογεί την πιθανή απειλή της ευημερίας του και επεξεργάζεται το κατά πόσο το συγκεκριμένο ερέθισμα αποτελεί απειλή, ενώ στο δευτερεύον επίπεδο (secondary appraisal) το άτομο αξιολογεί τις επιλογές απόκρισης που διαθέτει.

Η αντιμετώπιση (coping) αποτελεί μία άλλη σημαντική πτυχή της απόκρισης ενός ατόμου σε ερεθίσματα καταπόνησης και έχει οριστεί ως «οι γνωσιακές και συμπεριφορικές προσπάθειες διαχείρισης των απαιτήσεων σε σχέση με τους διαθέσιμους πόρους» (Lazarus and Folkman, 1984). Η εκτίμηση και η αντιμετώπιση αλληλοεπιδρούν καθώς και οι δύο έννοιες ενέχουν γνωσιακές διεργασίες. Όπως έχει οριστεί από τον τομέα της Ψυχολογίας, το στρες αφορά στις συνθήκες εκείνες στις οποίες μία περιβαλλοντική απαίτηση ξεπερνά τη ρυθμιστική και προσαρμοστική ικανότητα ενός οργανισμού, κυρίως σε περίπτωση απρόβλεπτων και ανεξέλεγκτων συνθηκών (Koolhaas *et al.*, 2011). Σύμφωνα με αυτήν τη θεώρηση, η πλέον στρεσογόνος συνθήκη χαρακτηρίζεται από απουσία πληροφοριών, ελέγχου και πρόβλεψης των μελλοντικών συμβάντων και πιθανών απειλών. Επομένως, η προσμονή και η εκτίμηση ενός στρεσογόνου γεγονότος είναι κρίσιμοι παράγοντες της απόκρισης στην καταπόνηση.

Η ομοιόσταση αναφέρεται στη διατήρηση της σταθερότητας των ρυθμιστικών μηχανισμών στο

εσωτερικό ενός οργανισμού και αποτέλεσε για μεγάλο χρονικό διάστημα τον κεντρικό πυρήνα θεώρησης της φυσιολογίας. Από την πρώτη εισαγωγή του όρου όμως το 1932 (Canon, 1932), η σύγχρονη έρευνα έχει στραφεί στη σημασία της προσαρμογής του οργανισμού στις αλλαγές και στις προκλήσεις των στρεσογόνων παραγόντων. Η παρατήρηση πως η ικανότητα προσαρμογής στις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες και σωματικές ανάγκες βελτιστοποιεί την επιβίωση, αύξηση και αναπαραγωγή, οδήγησε στην εισαγωγή ενός νέου όρου στο πεδίο μελέτης της φυσιολογικής απόκρισης στο στρες, αυτόν της αλλόστασης (Sterling and Eyer, 1988). Εισάγεται λοιπόν η ιδέα πως ο οργανισμός διατηρεί σταθερότητα μέσω της αλλαγής, μέσω μεταβολής της έκφρασης μεσολαβητικών χημικών παραγόντων, όπως ορμόνες και νευροδιαβιβαστές (McEwen, 1998; Sterling, 2012).

Το μοντέλο της αλλόστασης δεν εστιάζει στην απόκριση του οργανισμού, αλλά στην πρόγνωση, η οποία περιλαμβάνει εκτίμηση, πρόβλεψη και γνωσιακή επεξεργασία της κατάστασης στο συγκεκριμένο πλαίσιο (context) που εκδηλώνεται. Οι οργανισμοί δηλαδή, προσαρμόζουν τις μεταβλητές των ρυθμιστικών τους μηχανισμών και προχωρούν σε σύνθεση υπάρχουσας γνώσης και προβλεπόμενων τωρινών αναγκών. Ο όρος αλλοστατικό φορτίο αναφέρεται στην ικανότητα ενός οργανισμού να αντιμετωπίζει μία συγκεκριμένη πρόκληση προσαρμόζοντας τη συμπεριφορά και φυσιολογία του. Όταν το αλλοστατικό αυτό φορτίο ξεπεραστεί και φτάσουμε στην αλλοστατική υπερφόρτωση (allostatic overload) εμφανίζονται παθολογικές καταστάσεις και δυσμενείς επιπτώσεις στη φυσιολογία του οργανισμού (McEwen and Wingfield, 2003). Αυτό παρατηρείται υπό συνθήκες χρόνιου στρες όπου τα άτομα δεν μπορούν να αντιμετωπίσουν επιτυχώς συνεχείς στρεσογόνες προκλήσεις.

1.2. Φυσιολογία καταπόνησης στους τελεόστεους

Η μελέτη της καταπόνησης στα ψάρια διαθέτει μία σχετικά σύντομη ιστορία σε σύγκριση με την αντίστοιχη έρευνα στα οικόσιτα και εργαστηριακά ζώα και ανάγεται στα τέλη της δεκαετίας του '80. Τότε οι πρώτοι ιχθυοενδοκρινολόγοι χρησιμοποίησαν τεχνικές που έδωσαν τη δυνατότητα μέτρησης των στεροειδών ορμονών στις πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις που εμφανίζουν στο αίμα των ψαριών (Pottinger, 2008). Στην πορεία των χρόνων οι διαθέσιμες τεχνικές έχουν εμπλουτιστεί με αποτέλεσμα να φωτιστούν αρκετές πτυχές της απόκρισης των ψαριών και του τρόπου που αυτή επηρεάζει και επηρεάζεται από ένα εύρος παραγόντων. Αν και η απόκριση των ατόμων στο στρες μπορεί να ποικίλει ανάλογα με το είδος στο οποίο ανήκουν, το αναπτυξιακό τους στάδιο αλλά και τον τύπο και ένταση του παράγοντα καταπόνησης, η γενικότερη στρατηγική αντιμετώπισης διακρίνεται σε τρία επίπεδα (πρωτογενές, δευτερογενές και τριτογενές), τα οποία προκαλούν ορατές επιπτώσεις με αλλαγές σε κυτταρικό, φυσιολογικό και ηθολογικό επίπεδο.

1.2.1. Πρωτογενής Απόκριση

Ουσιαστικά η απόκριση στο στρες αποσκοπεί στην ενίσχυση των πιθανοτήτων επιβίωσης του οργανισμού που βρίσκεται αντιμέτωπος με μία άμεση απειλή. Στο πρωτογενές επίπεδο εμφανίζονται νευροενδοκρινικές αποκρίσεις με τη μορφή έκκρισης ορμονών σχετικών με το στρες. Η έκκριση προϋποθέτει την ενεργοποίηση ενός πολύπλοκου συστήματος, στο οποίο συνεργάζονται διάφοροι ιστοί και όργανα. Η απόκριση ξεκινάει από το μεταιχμιακό σύστημα του εγκεφάλου και εμπλέκει δύο κύριους νευρο - ενδοκρινικούς μηχανισμούς (Herman *et al.*, 2005). Ο πρώτος περιλαμβάνει τη γρήγορη ενεργοποίηση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος με κατάληξη την απελευθέρωση των κατεχολαμινών επινεφρίνη (αδρεναλίνη) και νορεπινεφρίνη (νοραδρεναλίνη) στο αίμα μέσω του χρωμιόφιλου ιστού. Ο δεύτερος περιλαμβάνει την ενεργοποίηση μιας πιο αργής διαδοχικής απελευθέρωσης ορμονών, η οποία εμπλέκει τρεις βαθμίδες οργάνωσης: τον υποθάλαμο, την υπόφυση και τον μεσονεφρικό ιστό (μεσόνεφρο – interrenal). Οι τρεις αυτές βαθμίδες οργάνωσης αποτελούν τον λεγόμενο άξονα Υποθαλάμου – Υπόφυσης – Μεσόνεφρου [Hypothalamic – Pituitary – Interrenal (HPI) axis]. Στην περίπτωση των θηλαστικών ενεργοποιείται ο αντίστοιχος άξονας Υποθαλάμου – Υπόφυσης – Επινεφριδίων [Hypothalamic – Pituitary – Adrenal (HPA) axis]. Ομοίως με τον HPA άξονα, ενεργοποίηση του HPI άξονα στους τελεόστεους ιχθύες καταλήγει στην απελευθέρωση στην κυκλοφορία του αίματος της στεροειδούς ορμόνης κορτιζόλης (Van Der Boon *et al.*, 1991). Πιο αναλυτικά, από τον υποθάλαμο εκκρίνεται η κορτικοεκλυτίνη (εκλυτική ορμόνη κορτικοτρόπου ορμόνης, CRF), η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης ή αδρενοκορτικοτροπίνης (ACTH) και τελικά την έκκριση της κορτιζόλης από τον μεσονεφρικό ιστό.

Οι υψηλές συγκεντρώσεις κατεχολαμινών και κορτιζόλης στο αίμα αντιπροσωπεύουν την πρωτογενή απόκριση στον στρεσογόνο παράγοντα, η οποία υποκινεί άμεσες αλλαγές σε πολλούς ιστούς. Ως αποτέλεσμα, προκαλούνται δευτερογενείς μεταβολές σε επίπεδο μεταβολισμού και οσμωρύθμισης, αποκρίσεις οι οποίες έχουν ως στόχο την προσπάθεια αύξησης των πιθανοτήτων επιβίωσης του ατόμου.

1.2.2. Δευτερογενής Απόκριση

Στο επίπεδο αυτό εμφανίζονται καρδιοαναπνευστικές και μεταβολικές αλλαγές που εκδηλώνονται ως αύξηση της αναπνευστικής ικανότητας, του καρδιακού ρυθμού και της ροής του αίματος στα βράγχια, συνοδευόμενες από αύξηση της κινητικότητας των υδατανθρακικών και λιπιδικών αποθεμάτων (Pickering and Pottinger, 1985). Η αύξηση της ροής αίματος στα βράγχια οδηγεί σε καλύτερη οξυγόνωση.

Οι αυξημένες συγκεντρώσεις κατεχολαμινών και κορτιζόλης οδηγούν σε βιοχημικές και φυσιολογικές μεταβολές. Η κορτιζόλη ενεργεί συνεργατικά με τις κατεχολαμίνες αυξάνοντας τις

καταβολικές διεργασίες. Χαρακτηριστικά, οι κατεχολαμίνες προάγουν την απελευθέρωση της γλυκόζης μέσω της ηπατικής γλυκογενόλυσης (Fabbrì *et al.*, 1998). Στο ηπατικό μονοπάτι της γλυκογενόλυσης δρα και η κορτιζόλη προκαλώντας υπεργλυκαιμία (Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen *et al.*, 1999). Παράλληλα, η κορτιζόλη ασκεί πρωτεολυτικές και λιπολυτικές δράσεις, οδηγώντας σε αυξημένες συγκεντρώσεις αμινοξέων και ελεύθερων λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία.

Στο σύνολό τους οι επιπτώσεις της κορτιζόλης μπορούν να θεωρηθούν αρνητικές. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ο ρόλος των υψηλών επιπέδων κορτιζόλης στην προκαλούμενη από το στρες ανοσοκαταστολή (Weyts *et al.*, 1999). Η συνθήκη αυτή συχνά αποκαλείται ως «ανοσοποιητικό παράδοξο», καθώς η απόκριση στο στρες αποτελεί έναν αμυντικό μηχανισμό ο οποίος ενεργοποιεί μεταξύ άλλων συστημάτων και το ανοσοποιητικό σύστημα προκειμένου να συνεργαστεί στην αντιμετώπιση της πρόκλησης. Τwόντι, αναλόγως τις συνθήκες και τη διάρκεια της καταπόνησης, το στρες μπορεί να δρα και ενισχυτικά αλλά και κατασταλτικά στο ανοσοποιητικό σύστημα (Dhabhar, 2001). Το χρόνιο στρες απορρυθμίζει τις ανοσολογικές αποκρίσεις, μειώνοντας τον αριθμό και τη λειτουργικότητα συγκεκριμένων ανοσοποιητικών κυττάρων, ενώ αυξάνει την ενεργότητα των ανοσοκατασταλτικών μηχανισμών, όπως τα ρυθμιστικά T – κύτταρα (Glaser and Kiecolt-Glaser, 2005).

Παράλληλα, τα ευρέως κατασταλτικά αποτελέσματα της κορτιζόλης στις αναπαραγωγικές και αναπτυξιακές διαδικασίες μπορούν να θεωρηθούν μία εκτροπή πόρων μακριά από μη απαραίτητες διαδικασίες μέχρι να εξασφαλιστεί η επιβίωση του ατόμου. Επιπροσθέτως, αλλαγές στο κυτταρικό επίπεδο εκφράζονται με αύξηση της έκκρισης των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (heat shock proteins Hsp/stress proteins) ως απόκριση στην αύξηση της καταπόνησης. Η δράση αυτή στοχεύει στη βελτίωση της ανοχής στο στρες.

1.2.3. Τριτογενής Απόκριση

Η ένταση του στρες φτάνει στα όρια ανοχής των ψαριών δυσκολεύοντας τον εγκληματισμό και προκαλώντας προβλήματα στην επιβίωση, καθώς οι αυξημένες τελικά απαιτήσεις σε οξυγόνο οδηγούν στην εμφάνιση αναπνευστικού στρες ενώ παράλληλα προκαλείται και δυσλειτουργία του μηχανισμού ωσμωρύθμισης. Επιπλέον, μειώνεται και ο αυξητικός ρυθμός λόγω μείωσης ή αναστολής της λήψης τροφής και αύξησης του καταβολισμού. Παράλληλα με τις φυσιολογικές προσαρμογές εμφανίζονται και αλλαγές σε βασικές συνιστώσες της συμπεριφοράς, όπως η κατανάλωση τροφής, η κολύμβηση, η συνοχή του κοπαδιού και η προτίμηση για συγκεκριμένα περιβάλλοντα. Επίσης, παρατηρείται και αύξηση στην εγρήγορση και την επαγρύπνηση (Johnson *et al.*, 1992), ενώ η μειωμένη πρόσληψη τροφής και η τάση διαφυγής αποτελούν ίσως τις πρώτες ενδείξεις άμυνας του οργανισμού στο στρεσογόνο παράγοντα. Τελικά, η καταπόνηση επιδρά και στην αναπαραγωγή με

καταστολή έκκρισης αναπαραγωγικών ορμονών, καθυστέρηση ανάπτυξης γονάδων και μειωμένη επιβίωση γαμετών.

Ο κύριος στόχος της πρωτογενούς νευροενδοκρινικής απόκρισης είναι η προετοιμασία του οργανισμού να δράσει προς εξασφάλιση της ομοιόστασης και της επιβίωσής του. Η επιβλαβής και ανεπιθύμητη μόνιμη ενεργοποίηση ενός κατ' ουσία προσαρμοστικού και επωφελούς μηχανισμού δεν μπορεί παρά να θεωρηθεί παράδοξο. Μία εξήγηση για το παράδοξο αυτό βρίσκεται στο ότι η απόκριση στο στρες εξελίχθηκε να αντιμετωπίζει βραχυπρόθεσμες προκλήσεις, αντίθετα με τη φύση των περισσότερων στρεσογόνων παραγόντων που συναντούν οι οργανισμοί σε εργαστηριακές ή σε συνθήκες εντατικής εκτροφής. Υπό τέτοιες συνθήκες, οι οργανισμοί μπορεί να συναντήσουν απειλητικές καταστάσεις ή γεγονότα που δεν είναι εγγενώς θανατηφόρα, αλλά δεν μπορούν να λυθούν σε σύντομο χρόνο ούτε να αποφευχθούν με διαφυγή. Για τα ψάρια, τέτοιο παράγοντες μπορεί να είναι η κακή ποιότητα νερού (Pavlidis *et al.*, 2003), διαχειριστικές πρακτικές, όπως η μεταφορά, μη βέλτιστες πυκνότητες εκτροφής καθώς και οι κοινωνικές σχέσεις/ιεραρχίες. Ο άξονας HPI μπορεί να ενεργοποιείται περιοδικά ή συνεχόμενα για μεγάλες χρονικές περιόδους, οδηγώντας σε χρόνια εκτεταμένη απόκριση στο στρες και τελικά επιβλαβή δράση του στους οργανισμούς (Barton, 2002). Αποτελέσματα που σχετίζονται με χρόνια καταπόνηση ή συχνές εκθέσεις σε έντονα στρεσογόνα γεγονότα περιλαμβάνουν καταστολή της αύξησης, αναπαραγωγική δυσλειτουργία και απώλεια ανοσολογικής ικανότητας που οδηγεί σε ενισχυμένη ευπάθεια σε παθογόνα και παράσιτα (Wendelaar Bonga, 1997).

1.2.4. Μοριακή απόκριση στο στρες

Όπως ήδη περιεγράφηκε, η απόκριση σε έναν στρεσογόνο παράγοντα περιλαμβάνει πρωταρχικά την ταχεία αύξηση των κατεχολαμινών στο πλάσμα και της κορτιζόλης στη συνέχεια (κυρίαρχου γλυκοκορτικοστεροειδούς) (Reid *et al.*, 1998; Mommsen *et al.*, 1999). Η δράση των κατεχολαμινών είναι γρήγορη και έχει σαν αποτέλεσμα την ταχεία αύξηση της γλυκόζης προκειμένου να αποδώσει στον οργανισμό την απαραίτητη ενέργεια. Αντίθετα, η δράση της κορτιζόλης σε συγκεκριμένους ιστούς στόχους είναι πιο αργή και περιλαμβάνει τη σύνθεση πρωτεϊνών που διευκολύνουν την κινητοποίηση και ανακατανομή του ενεργειακού υποστρώματος, συμπεριλαμβανομένης και της αναπλήρωσης των εξαντλημένων αποθεμάτων γλυκογόνου. Οι κατεχολαμίνες δρουν κυρίως σε κυτταρικές διεργασίες μέσω φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης πρωτεϊνικών στόχων. Η δράση της κορτιζόλης από την άλλη είναι κυρίως γενωμική, καθώς επιδρά στη γενετική έκφραση και πρωτεϊνική σύνθεση. Η πλειονότητα των δράσεων της κορτιζόλης επιτυγχάνεται μέσω της γενωμικής σηματοδότησης ενεργοποιώντας τους υποδοχείς γλυκοκορτικοστεροειδών (GR) και αλατοκορτικοστεροειδών (MR) στα ψάρια.

1.3. Γλυκοκορτικοστεροειδής υποδοχέας (GR)

Ο γλυκοκορτικοστεροειδής υποδοχέας (GR) αποτελεί μέρος της υπερκοινογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, μαζί με τον υποδοχέα οιστρογόνων (ER), προγεστερόνης (PR), ανδρογόνων (AR) και αλατοκορτικοστεροειδών (MR) καθώς και υποδοχέων χωρίς κάποιον γνωστό μέχρι τώρα προσδέτη (Germain *et al.*, 2006; Gustafsson, 2016). Η συγκεκριμένη οικογένεια υποδοχέων εμφανίζει ένα μεγάλο εύρος δράσης με πολύ σημαντικές επιπτώσεις στη φυσιολογία των οργανισμών, μεταξύ αυτών στον μεταβολισμό, στην καρδιακή λειτουργία, στην αναπαραγωγή, στην αύξηση καθώς και στο ανοσοποιητικό σύστημα (Chrousos and Kino, 2007). Ως μέλος της συγκεκριμένης υπερκοινογένειας, ο GR αποτελεί έναν εξαρτώμενο από τον προσδέτη μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος ρυθμίζει θετικά ή αρνητικά την έκφραση των γονιδίων που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοστεροειδή (Zhou and Cidlowski, 2005). Τα γονίδια τα οποία ελέγχονται από τη δράση του GR συμμετέχουν κυρίως στη ρύθμιση του μεταβολισμού, όπως στην αύξηση των επιπέδων γλυκόζης, στη γλυκονεογένεση και στην κινητικότητα των λιπαρών οξέων και των αμινοξέων (Newton, 2000).

Από το 1968 που ταυτοποιήθηκε ως ο κύριος υποδοχέας για τη φυσιολογική και φαρμακολογική δράση των γλυκοκορτικοστεροειδών (Munck and Brinck-Johnsen, 1968), έχει αποδειχθεί πως εκφράζεται στο σύνολο των ανθρώπινων ιστών και πως συμμετέχει σε πληθώρα βιολογικών διεργασιών, από την ανάπτυξη και τον μεταβολισμό, μέχρι τον αγγειακό τόνο, τον οστικό σχηματισμό και την εγκεφαλική λειτουργία (Galon *et al.*, 2002; Schoneveld *et al.*, 2004; de Kloet, Joëls and Holsboer, 2005; Whirlledge and DeFranco, 2018). Μέσω του εναλλακτικού ματίσματος του *hGR* γονιδίου προκύπτουν δύο σημαντικές ισομορφές του υποδοχέα, οι GR α και GR β (Duma *et al.*, 2006). Η ισομορφή α εκφράζεται σε όλους σχεδόν τους ανθρώπινους ιστούς και κύτταρα και εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα όπου και αποτελεί ουσιαστικά τον κλασικό γλυκοκορτικοστεροειδή υποδοχέα, ο οποίος δρα ως μεταγραφικός παράγοντας εξαρτώμενος από τον προσδέτη. Η ισομορφή β , αν και αυτή εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, εντοπίζεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από την α , με εξαίρεση τα επιθηλιακά κύτταρα και τα ουδετερόφιλα. Σε αντίθεση με την α , παραμένει κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων ανεξαρτήτως της παρουσίας προσδετών, καθώς δεν προσδένεται σε γλυκοκορτικοστεροειδή, δεν ενεργοποιεί γονίδια που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοστεροειδή και ασκεί κυρίαρχη αρνητική επίδραση στη μεταγραφική δραστηριότητα της ισομορφής α (Oakley *et al.*, 1999).

Στην ανενεργή του μορφή, ο GR εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα σε ένα μακρομοριακό πρωτεϊνικό σύμπλοκο, το οποίο περιλαμβάνει μεταξύ άλλων θερμοεπαγώμενες πρωτεΐνες (HSPs 90, 70 & 50) και ανοσοφιλίνες (Pratt, 1993). Με την πρόσδεση των γλυκοκορτικοστεροειδών και την ενεργοποίησή του, ο υποδοχέας αποσυνδέεται από το πρωτεϊνικό σύμπλοκο και μετακινείται στον

πυρήνα (Pratt, 1993), όπου επιδρά στη γενετική έκφραση (Chatzopoulou *et al.*, 2015). Εντός του πυρήνα, ο υποδοχέας προσδένεται ως ομοδιμερές στις αλληλουχίες που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοστεροειδή (GREs) των γονιδίων στόχων και ρυθμίζει είτε θετικά είτε αρνητικά την έκφρασή τους. Η θετική ή αρνητική ρύθμιση εξαρτάται από την αλληλουχία GRE και το πλαίσιο του υποκινητή (Bamberger *et al.*, 1996). Επιπλέον, ο GR μπορεί να ρυθμίσει τη γονιδιακή έκφραση ανεξαρτήτως της πρόσδεσής του σε GREs, μέσω της φυσικής του αλληλεπίδρασης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (Kino and Chrousos, 2002).

Το σύστημα των γλυκοκορτικοστεροειδών υποδοχέων στους τελεόστεους εμφανίζει σημαντική ομολογία με αυτό των θηλαστικών. Ο GR αποτελεί τον πρωταρχικό υποδοχέα της γλυκοκορτικοστεροειδούς δράσης στους τελεόστεους και έχει αποδειχθεί πλέον πως και σε αυτούς εκφράζεται σε κάθε ιστό (Ducouret *et al.*, 1995). Για πρώτη φορά εντοπίστηκε και αλληλουχήθηκε στην ιριδίζουσα πέστροφα και από τότε η αλληλούχησή του έχει ολοκληρωθεί σε πολλά ακόμα είδη ιχθύων, μεταξύ αυτών στο λαβράκι [*Dicentrarchus labrax*; (Terova *et al.*, 2005)], τσιπούρα [*Sparus aurata*; (Acerete *et al.*, 2007; Tsalafouta *et al.*, 2018)] και κυπρίνο [*Cyprinus carpio*; (Stolte *et al.*, 2008)]. Ενώ σε όλα τα είδη των τελεόστεων ιχθύων εντοπίζονται δύο γονίδια (*gr1*, *gr2*) τα οποία κωδικοποιούν τον GR, το zebrafish όπως και ο άνθρωπος, έχει ένα μόνο γονίδιο για τον GR στο γονιδιώμα του. Εμφανίζονται και στο zebrafish δύο ισομορφές του GR, οι zGr α και zGr β , με τον β να εμφανίζει υψηλή ομοιότητα με τον ανθρώπινο β , τόσο στη δομή όσο και στο επίπεδο έκφρασης (Schaaf *et al.*, 2008). Αν και οι δύο αυτές ισομορφές φαίνεται να έχουν εξελιχθεί ανεξάρτητα, όπως υποδηλώνουν η γονιδιακή οργάνωση και τα γεγονότα συναρμογής, η παρατηρούμενη ομοιότητα καθιστά το zebrafish ένα εξαιρετικό μοντέλο για τη μελέτη της λειτουργίας του GR στα σπονδυλωτά, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου (Schaaf *et al.*, 2008; Alsop and Vijayan, 2009).

Όπως και στα θηλαστικά, έτσι και στους τελεόστεους τα γλυκοκορτικοστεροειδή ασκούν την ευρεία δράση τους στους ιστούς - στόχους όχι μόνο μέσω γενωμικών μηχανισμών, αλλά και μέσω μη γενωμικής σηματοδότησης. Το μονοπάτι γενωμικής σηματοδότησης περιλαμβάνει τη μεταφορά της κορτιζόλης μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και την πρόσδεσή της στους ενδοκυττάριους υποδοχείς, οι οποίοι θα ρυθμίσουν τη γονιδιακή μεταγραφή και μετάφραση είτε θετικά είτε αρνητικά (Bury *et al.*, 2003; Prunet *et al.*, 2006; Faught and Vijayan, 2016). Καθώς επιτυγχάνεται μεταβολή της κυτταρικής λειτουργίας μέσω *de novo* πρωτεϊνικής σύνθεσης, η γενωμική σηματοδότηση των γλυκοκορτικοστεροειδών αποτελεί μία πιο αργή απόκριση (κάποια λεπτά έως και ώρες), η οποία όμως χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη διάρκεια (Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen *et al.*, 1999). Παρ' όλα αυτά, τα γλυκοκορτικοστεροειδή ασκούν και επιδράσεις οι οποίες δεν προϋποθέτουν μεταβολή στην έκφραση των γονιδίων (Lösel and Wehling, 2003). Οι κυτταρικές αποκρίσεις που αποτελούν κομμάτι της μη γενωμικής σηματοδότησης αποτελούν μία ταχεία διαδικασία

(δευτερόλεπτα έως λεπτά), στην οποία συμμετέχουν πολλοί μηχανισμοί που επιδρούν σε δευτερογενή σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως αυτό του Ca^{2+} και των πρωτεϊνικών κινασών (Borski *et al.*, 2002).

Η πλειονότητα των δράσεων που σχετίζονται με την κορτιζόλη στα ψάρια θεωρείται πως ρυθμίζονται μέσω της γενωμικής σηματοδότησης του κυτταροπλασματικού GR. Η έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες καθώς και η χορήγηση κορτιζόλης σε ιχθύες αυξάνουν τα επίπεδα μεταγραφής του *gr* (Prunet *et al.*, 2006; Bury and Sturm, 2007; Stolte *et al.*, 2008; Vijayan *et al.*, 2010), απόκριση η οποία ενδέχεται να αποτελεί άμεση συνέπεια των αυξημένων επιπέδων κορτιζόλης καθώς και της σχετικής ενεργοποίησης του μεταφραστικού μηχανισμού για τον GR (Sathiyaa and Vijayan, 2003). Παράλληλα όμως, η παρατεταμένη διέγερση με κορτιζόλη έχει φανεί πως προκαλεί και σημαντική μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης του Gr (Sathiyaa and Vijayan, 2003). Το γεγονός πως η αύξηση των επιπέδων μεταγραφής του *gr*, συμπίπτει με τη μείωση της πρωτεϊνικής έκφρασης του υποδοχέα, υποδεικνύει μία λειτουργία αυτορρύθμισης του υποδοχέα από την κορτιζόλη (Vijayan *et al.*, 2010). Ο μηχανισμός που έχει προταθεί για την αυτορρύθμιση του υποδοχέα είναι εκείνος της πρωτεασωμικής αποικοδόμησης (Sathiyaa and Vijayan, 2003). Πειράματα στην πέστροφα έδειξαν πως το πρωτεάσωμα ενδέχεται να συμμετέχει στη ρύθμιση του GR, καθώς και στη σύνθεσή του (Sathiyaa and Vijayan, 2003). Εξάλλου, η έκφραση του GR σε ιστούς-στόχους μπορεί να ρυθμίζεται στενά από έναν μηχανισμό αρνητικής ανάδρασης, δεδομένου πως ο υποδοχέας είναι τόσο σημαντικός για ένα μεγάλο εύρος λειτουργιών. Σε ό,τι αφορά τη μη γενωμική δράση των γλυκοκορτικοστεροειδών, η έρευνα που έχει διεξαχθεί στους τελεόστεους είναι περιορισμένη. *In vitro* πειράματα σε δείγματα ιστών τιλάπιας (*Oreochromis mossambicus*), έδειξαν πως η κορτιζόλη εμπόδισε την αύξηση του cAMP και μείωσε τη συγκέντρωση του Ca^{2+} εντός λίγων μόνο λεπτών χορήγησής της (Borski *et al.*, 1991). Το ερώτημα όμως εάν η μη γενωμική δράση των γλυκοκορτικοστεροειδών επιτυγχάνεται μέσω δράσης των γλυκοκορτικοστεροειδών υποδοχέων στις κυτταρικές μεμβράνες ή μέσω άλλων υποδοχέων και μηχανισμών μένει ακόμα να απαντηθεί.

1.4. Αλατοκορτικοστεροειδής υποδοχέας (MR)

Τα κορτικοστεροειδή δεσμεύονται σε δύο υποδοχείς στον εγκέφαλο, τον αλατοκορτικοστεροειδή υποδοχέα (MR) και τον GR, υποδοχείς οι οποίοι λειτουργούν συμπληρωματικά προκειμένου να ρυθμίσουν τη δραστηριότητα του άξονα HPA. Τα αλατοκορτικοστεροειδή, όπως υποδηλώνει και η ονομασία τους, είναι επινεφριδικά στεροειδή με κύρια δράση τη ρύθμιση της ισορροπίας των ηλεκτρολυτών. Ο MR ανήκει στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων για τις στεροειδείς/θυρεοειδικές/ρετινοειδείς ορμόνες αλλά και των ορφανών υποδοχέων. Σε αντίθεση με τον GR, ο οποίος εκφράζεται σε όλο το σώμα, ο MR εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα του νεφρού,

τμήματος του παχέος εντέρου και των σιελογόνων και ιδρωτοποιών αδένων. Πέρα από τα επιθηλιακά κύτταρα, ο MR έχει βρεθεί και σε μη επιθηλιακά κύτταρα καρδιάς και αγγείων. Ενώ ο GR εκφράζεται σε μία μεγάλη έκταση του εγκεφαλικού ιστού, ο MR εκφράζεται κυρίως στις μεταιχμιακές περιοχές του εγκεφάλου, όπως ο υποκάμπος και η αμυγδαλή (Seckl *et al.*, 1991).

Στα θηλαστικά, ο MR δεν αποκρίνεται μόνο στα αλατοκορτικοστεροειδή, αλδοστερόνη και δεοξυκορτικοστερόνη, αλλά και στο γλυκοκορτικοστεροειδές κορτιζόλη (Fuller and Young, 2009). Στην κυτταροπλασματική του εκδοχή, η ενεργοποίησή του με την πρόσδεση των αλατοκορτικοστεροειδών ή γλυκοκορτικοστεροειδών οδηγεί στη δημιουργία ενός συμπλόκου το οποίο εισέρχεται στον πυρήνα και αλληλεπιδρά με ρυθμιστικά στοιχεία του DNA, μεταβάλλοντας την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων και δρώντας ως μεταφραστικός παράγοντας. Τελευταία δεδομένα δείχνουν πως ο MR συμμετέχει και σε ταχείες μη γενωμικές δράσεις (Henckens *et al.*, 2011; van Ast *et al.*, 2013). Εξάλλου, το γεγονός πως η κορτιζόλη ασκεί την επίδρασή της στις γνωσιακές και συναισθηματικές λειτουργίες του οργανισμού την πρώτη κιάλας ώρα χορήγησής της, μπορεί να εξηγηθεί μόνο με την ύπαρξη ενός μηχανισμού ταχείας μη γενωμικής δράσης (Joëls *et al.*, 2012). Ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει αλατοκορτικοστεροειδείς υποδοχείς οι οποίοι βρίσκονται προσδεμένοι στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα εάν διαφορετικές φαρμακευτικές ουσίες έχουν και διαφορετική συγγένεια για τους δύο τύπους υποδοχέων, τους μεμβρανικούς και τους πυρηνικούς. Αυτό όμως που είναι γνωστό, είναι πως ο μεμβρανικός MR έχει 10 φορές χαμηλότερη συγγένεια με την κορτιζόλη συγκρινόμενος με τον πυρηνικό υποδοχέα. Επομένως, ο μεμβρανικός MR θα είναι δεσμευμένος κατά τη διάρκεια υψηλών επιπέδων κορτιζόλης ή μετά από φαρμακευτική διέγερση. Είναι πιθανό πως ο MR έχει κι άλλες λειτουργίες πέρα από τη βασική αναστολή της δραστηριότητας του άξονα HPA, κάτι το οποίο οδηγεί στην υπόθεση πως είναι σημαντικός στην αρχική φάση της απόκρισης στο στρες.

Στα θηλαστικά, ο MR παρουσιάζει όμοια χημική συγγένεια ως προς τη δέσμευση της αλδοστερόνης και της κορτιζόλης. Επιπλέον, η συγκέντρωση της κορτιζόλης στο πλάσμα είναι 100 - 1.000 φορές υψηλότερη από εκείνη της αλδοστερόνης και προκειμένου να δράσει η αλδοστερόνη είναι απαραίτητο να προσδεθεί στον MR. Επομένως, προκύπτει το ερώτημα πώς εξασφαλίζεται η σύνδεσή της στον συγκεκριμένο υποδοχέα αφού δεν υπάρχει ούτε μεγαλύτερη χημική συγγένεια ούτε τα επίπεδα της συγκέντρωσής της στο αίμα είναι υψηλότερα της κορτιζόλης; Η σύνδεση της αλδοστερόνης στον MR εξασφαλίζεται μέσω του ενζύμου 11β-υδροξυστεροειδικής αφυδρογονάσης τύπου 2 (11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, 11β-HSD2). Το ένζυμο αυτό μετατρέπει την κορτιζόλη σε αδρανή κορτιζόνη (χωρίς όμως να επιδρά στην αλδοστερόνη) και έτσι εξασφαλίζεται η υψηλή συγγένεια του MR με την αλδοστερόνη. Οι ιστοί - στόχοι της αλδοστερόνης, όπως τα επιθηλιακά κύτταρα, η ουροδόχος κύστη, ο γαστρεντερικός σωλήνας, οι ιδρωτοποιοί και σιελογόνοι

αδένες, το αγγειακό ενδοθήλιο, το τοίχωμα των αγγείων και ο πυρήνας της μονήρους δεσμίδας (NTS) εκφράζουν σε υψηλές συγκεντρώσεις το ένζυμο ως μέσο εξειδίκευσης στην αλδοστερόνη (Gomez-Sanchez and Gomez-Sanchez, 2012). Στους συγκεκριμένους ιστούς ο υποδοχέας ενεργοποιείται μόνο μέσω των αλατοκορτικοστεροειδών. Αντιθέτως, σε ιστούς στους οποίους το ένζυμο 11β-HSD2 απουσιάζει, όπως ο εγκέφαλος και τα μυοκύτταρα, φαίνεται πως ο MR ενεργοποιείται από τα γλυκοκορτικοστεροειδή (Williams and Williams, 2003).

Η αλδοστερόνη έχει υποτεθεί πως αποτέλεσε την ορμόνη κλειδί για τη μετάβαση των οργανισμών από το νερό στη στεριά. Η συμμετοχή της στη διαχείριση του νατρίου και του καλίου θεωρείται πως διευκόλυνε εξελικτικά τη φυλογενετική μετάβαση από τους υδρόβιους στους χερσαίους οργανισμούς (Colombo *et al.*, 2006). Αν και η αλδοστερόνη απουσιάζει από τους τελεόστεους (Funder., 1997), το ένζυμο 11β-HSD2 κατέχει έναν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της βιοδιαθεσιμότητας της κορτιζόλης στα ψάρια. Το συγκεκριμένο ένζυμο ρυθμίζει τα επίπεδα κορτιζόλης στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια του zebrafish (Alsop and Vijayan, 2008), ενώ ελέγχει και την ενσωμάτωση της μητρικής κορτιζόλης στην λέκιθο κατά το στάδιο της ωογένεσης στην πέστροφα (Li *et al.*, 2012).

Τα τελευταία χρόνια μεγάλος αριθμός ερευνών έχει εστιάσει στον MR, με αποτέλεσμα την κλωνοποίηση και αλληλούχησή του σε πολλά είδη ιχθύων, μεταξύ αυτών στην ιριδίζουσα πέστροφα (Colombe *et al.*, 2000), zebrafish (Alsop and Vijayan, 2008) και κυπρίνο (Stolte *et al.*, 2008). Εντούτοις, δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως οι μηχανισμοί δράσης του συγκεκριμένου υποδοχέα στη φυσιολογία των ιχθύων και πιο συγκεκριμένα στην ιοντική ρύθμιση (McCormick *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2013). Εκφράζεται ευρέως στους ιστούς των ιχθύων, με την 11-δεοξυκορτικοστερόνη να έχει προταθεί ως μόριο αγωνιστής του MR (Milla *et al.*, 2008; Stolte *et al.*, 2008; Pipral *et al.*, 2011). Σε αντίθεση με τον GR, τα περισσότερα είδη τελεόστεων, συμπεριλαμβανομένου και του zebrafish, έχουν έναν MR. Γεγονός το οποίο υποδηλώνει πως ο δεύτερος υποδοχέας που θα έπρεπε να υπάρχει ως αποτέλεσμα του διπλασιασμού του γονιδιώματος, έχει χαθεί (Alsop and Vijayan, 2008).

Σε σύγκριση με όσα γνωρίζουμε για τη δράση της κορτιζόλης μέσω του GR, η εικόνα που έχουμε σχηματίσει για τον μηχανισμό ρύθμισης της δράσης της κορτιζόλης μέσω του MR παραμένει περιορισμένη (Takahashi and Sakamoto, 2013). Τα δεδομένα μέχρι τώρα δείχνουν πως η κορτιζόλη ασκεί στους ιχθύες διπλό ρόλο, τόσο ως κορτικοστεροειδές όσο και ως αλατοκορτικοστεροειδές και κάποιες από τις δράσεις της ενδέχεται να ρυθμίζονται μέσω του MR στους ιστούς όπου η διατήρηση της ωσμωτικής ρύθμισης είναι κρίσιμη (Kiilerich *et al.*, 2007; McCormick *et al.*, 2008; Kelly and Chasiotis, 2011; Takahashi and Sakamoto, 2013). Πρόσφατες *in vitro* έρευνες δείχνουν πως οι GR και MR δρουν συνεργατικά για τη ρύθμιση του μεταφραστικού ελέγχου, σχηματίζοντας την υπόθεση πως και οι δύο υποδοχείς μπορεί να εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόκρισης στην κορτιζόλη σε

συγκεκριμένους ιστούς στόχους (Kiilerich *et al.*, 2015). Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται και από την παρατήρηση πως οι δύο υποδοχείς εκφράζονται στους περισσότερους ιστούς των ψαριών (Aruna *et al.*, 2012).

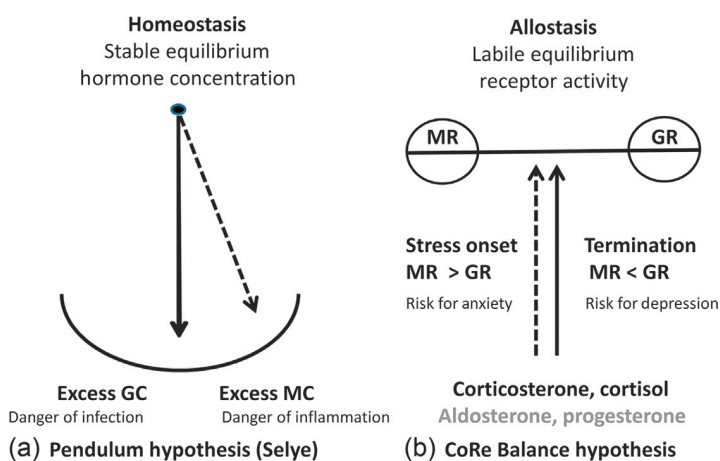
Ο MR έχει προταθεί πως εμπλέκεται στη ρύθμιση της αρνητικής ανάδρασης της κορτιζόλης υπό συνθήκες καταπόνησης στα ψάρια (Alderman and Vijayan, 2012; Alderman *et al.*, 2012), καθώς και σε συγκεκριμένες εκφάνσεις της συμπεριφοράς (Manuel *et al.*, 2014, 2015). Επιπλέον, έχει προταθεί η εμπλοκή του στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια του zebrafish (Alsop and Vijayan, 2008; Nesan and Vijayan, 2013). Ακόμα και αν ο ρόλος του MR και οι ουσίες που δεσμεύονται και ρυθμίζουν την απόκριση και τα γονίδια στόχοι που επηρεάζονται από αυτόν είναι άγνωστα, τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν πως η κορτιζόλη αποτελεί τον βασικό ρυθμιστή της δράσης του MR στους τελεόστεους.

1.5. Υπόθεση ισορροπίας MR:GR

Η υπόθεση ισορροπίας των MR:GR είναι κρίσιμη για την κατανόηση του ρόλου των δύο υποδοχέων στην αντιμετώπιση του στρες, την προσαρμογή και την αντιστάθμιση (recovery). Σύμφωνα με αυτή, μία ανισορροπία στα μεταιχμιακά - φλοιώδη σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχονται από την αναλογία MR:GR διακυβεύει την έναρξη ή/και διαχείριση της απόκρισης στο στρες (de Kloet, 1991). Η ανισορροπία αυτή μπορεί να οδηγήσει σε απορρύθμιση του HPA άξονα και προβληματική συμπεριφορική προσαρμογή, συνθήκες οι οποίες τελικά καθιστούν τον οργανισμό πιο ευάλωτο σε νευροεκφύλιση και ψυχικές διαταραχές που προκαλούνται από το στρες (de Kloet *et al.*, 1998). Η υπόθεση ορίζει πως σε περίπτωση ανισορροπίας των δράσεων των δύο υποδοχέων, το άτομο αδυνατεί να διατηρήσει την ομοιόστασή του όταν εκτεθεί σε κάποιο στρεσογόνο ερέθισμα ή απειλή. Έχει τις ρίζες της στην υπόθεση του εκκρεμούς (pendulum hypothesis) του Selye, σύμφωνα με την οποία τα γλυκοκορτικοστεροειδή και τα αλατοκορτικοστεροειδή είναι ανταγωνιστικές προσαρμοστικές ορμόνες (Selye, 1952). Ως εκ τούτου, αυξημένα επίπεδα αλατοκορτικοστεροειδών προδιαθέτουν το άτομο σε φλεγμονή και υπέρταση, ενώ αυξημένα επίπεδα γλυκοκορτικοστεροειδών αυξάνουν το ρίσκο μόλυνσης. Η συγκεκριμένη υπόθεση εστίαζε στη διατήρηση μίας σταθερής ισορροπίας ή ομοιόστασης. Αντιθέτως, η υπόθεση ισορροπίας των MR:GR υιοθετεί τον όρο της αλλόστασης και κρατάει σαν άξονα την «ευμετάβλητη» ισορροπία στη δραστηριότητα των υποδοχέων (**Εικόνα 1.1**).

Σύμφωνα λοιπόν με την υπόθεση ισορροπίας MR:GR, οι δύο υποδοχείς λειτουργούν συμπληρωματικά ώστε να ελέγξουν την προσαρμογή στις περιβαλλοντικές απαιτήσεις. Ένα στρεσογόνο ερέθισμα, ενεργοποιεί τα κεντρικά και περιφερειακά τμήματα του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Σε αυτό το πλαίσιο, ο ενεργοποιημένος MR ρυθμίζει τις διαδικασίες εκτίμησης (appraisal) μέσω των μεταιχμιακών δομών και ανακαλεί την αποθηκευμένη πληροφορία

προκειμένου να πάρει κρίσιμες αποφάσεις σχετικές με την απόκριση σε αυτό το ερέθισμα. Επιπλέον, συμμετέχει στις συναισθηματικές αποκρίσεις φόβου και επιθετικότητας. Με την αύξηση στη συγκέντρωση των ορμονών, τα ενεργειακά αποθέματα αναδιανέμονται μέσω της δράσης του GR, ώστε να επιτευχθεί προσαρμογή και αντιστάθμιση, καθώς και αποθήκευση της εμπειρίας στη μνήμη (de Kloet, 2014). Η συγκεκριμένη υπόθεση τελικά υποδηλώνει πως για κάποιες λειτουργίες οι MR και GR δρουν ανεξάρτητα, για άλλες όπως η συναισθηματική έκφραση, συνεργάζονται, ενώ για δράσεις όπως η έναρξη και η καταστολή της στρεσογόνου απόκρισης φαίνεται πως δρουν ανταγωνιστικά.



Εικόνα 1.1 | (a) Η υπόθεση εκκρεμούς του Selye, (b) η υπόθεση ισορροπίας MR:GR (από de Kloet, 2016).

1.6. Zebrafish

Η πρώτη περιγραφή του *Danio rerio* έγινε το 1822 από τον χειρουργό Francis Hamilton στη μελέτη του για τους ιχθύες του ποταμού Γάγγη, στην οποία συμπεριέλαβε 10 είδη του γένους *Danio* (Spence *et al.*, 2008). Το όνομα *Danio* προέρχεται από τη λέξη “*dhani*” που σημαίνει “από τον ορυζώνα” (Rainboth, 1994). Η κοινή ονομασία του είδους, zebrafish, φαίνεται πως προέκυψε από τις χαρακτηριστικές ρίγες του σώματός του. Αν και η εισαγωγή τους στην Ευρώπη έγινε το 1905 για εμπόριο σε ενυδρεία, η επιστημονική κοινότητα ξεκίνησε τη χρήση τους για πειράματα και εκπαιδευτικούς σκοπούς μόλις το 1930 (Creaser, 1934). Η χρήση του ως ζωικός οργανισμός μοντέλο καθιερώθηκε ύστερα από τα πρωτοποριακά πειράματα του Dr. George Streisinger στο Πανεπιστήμιο του Όρεγκον, ο οποίος εφάρμοσε τεχνικές που μέχρι πρότινος χρησιμοποιούνταν μόνο στα ασπόνδυλα (Streisinger *et al.*, 1981). Σκοπός των συγκεκριμένων πειραμάτων ήταν η μελέτη της γενετικής της ανάπτυξης των σπονδυλωτών και από τότε το είδος χρησιμοποιήθηκε ευρέως ως μοντέλο σε πειράματα Αναπτυξιακής Βιολογίας.

Η ταξινόμηση του είδους είναι η ακόλουθη:

Φύλο	Χορδωτά
Κλάση	Οστεϊχθύες
Υποκλάση	Τελεόστεοι
Υπερομοταξία	Ακτινοπτερύγιοι (Actinopterygii)
Οικογένεια	Κυπρινοειδή (Cyprinidae)
Γένος	<i>Danio</i>
Είδος	<i>Danio rerio</i>

Έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 20 είδη του γένους *Danio*, κατανεμημένα στη Νότια και Νοτιοανατολική Ασία, με τη μεγαλύτερη ποικιλότητα ειδών να εντοπίζεται στην Ινδία, Μπαγκλαντές και Μιανμάρ (Barman, 1991). Αν και αρχικά το *D. rerio* προστέθηκε στο υπογένος του *Brachydanio*, το 1991 ο Barman ταύτισε ταξινομικά τις δύο ομάδες. Το 2003 όμως, το γένος *Danio* χωρίστηκε στα *Devario* και *Danio*, με το τελευταίο να περιλαμβάνει και το είδος του zebrafish (Fang, 2003). Ως ψάρι του γλυκού νερού, το zebrafish ανήκει στην οικογένεια των Κυπρινοειδών, την πολυάριθμη σε είδη οικογένεια των σπονδυλωτών (Nelson, 1994).

1.6.1 Φυσική Ιστορία

Το φυσικό εύρος ενδιαίτηματος του zebrafish περιλαμβάνει τις περιοχές γύρω από τις λεκάνες απορροής των ποταμών Γάγγη και Βραχμαπούτρα στη βορειοανατολική Ινδία, Μπαγκλαντές και Νεπάλ (Engeszer *et al.*, 2007) (**Εικόνα 1.2**). Οι λεκάνες απορροής των ποταμών αποτελούν περιοχές που κατακλύζονται περιοδικά από την πλευρική υπερχειλίση των ποταμών και τις άμεσες βροχοπτώσεις. Το εύρος της γεωγραφικής κατανομής του zebrafish δείχνει πως αποτελεί ένα είδος καλά προσαρμοσμένο σε αυτό το διαρκώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον (Spence *et al.*, 2008). Εξάλλου το zebrafish έχει εντοπιστεί σε μία μεγάλη ποικιλία οικοτόπων, από παραποτάμιες πεδιάδες, λίμνες, ρηχές λεκάνες και έλη, μέχρι κανάλια ύδρευσης και ορυζώνες (Spence *et al.*, 2006; Engeszer *et al.*, 2007; Arunachalam *et al.*, 2013).



Εικόνα 1.2| Γεωγραφική εξάπλωση του είδους *Danio rerio*. Το zebrafish εντοπίζεται στους πρόποδες της Βόρειας Οροσειράς, την Ινδική-Γαγγετική πεδιάδα και την Ινδική Χερσόνησο (εικόνα από Lee *et al.*, 2020).

Κατά τη διάρκεια των μουσώνων οι κοίτες των ποταμών κατακλύζονται από νερό πλούσιο σε θρεπτικά, οδηγώντας σε ταχεία αύξηση των μικροοργανισμών και μακροφυκών, αύξηση των πληθυσμών των ασπόνδυλων και συγκέντρωση ιζήματος από τη νεκρή βλάστηση και το φυτοπλαγκτόν. Τα ψάρια τείνουν να ακολουθούν την επεκτεινόμενη άκρη του νερού και τις πλημμυρισμένες περιοχές, οι οποίες έχουν εμπλουτιστεί με θρεπτικά και αποτελούν κατάλληλες περιοχές γέννησης για προνύμφες και νεαρά ψάρια. Με τη λήξη των μουσώνων, τα επίπεδα νερού αρχίζουν να υποχωρούν, η βλάστηση περιορίζεται, όπως και η παροχή φαγητού και τα ενήλικα και νεαρά ψάρια αρκετών ειδών μεταναστεύουν από τις κοίτες των ποταμών σε κανάλια, ποτάμια και άλλες μόνιμες υδατοσυλλογές.

Τα zebrafish την περίοδο των μουσώνων μεταναστεύουν από τα ποτάμια και τα κανάλια στις πλημμυρισμένες περιοχές όπου και αναπαράγονται (Engeszer *et al.*, 2007). Γεννούν τα αυγά τους σε ρηχά νερά κατά τους μουσώνες και το γεγονός πως έχουν μικρό μέγεθος, ταχεία ανάπτυξη και γρήγορη σεξουαλική ωρίμανση τους επιτρέπει να αναπαράγονται και να διασκορπίζονται όσο ακόμα οι συνθήκες είναι ιδανικές και η τροφή άφθονη. Ο χρόνος που περνούν σε αυτά τα ενδιαιτήματα καθώς και οι παράγοντες που επηρεάζουν τη συμπεριφορά μετανάστευσης είναι ακόμα άγνωστοι σε

εμάς. Την περίοδο του χειμώνα όπου οι ορυζώνες και οι εποχικά πλημμυρισμένες περιοχές είναι (εντελώς ή μερικώς) ξηρές, τα zebrafish ζουν σε λίμνες και παραποτάμια ρεύματα (Das, 2002). Το zebrafish, καθώς είναι ένα πολύ καλά προσαρμοσμένο είδος, δεν απαντάται σε φυσικούς μόνο υδροβιότοπους, αλλά και σε τεχνητά - ανθρωπογενή περιβάλλοντα, όπως κανάλια και ορυζώνες.

Τα τυπικά ενδιαιτήματα του είδους χαρακτηρίζονται από στάσιμα νερά (Spence *et al.*, 2006), αλλά και από αργή έως μέτρια ροή νερού, με τη μεγαλύτερη ταχύτητα ροής νερού στην οποία έχουν εντοπιστεί να είναι 18 cm s^{-1} (Suriyampola *et al.*, 2015). Ιδανικά φαίνεται να προτιμούν αργή ροή νερού σε ρηχά νερά, ενώ απουσιάζουν από περιβάλλοντα με ταχεία ροή νερού (Arunachalam *et al.*, 2013). Έχουν εντοπιστεί σε νερά με βάθος από 5 cm (Suriyampola *et al.*, 2015) μέχρι και 1 m (Spence *et al.*, 2006). Συμπεριφορικές παρατηρήσεις της κάθετης κατανομής τους δείχνουν πως καταλαμβάνουν ολόκληρη σχεδόν τη στήλη του νερού. Το εύρος ανοχής τους στην ταχύτητα ροής και στο βάθος του νερού είναι στενότερο συγκριτικά με άλλες περιβαλλοντικές παραμέτρους του ενδιαιτήματός τους, όπως ο τύπος του υποστρώματος και η παρουσία ή μη βλάστησης.

Το υπόστρωμα ποικίλλει πολύ στα φυσικά τους περιβάλλοντα και κυμαίνεται από λασπώδες μέχρι αμμώδες, βοτσαλωτό ακόμα και βραχώδες. Η φύση του υποστρώματός τους διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή τους. Συγκεκριμένα, τα zebrafish γεννούν νωρίς το πρωί, επιλέγοντας να απελευθερώσουν τα αυγά τους σε υπόστρωμα μορφής χαλικιού, όπου προστατεύονται από θηρευτές και η ενδιάμεση απόσταση που προκύπτει μέσω των πετρών, εξασφαλίζει την οξυγόνωση των αυγών.

Η βλάστηση κυμαίνεται από καθόλου έως πολύ πλούσια. Στη φύση βρίσκονται σε περιβάλλοντα με υδρόβια βλάστηση, κρίσιμη για την επιβίωση των προνυμφών αλλά και πηγή φαγητού για προνύμφες και νεαρά. Εξάλλου, η εναπόθεση των αυγών γίνεται σε ρηχά νερά με παρουσία βλάστησης. Προνύμφες στα πρώτα στάδια της εκκόλαψης κινούνται συνεχώς στο υπόστρωμα μέχρι να εντοπίσουν μία επιφάνεια, όπως πέτρα ή φυτό, στην οποία θα προσκολληθούν. Αυτό επαναλαμβάνεται μέχρι να φτάσουν στην επιφάνεια του νερού όπου φουσκώνουν τη νηκτική τους κύστη και γίνονται ελεύθεροι κολυμβητές. Γενικά φαίνεται να παρουσιάζουν ισχυρή προτίμηση για ρηχές περιοχές με άφθονη βλάστηση (Engeszer *et al.*, 2007; Spence *et al.*, 2007).

Τα zebrafish απουσιάζουν από μεγάλους ποταμούς ενδεχομένως εξαιτίας της παρουσίας θηρευτών και ανταγωνισμού, αλλά και λόγω απουσίας κατάλληλης τροφής και αναπαραγωγικών περιοχών. Η απειλή θηρευτών ασκεί μία επιπλέον πίεση προς νερά ρηχά με σχετικά περίπλοκα ενδιαιτήματα (Jackson *et al.*, 2001). Τέτοιοι οικότοποι αποτελούν ανά περιόδους μέρη πιο θολά και ευτροφικά, στα οποία μεγάλα ψάρια και ιχθυοφάγα είδη δεν μπορούν να επιβιώσουν (Shields and Knight, 2013; Voichick *et al.*, 2018). Οι ορυζώνες προσφέρουν ρηχά νερά, άφθονο νερό και απουσία μεγάλων θηρευτών. Έχει προταθεί πως η παρουσία τους στις καλλιέργειες ρυζιού βοηθάει και τους

αγρότες καθώς μειώνουν την ανάγκη εντομοκτόνων και λιπασμάτων χωρίς όμως να μειώνεται η παραγωγικότητα της καλλιέργειας (Lansing and Kremer, 2011).

Η προτίμησή τους στα ρηχά περιβάλλοντα ενισχύεται από τα ευρεία όρια ανοχής τους στη θερμοκρασία και τα συνεχώς μεταβαλλόμενα επίπεδα οξυγόνου, που χαρακτηρίζουν ένα τέτοιο περιβάλλον (Miranda, 2011). Αποτελεί ένα ευρύθερμο είδος (Cortemeglia and Beitinger, 2005), με το ακριβές εύρος θερμοκρασιών στη φύση να είναι ακόμα άγνωστο καθώς έχει εντοπιστεί σε περιοχές με θερμοκρασία από 12°C στα βουνά της βορειοανατολικής Ινδίας (Arunachalam *et al.*, 2013), μέχρι και 39°C στην Ορίσσα της Ανατολικής Ινδίας (Engeszer *et al.*, 2007). Εργαστηριακές έρευνες έχουν δείξει πως τα αγρίου τύπου ενήλικα επιβιώνουν σε εύρος θερμοκρασιών από $6.2 \pm 0.28^\circ\text{C}$ έως και $41.7 \pm 0.35^\circ\text{C}$ (Cortemeglia and Beitinger, 2005). Άγρια zebrafish ζουν σε pH από 5.9 (Engeszer *et al.*, 2007) μέχρι 9.8 (Arunachalam *et al.*, 2013), ενώ εργαστηριακοί πληθυσμοί zebrafish επιβιώνουν σε νερό οξύτητας έως και 4 (Kwong *et al.*, 2014), χωρίς όμως να έχει αξιολογηθεί η αναπαραγωγική τους ικανότητα σε τέτοιες οριακές τιμές. Το είδος θεωρείται στενόαλο, με ανεκτικότητα σε πολύ χαμηλή αλατότητα, όμως έχει εντοπιστεί σε φυσικά περιβάλλοντα μέχρι και 0.6 g L^{-1} , μέτρηση η οποία υποδηλώνει πως μπορούν να προσαρμόσουν την ωσμωρύθμισή τους σε υψηλότερη αλατότητα. Τέλος, παρουσιάζουν και μεγάλο εύρος στην ανοχή υψόμετρου, από 14 m στην Ανατολική Ινδία (Engeszer *et al.*, 2007) μέχρι 1.576 m στα βουνά της Βορειοανατολικής Ινδίας (Arunachalam *et al.*, 2013).

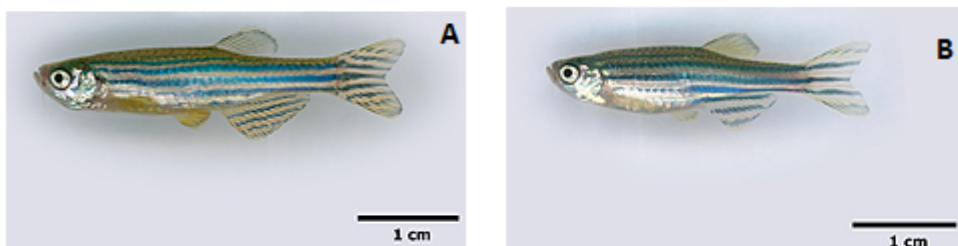
1.6.2. Εκτροφή του zebrafish σε εργαστηριακές συνθήκες

Αν και όπως αναφέρθηκε, τα zebrafish μπορούν να ανεχτούν ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, μία ευρέως χρησιμοποιημένη και προτεινόμενη θερμοκρασία, σε εργαστηριακές συνθήκες είναι αυτή των 28°C (Westerfield, 2000). Σχετικά με την ένδειξη του διαλυμένου οξυγόνου στο νερό (DO), η τιμή $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ θεωρείται ως η βέλτιστη. Ο φωτισμός είναι πολύ σημαντικός για τις φυσιολογικές και ιδιαίτερα τις αναπαραγωγικές διαδικασίες του είδους. Στις εργαστηριακές εγκαταστάσεις συνήθως εφαρμόζονται 14 ώρες φωτισμού και 10 ώρες νύχτας (14L:10D), ώστε να συμβαδίζουν όσο το δυνατόν με τον κερκάρδιο ρυθμό του οργανισμού. Απαραίτητη είναι και η ρύθμιση των συγκεντρώσεων της αμμωνίας, των νιτρικών και των νιτρωδών, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται υψηλή ποιότητα του νερού. Ανεκτό εύρος τιμών pH του περιβάλλοντος νερού είναι 6 - 8. Το zebrafish είναι είδος το οποίο σχηματίζει κοπάδια, μία συμπεριφορά η οποία φαίνεται πως είναι έμφυτη καθώς εμφανίζεται λίγο μετά την εκκόλαψη. Η έμφυτη αυτή συμπεριφορά, επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι ψάρια τα οποία εκτρέφονται σε απομόνωση, σχηματίζουν κοπάδια όταν βρεθούν σε δεξαμενή με άτομα του ίδιου είδους (McCann *et al.*, 1971; Engeszer *et al.*, 2007).

1.6.3. Μορφολογία

Το zebrafish παρουσιάζει ένα εντυπωσιακό μοτίβο από 5 - 7 μπλε οριζόντιες λωρίδες στο πλαϊνό τμήμα του σώματός του, οι οποίες εναλλάσσονται με χρυσές και εκτείνονται μέχρι το ουραίο πτερύγιο, όπου και αυξάνονται σε αριθμό (**Εικόνα 1.3**). Το εδρικό πτερύγιο εμφανίζει όμοιες ρίγες και είναι διακλαδισμένο με 10 - 12 ακτίνες. Η άνω πλευρά του ραχιαίου πτερυγίου είναι μπλε και περιβάλλεται από άσπρο χρώμα. Παράλληλα με τον αγρίου τύπου φαινότυπο, σχετικά συχνές είναι κάποιες μεταλλάξεις, όπως μεταξύ άλλων η "leopard", η οποία διαθέτει στικτό μοτίβο αντί των λωρίδων.

Το μήκος τους σπάνια υπερβαίνει τα 4 cm, ενώ το βάρος τους σπάνια ξεπερνά τα 0.5 g. Το σχήμα του σώματός τους είναι ατρακτοειδές και πλευρικά συμπιεσμένο, καταλήγοντας σε ένα λοξό στόμα το οποίο έχει κατεύθυνση προς τα πάνω. Η διάκριση ενός θηλυκού από ένα αρσενικό άτομο δεν είναι πάντα εφικτή, καθώς δεν υπάρχουν πολλά εξωτερικά διακριτά χαρακτηριστικά. Γενικά, τα αναπαραγωγικά ώριμα θηλυκά διαθέτουν ένα περισσότερο κυκλικό σώμα από τα αρσενικά, με ιδιαίτερη έμφαση στην κοιλιακή χώρα. Αρσενικά και θηλυκά παρουσιάζουν τον ίδιο χρωματισμό, αν και τα αρσενικά τείνουν να έχουν μεγαλύτερα εδρικά πτερύγια με τις ενδιάμεσες των μπλε ρίγες να εμφανίζουν κίτρινο χρωματισμό μεγαλύτερης έντασης (**Εικόνα 1.3**).

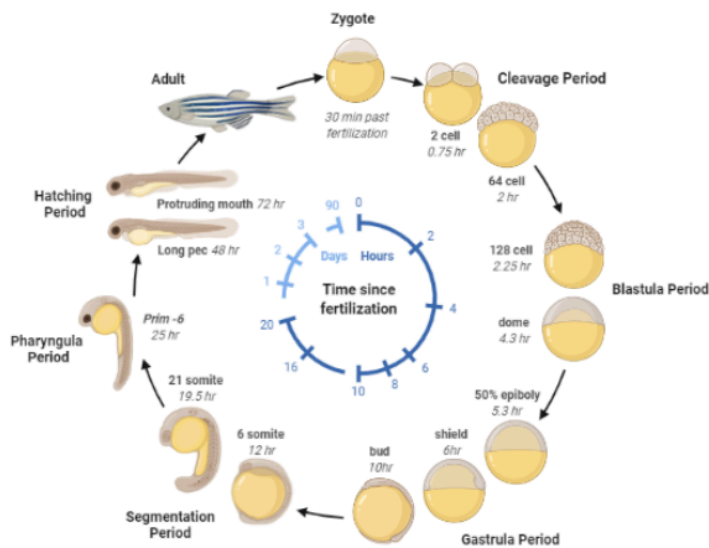


Εικόνα 1.3 | Μορφολογικές διαφορές αρσενικού (A) και θηλυκού (B) ατόμου του είδους *Danio rerio*. Χαρακτηριστική διαφορά αποτελεί η λεπτότερη κοιλιακή χώρα του αρσενικού, ενώ επιπλέον ανατομικές διαφορές αποτελούν το πορτοκαλί εδρικό πτερύγιο του αρσενικού και το κίτρινο ραχιαίο πτερύγιο του θηλυκού (City University of Hong Kong).

1.6.4. Αναπτυξιακά στάδια

Το zebrafish αποτελεί ένα ωτόκο είδος, με την αναπαραγωγή τους να ξεκινά με την απελευθέρωση μερικών εκατοντάδων αυγών από τα θηλυκά και την *ex utero* γονιμοποίησή τους από τους αρσενικούς γαμέτες (Nasiadka and Clark, 2012). Από τη γονιμοποίηση κι έπειτα, το ζυγωτό περνά τα πρώτα στάδια διαίρεσης και αναδίπλωσης, μεταξύ αυτών την αυλάκωση (cleavage), επιβολή και γαστριδίωση (**Εικόνα 1.4**). Το έμβρυο περνάει στην περίοδο εκκόλαψης 48 – 72 ώρες ύστερα από την γονιμοποίηση, όπου τελικά στις 72 ώρες περίπου απελευθερώνεται από το χόριο και αρχίζει την ελεύθερη κολύμβηση. Το στάδιο αυτό σηματοδοτεί τη μετάβαση από την εμβρυική ανάπτυξη στην προνυμφική. Την 5^η ημέρα ύστερα από τη γονιμοποίηση (5 dpf), η προνύμφη είναι

ικανή να τρέφεται από το περιβάλλον. Στο τέλος του πρώτου μήνα, η προνύμφη περνάει στο στάδιο του νεαρού ατόμου (juvenile) στο οποίο θα παραμείνει μέχρι και την 89^η μέρα.



Εικόνα 1.4 | Στάδια εμβρυικής ανάπτυξης του zebrafish. Τα στάδια από τη δημιουργία του ζυγωτού έως την εκκόλαψη μετρώνται χρονικά σε ώρες από τη γονιμοποίηση του αυγού (hours post fertilization, hpf). Από την εκκόλαψη κι έπειτα, ο χρόνος μετράται ως μέρες μετά τη γονιμοποίηση (days post fertilization, dpf) (*Zebrafish Developmental Timeline*, 2022)

Σε εργαστηριακές συνθήκες, τα zebrafish θεωρούνται σεξουαλικά ώριμα από την ηλικία των 3 μηνών. Οι συνθήκες του περιβάλλοντος, όπως η θερμοκρασία του νερού, η πυκνότητα εκτροφής και η διαθεσιμότητα της τροφής, μπορούν να επιταχύνουν ή να καθυστερήσουν την ανάπτυξη των zebrafish (Spence *et al.*, 2008). Αν και κάτω από ιδανικές συνθήκες, τα θηλυκά zebrafish μπορούν να γεννούν αυγά όλο τον χρόνο (Breder and Rosen, 1966) και επί καθημερινής βάσης (Eaton and Farley, 1974; Spence and Smith, 2006), το διάστημα μεταξύ της κάθε ωοτοκίας εξαρτάται από τη διατροφή, την ποιότητα του νερού και την συνθήκες εκτροφής (Lawrence, 2007). Μία περίοδο μίας εβδομάδας μεταξύ της κάθε ωοτοκίας θεωρείται ιδανική προκειμένου να επιτευχθεί η καλύτερη παραγωγή αυγών.

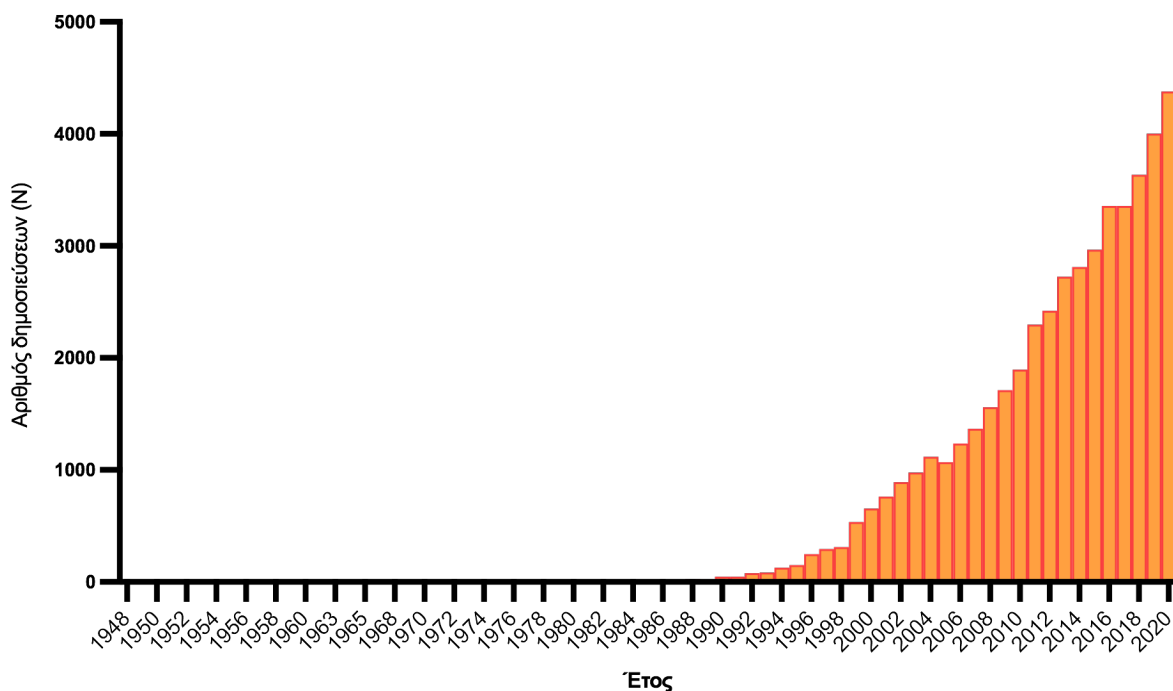
Στο φυσικό του περιβάλλον φαίνεται πως αναπαραγωγικά αποτελεί ένα κυρίως ετήσιο είδος, με την έναρξη της αναπαραγωγικής του περιόδου να συμπίπτει με την έναρξη των μουσώνων (Spence, Smith and Ashton, 2007). Ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης παρατηρείται κατά τους μήνες των μουσώνων (Ιούνιος - Σεπτέμβριος), μία περίοδο με υψηλές θερμοκρασίες (μέχρι και 34°C) και μεγάλη διαθεσιμότητα τροφής (Talling and Lemoalle, 1998). Οι γενετικοί μηχανισμοί για σεξουαλική διαφοροποίηση δεν έχουν γίνει απολύτως γνωστοί, υπάρχουν ενδείξεις πως η διαθεσιμότητα τροφής

και ο ρυθμός αύξησης επηρεάζουν τη φυλετική διαφοροποίηση, με τα άτομα που αναπτύσσονται πιο γρήγορα να εξελίσσονται σε θηλυκά και τα άτομα με την πιο βραδεία ανάπτυξη σε αρσενικά (Lawrence, 2007). Στην αρχή, όλα τα έμβρυα έχουν ωοθηκικό ιστό και 3 – 4 εβδομάδες ύστερα από τη γονιμοποίηση, τα γενετικά αρσενικά άτομα διαφοροποιούν τις πρόδρομες ωοθήκες τους σε όρχεις.

Μέση διάρκεια ζωής που έχει παρατηρηθεί σε εργαστηριακούς πληθυσμούς είναι 42 μήνες, με τον γηραιότερο ενήλικα να επιβιώνει μέχρι και τους 66 μήνες. Όπως και τα περισσότερα είδη με ενδιαίτημα τις κοίτες ποταμών, τα zebrafish στη φύση σπάνια επιβιώνουν περισσότερο του ενός έτους (Spence *et al.*, 2007).

1.6.5. Σημασία

Έπειτα από τη δημοσίευση των πρωτοποριακών μελετών που καθιέρωσαν το zebrafish ως οργανισμό μοντέλο στον τομέα της Αναπτυξιακής Βιολογίας, ο αριθμός πειραμάτων στο zebrafish για μελέτη κυτταρικών, μοριακών και γενετικών αναπτυξιακών μηχανισμών ολοένα και αυξάνεται (Briggs, 2002). Το γεγονός αυτό αποτυπώνεται και στον σταθερά αυξανόμενο αριθμό δημοσιευμένων μελετών που χρησιμοποιούν το zebrafish τις τελευταίες δεκαετίες (**Εικόνα 1.5**). Η ευρεία χρήση του από εργαστηριακές ομάδες σε όλο τον κόσμο έχει οδηγήσει σε εξελίξεις στους τομείς της αναπτυξιακής βιολογίας, ογκολογίας, τοξικολογίας, αναπαραγωγής, τερατογένεσης, γενετικής, νευροβιολογίας και αναγεννητικής ιατρικής (Goldshmit *et al.*, 2012).



Εικόνα 1.5 | Αριθμός δημοσιεύσεων οι οποίες έχουν χρησιμοποιήσει το zebrafish από το 1948 μέχρι και το 2020 (πηγή δεδομένων pubmed.gov).

Ως είδος διαθέτει πολλά πλεονεκτήματα τα οποία το καθιστούν ιδανικό υποψήφιο για ζωικό οργανισμό μοντέλο (Streisinger *et al.*, 1981). Το μικρό μέγεθός του σε συνδυασμό με το μεγάλο αριθμό αυγών που παράγεται από κάθε σύζευξη συντελούν στο χαμηλό κόστος συντήρησης του. Το σύνολο του γονιδιώματός του έχει αλληλουχηθεί και υπάρχει πλέον ένας συνεχώς αυξανόμενος αριθμός διαθέσιμων γενετικών εργαλείων, που δίνει τη δυνατότητα δημιουργίας διαφορετικών διαγονιδιακών γραμμών (Howe *et al.*, 2013). Η διάρκεια της κάθε γενιάς είναι μικρή, ενώ η γονιμοποίηση είναι εξωτερική, με αποτέλεσμα κάθε στάδιο της ανάπτυξής του να είναι προσβάσιμο. Τα μεγάλα και διαφανή έμβρυά του διευκολύνουν τη μελέτη των αναπτυξιακών διαδικασιών του. Αρκετοί τομείς της φυσιολογίας του εμφανίζουν ομοιότητες με αυτή των θηλαστικών, ακόμα και του ανθρώπου.

Παράλληλα, το zebrafish αποτελεί ένα προσιτό είδος για ηθολογικές μελέτες, καθώς εγκλιματίζεται εύκολα σε νέα περιβάλλοντα, είναι συνεχώς δραστήριο και ενοχλείται ελάχιστα από την παρουσία παρατηρητών (Spence *et al.*, 2008). Μάλιστα, από το 1960 όπου και πραγματοποιήθηκαν οι πρώτες συμπεριφορικές μελέτες στο είδος, η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το βλέμμα της στα συμπεριφορικά πρότυπα του είδους (Orger and De Polavieja, 2017). Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη σαφών περιγραφών του ευρέος ρεπερτορίου συμπεριφορών που συναντώνται στο zebrafish, καθώς και τον σχεδιασμό πολυάριθμων ηθολογικών πρωτοκόλλων (Kalueff *et al.*, 2013). Τα τελευταία χρόνια προτείνεται πως κάποια χαρακτηριστικά συμπεριφορικά πρότυπα των θηλαστικών θα μπορούσαν να μεταφραστούν σε ανάλογες συμπεριφορές του zebrafish, καθιστώντας το ένα είδος πολύτιμο ως μοντέλο έρευνας των εγκεφαλικών λειτουργιών και δυσλειτουργιών (Norton and Bally-Cuif, 2010; Stewart *et al.*, 2015).

Το zebrafish εξελίσσεται ταχέως σε ένα πολλά υποσχόμενο μοντέλο οργανισμό για τη μελέτη του άγχους και του στρες, κυρίως λόγω της ισχυρής και εύκολα υπολογίσιμης απόκρισης της κορτιζόλης (Alsop and Vijayan, 2008), των ξεκάθαρων φαινοτύπων που προκύπτουν από φαρμακολογικούς χειρισμούς με υψηλή προγνωστική εγκυρότητα (Braidia *et al.*, 2007; López-Patiño *et al.*, 2008) και της ευαισθησίας του είδους σε ένα ευρύ φάσμα πειραματικών στρεσογόνων παραγόντων. Όπως και στα τρωκτικά, κάποιοι παράγοντες που μπορούν να πυροδοτήσουν στο zebrafish αγχώδους τύπου συμπεριφορά είναι η έκθεση σε νέα περιβάλλοντα (Cachat *et al.*, 2010), η κοινωνική απομόνωση και ο εγκλεισμός (Kalueff *et al.*, 2014), η έκθεση σε θηρευτές (Gerlai, 2013) και η έκθεση σε φερομόνη συναγερμού (Speedie and Gerlai, 2008).

Στα πλαίσια αυτά έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμα ηθολογικά πρωτόκολλα με στόχο τη μελέτη της αγχώδους συμπεριφοράς στο zebrafish. Μεγάλη πηγή έμπνευσης για τα ηθολογικά αυτά πρωτόκολλα αποτελεί η έρευνα στα τρωκτικά, καθώς αρκετές ηθολογικές δοκιμασίες που εφαρμόζονται στο zebrafish έχουν προσαρμοστεί από μελέτες στα μικρά αυτά θηλαστικά. Μία

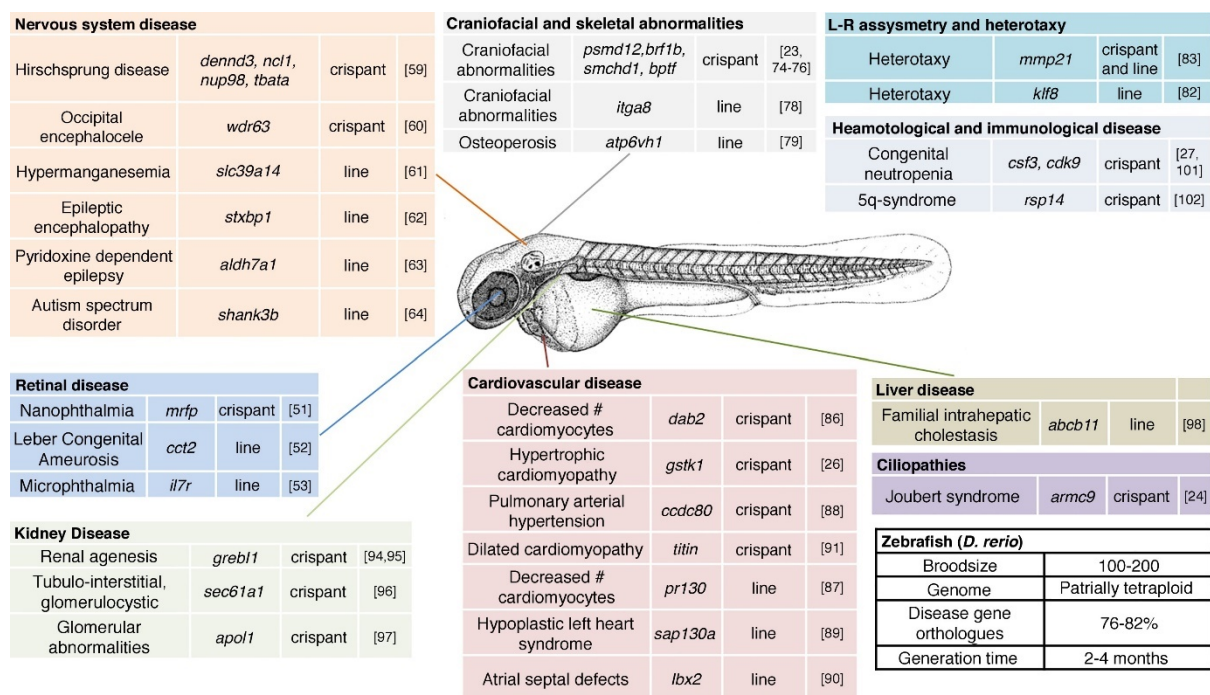
μεγάλη κατηγορία είναι αυτή των δοκιμασιών που περιλαμβάνουν έκθεση σε άγνωστα περιβάλλοντα, η οποία πυροδοτεί την έκφραση συμπεριφορών αποφυγής. Η εξερεύνηση ενός νεοφανούς περιβάλλοντος υποδηλώνει την εξερευνητική τάση των οργανισμών και αντικατοπτρίζει τη συναισθηματική κατάστασή τους. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η δοκιμασία νεοφανούς δεξαμενής, η δοκιμασία ανοιχτού πεδίου, η δοκιμασία εξερευνητικής τάσης καθώς και η δοκιμασία προτίμησης φωτός σκότους. Το σύνολο αυτών των δοκιμασιών έχει χρησιμοποιηθεί σε ποικίλες εφαρμογές, κυρίως φαρμακολογικής φύσης, όπου η χορήγηση αγχολυτικών ουσιών, όπως αιθανόλη και νικοτίνη, παρατηρείται πως μειώνει τον αγχώδη φαινότυπο (αύξηση χρόνου στο ανώτερο τμήμα της δεξαμενής – αύξηση εξερευνητικότητας) (Egan *et al.*, 2009).

1.6.6. Zebrafish ως οργανισμός μοντέλο για τις ανθρώπινες ασθένειες

Προς το τέλος της Δεβόνιας περιόδου (360 εκατομμύρια χρόνια πριν), ο κλάδος των τελεόστεων υπέστη έναν γονιδιωματικό διπλασιασμό, γεγονός το οποίο οδήγησε σε πολλαπλά ορθόλογα για κάποια από τα γονίδια των θηλαστικών (Meyer and Schartl, 1999; Taylor *et al.*, 2003). Τα διπλασιασμένα αυτά γονίδια ενδέχεται να είναι πλεονάζοντα στην λειτουργία τους, ένα από τα δύο να έχουν χάσει την αρχική τους λειτουργία ή να έχουν αποκτήσει κάποια καινούργια (Force *et al.*, 1999; Postlethwait, 2006). Στην περίπτωση του zebrafish, παρά την παρουσία των διπλασιασμένων γονιδίων, εντοπίζεται μία σημαντική γενετική ομοιότητα με τον άνθρωπο. Περίπου το 70% των ανθρώπινων γονιδίων έχουν ένα τουλάχιστον ορθόλογο γονίδιο στο zebrafish και το 82% των γονιδίων με αναφορές θνησιμότητας καταγεγραμμένες σε βάσεις δεδομένων όπως το *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM.com), έχουν ένα τουλάχιστον ορθόλογο γονίδιο στο zebrafish (Howe *et al.*, 2013). Το υψηλό αυτό ποσοστό, σε συνδυασμό με τα πολυάριθμα πλεονεκτήματα που σχετίζονται με τον εργαστηριακό του χειρισμό, καθιστούν το zebrafish ένα πολύτιμο εργαστηριακό μοντέλο, η χρήση του οποίου μπορεί να προσφέρει πληθώρα πληροφοριών σχετικά με το γενετικό υπόβαθρο ανθρώπινων ασθενειών (Lieschke and Currie, 2007; Phillips and Westerfield, 2014; White, 2015).

Επιπροσθέτως, το zebrafish έχει πλέον αναγνωριστεί ως ένα από τα πλέον πολύτιμα μοντέλα σπονδυλωτών, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε έρευνες υψηλής απόδοσης για μαζική εξέταση και ανάπτυξη φαρμάκων. Οι συγκεκριμένες μελέτες είναι αδύνατο να εφαρμοστούν σε άλλα μοντέλα σπονδυλωτών και έχουν αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμες στη μελέτη ανθρώπινων ασθενειών και των σχετικών θεραπειών τους (Liu *et al.*, 2016; Williams and Hong, 2016; Deveau *et al.*, 2017). Η μοντελοποίηση περίπλοκων βιολογικών διεργασιών υψηλής τάξης απαιτεί προφανώς τη χρήση οργανισμών με μικρή εξελικτική απόσταση από τον άνθρωπο και για αυτό το λόγο οι μύες (*Mus musculus*) αποτελούν την πιο προφανή επιλογή για τέτοιες μελέτες. Η χρήση μοντέλων θηλαστικών για μοντελοποίηση μεγάλων συστοιχιών παραλλαγών γονιδίων αποτελεί όμως μία τεράστια

οικονομική πρόκληση. Από την άλλη, μη θηλαστικά σπονδυλωτά είναι χρήσιμα αφού μπορούν να καταδείξουν γενετικές μεταλλάξεις υπεύθυνες για συγκεκριμένους φαινοτύπους καθώς και παραλλαγές που σχετίζονται με συγκεκριμένες ασθένειες. Τα συγκεκριμένα μοντέλα μπορούν να λειτουργήσουν ως ένα προκαταρκτικό στάδιο πριν την εφαρμογή της γνώσης στα θηλαστικά αλλά και ως μία πλατφόρμα για βασική έρευνα, αναγνώριση καινούριων θεραπευτικών στόχων και αρχικής φαρμακευτικής ανάπτυξης. Η εφαρμογή των πλέον πρόσφατων μεθόδων γονιδιακής τροποποίησης (π.χ. CRISPR/Cas9) έχει εισαγάγει το zebrafish στη μελέτη μοντέλων νεοπλασιών (Ceol and Houngras, 2016), νόσων του αμφιβληστροειδούς και του νευρικού συστήματος, καρδιαγγειακών, νεφρικών, ηπατικών και παγκρεατικών παθήσεων, καθώς και σκελετικών ανωμαλιών (Εικόνα 1.6).



Drug Discovery Today: Technologies

Εικόνα 1.6| Εφαρμογή της τεχνικής CRISPR/Cas9 για την δημιουργία μοντέλων ασθενειών στο *Danio rerio* (Naert and Vleminckx, 2018).

1.6.7. Εργαλεία γενετικής τροποποίησης στο zebrafish

Η αξιοποίηση του zebrafish ως ένα πολύτιμο εργαλείο στην έρευνα της γονιδιακής λειτουργίας δημιούργησε μία ανάγκη ανάπτυξης τεχνικών με στόχο την καλύτερη μελέτη των αναπτυξιακών και ομοιοστατικών μηχανισμών (Detrich *et al.*, 1999). Για αρκετά χρόνια, οι μέθοδοι για επέμβαση σε στοχευμένες περιοχές του γονιδιώματος ήταν εστιασμένες σε οργανισμούς όπως οι μύες, όπου οι ερευνητές μπορούσαν να χειριστούν τα εμβρυονικά κύτταρα με συγκεκριμένους τρόπους μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού. Πρώτο εργαλείο που χρησιμοποιήθηκε στο zebrafish στην προσπάθεια σύνδεσης του φαινοτύπου με τον γονότυπο ήταν τα morpholinos (antisense morpholino

oligonucleotides - MOs) (Nasevicius and Ekker, 2000) και από τότε έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη λειτουργική απόσβεση γονιδίων (gene knock-out). Πρόσφατα όμως τέθηκαν κάποια σοβαρά ερωτήματα σχετικά με την ακρίβεια και την εξειδίκευσή τους (Schulte-Merker and Stainier, 2014; Stainier *et al.*, 2015).

Τα εργαλεία γενετικής μηχανικής τα οποία χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια βασίζονται σε ειδικά κατασκευασμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες (engineered nucleases, ENs), οι οποίες αποτελούνται από ένα στοιχείο στόχευσης συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA και μία ενδονουκλεάση η οποία στοχεύει και κόβει δίκλωνο τμήμα του DNA (catalytic domain). Η ενδονουκλεάση εισάγει δίκλωνες ρήξεις, δηλαδή διπλή ρήξη του μορίου DNA στο γονιδίωμα (DSBs). Τα DSBs μπορούν να επιδιορθωθούν μέσω δύο διαφορετικών ανεξάρτητων μονοπατιών: μη ομόλογη ένωση άκρων (NHEJ) και ομόλογη επιδιόρθωση (HDR). Η NHEJ είναι ικανή να ενώνει τομές σε δίκλιωνα μόρια DNA χωρίς κάποιο πρότυπο, ιδιότητα η οποία την καθιστά επιρρεπή σε λάθη και οδηγεί σε μικρές εισαγωγές ή ελλείψεις βάσεων (indels) στο σημείο τομής. Αντιθέτως, η HDR επιδιορθώνει βασιζόμενη στην ομόλογη αλληλουχία της αδερφής χρωματίδας και δεν εισάγει σφάλματα στο γονιδίωμα. Η NHEJ είναι δέκα φορές πιο γρήγορη από την HDR κατά την ανάπτυξη του zebrafish (Dai *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012). Με βάση αυτή τη γνώση, είναι δυνατή η εκμετάλλευση του μηχανισμού που είναι επιρρεπής στα λάθη προκειμένου να εισαχθούν μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε μη λειτουργική πρωτεΐνη. Για τον σκοπό αυτό έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές ενδονουκλεάσες, μεταξύ αυτών οι νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου (Zinc Finger Nucleases, ZFNs), TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) και CRISPR/Cas9 (Σύστημα Ομαδοποιημένων Μικρών Παλίνδρομων Επαναλήψεων/σχετιζόμενων πρωτεϊνών 9, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats /CRISPR associated proteins 9).

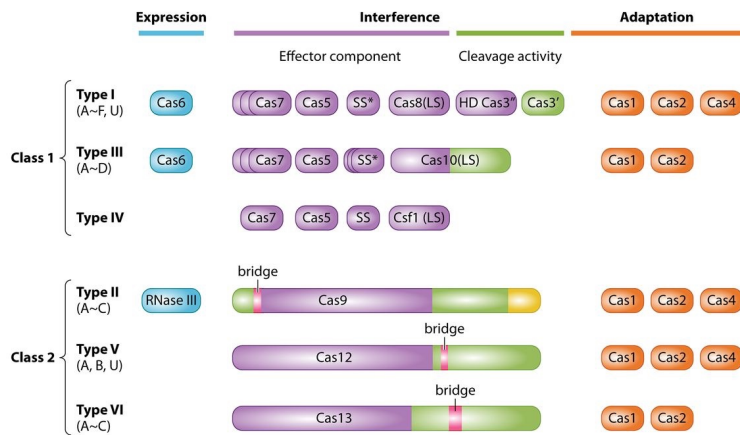
1.7. Σύστημα CRISPR/Cas9

Τα πρώτα CRISPRs εντοπίστηκαν το 1987 όπου μελετώντας το ισοένζυμο αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) σε ένα στέλεχος του βακτηρίου *Escherichia coli* εντοπίστηκαν 5 επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 29 βάσεων οι οποίες χωρίζονταν από ακολουθίες διαχωριστές (spacers) 32 νουκλεοτιδίων (Ishino *et al.*, 1987). Από τη δεκαετία του '90 με τη συνεχόμενη ανάπτυξη και εξέλιξη της γονιδιακής αλληλούχησης άρχισαν να δημοσιεύονται έρευνες οι οποίες εντόπιζαν CRISPRs σε αρχαία (πρώτα στο *Haloferax mediterranei*) (Mojica *et al.*, 1993) και σε ολοένα αυξανόμενο αριθμό βακτηριακών ειδών (Masepohl *et al.*, 1996; Nelson *et al.*, 1999; Mojica *et al.*, 2000). Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες σταθερού μήκους γενικά έχουν δυαδική συμμετρία και σχηματίζουν μία παλίνδρομη δομή. Το μυστήριο των αλληλουχιών αυτών λύθηκε όταν το 2005 τρεις

ανεξάρτητες ομάδες δημοσίευσαν το συμπέρασμα πως το CRISPR λειτουργεί ως ένα ανοσοποιητικό σύστημα στα βακτήρια και τα αρχαία. Στο συμπέρασμα αυτό οδηγήθηκαν από την παρατήρηση πως οι αλληλουχίες διαχωριστές των CRISPRs εμφανίζουν ομοιότητα με αλληλουχίες βακτηριοφάγων, ιών αρχαίων και πλασμιδίων (Bolotin *et al.*, 2005; Mojica *et al.*, 2005; Pourcel *et al.*, 2005). Παράλληλα, ταυτοποιήθηκαν και γονίδια που μέχρι τότε θεωρούνταν πως κωδικοποιούσαν πρωτεΐνες επιδιόρθωσης του DNA στα αρχαία, όμως τελικά αποδείχτηκε πως ήταν γονίδια αυστηρά και μόνο σχετιζόμενα με το σύστημα CRISPR, τα γονίδια *cas* (CRISPR-associated) (Jansen *et al.*, 2002). Τελικά, το σύστημα CRISPR και Cas πρωτεϊνών (προϊόντα των γονιδίων *cas*) δουλεύει συνεργατικά και αποτελεί ένα σύστημα επίκτητης ανοσίας, η οποία προστατεύει τα προκαρυωτικά κύτταρα από ιούς και πλασμίδια, ανάλογο του συστήματος RNAi των ευκαρυωτών (Makarova *et al.*, 2006).

1.7.1. Κατηγοριοποίηση των συστημάτων CRISPR-Cas

Τα συστήματα CRISPR-Cas μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες, διαχωρισμός που γίνεται με βάση τη δομή των πρωτεϊνών Cas που συμμετέχουν. Πιο συγκεκριμένα, έχει οριστεί η Κλάση 1, η οποία περιλαμβάνει τα συστήματα τα οποία χρησιμοποιούν ένα σύμπλοκο πολλαπλών πρωτεϊνών Cas και η Κλάση 2, στην οποία ανήκουν τα συστήματα με μία μοναδική μεγάλη πρωτεΐνη Cas (Shmakov *et al.*, 2017). Τα συστήματα της Κλάσης 1 είναι διαδεδομένα στα βακτήρια και στα αρχαία (Burstein *et al.*, 2017), ενώ αυτά της Κλάσης 2 βρίσκονται αποκλειστικά και μόνο στα βακτήρια. Οι δύο αυτές κατηγορίες διαχωρίζονται περαιτέρω, με κάθε κλάση να περιλαμβάνει τρεις τύπους: I, III και IV στην Κλάση 1 και II, V και VI στην Κλάση 2 (Εικόνα 1.7). Η απλότητα των συμπλόκων που παρατηρείται στα συστήματα CRISPR της Κλάσης 2 τα καθιστά μία σημαντική επιλογή για την ανάπτυξη της νέας γενιάς τεχνολογιών γενετικής μηχανικής. Το πιο κοινό και πιο συχνά μελετημένο σύμπλοκο πρωτεϊνών είναι αυτό της πρωτεΐνης Cas9, η οποία εμφανίζει δύο ενεργές περιοχές νουκλεάσης, με την κάθε μία να κόβει μία αλληλουχία DNA. Όπως και άλλοι αμυντικοί μηχανισμοί, τα συστήματα CRISPR-Cas έχουν εξελιχθεί στα πλαίσια ενός συνεχούς αγώνα με κινητά γενετικά στοιχεία, το οποίο έχει οδηγήσει σε ακραία διαφοροποίηση των αλληλουχιών για τις πρωτεΐνες Cas και της αρχιτεκτονικής των περιοχών CRISPR-*cas*.



Εικόνα 1.7 | Κατηγοριοποίηση των συστημάτων CRISPR-Cas (Ishino, Krupovic and Forterre, 2018).

1.7.2. Μηχανισμός δράσης των συστημάτων CRISPR-Cas

Ουσιαστικά το σύστημα CRISPR αποτελεί έναν μηχανισμό άμυνας των βακτηρίων και των αρχαίων ενάντια στην εισαγωγή ξένων νουκλεοτιδίων από βακτηριοφάγους και εξωγενή πλασμίδια (Barrangou *et al.*, 2007). Η απόκριση του συστήματος CRISPR ως αμυντικού μηχανισμού αποτελείται από τρία στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο, αυτό της προσαρμογής (adaptation step), τα νουκλεϊκά οξέα εισβολείς αναγνωρίζονται ως ξένα και ενσωματώνονται ως διαχωριστές μεταξύ των συστοιχιών CRISPR στο γονιδίωμα του ξενιστή. Αυτό επιτυγχάνεται με το πρωτεϊνικό σύμπλοκο Cas1-Cas2 να κόβει ένα κομμάτι από το DNA στόχο των πλασμιδίων ή των φάγων (γνωστό και ως protospacer) και να το εισάγει μεταξύ των επαναλήψεων στο 5' άκρο μίας αλληλουχίας CRISPR, δημιουργώντας έναν καινούριο διαχωριστή (spacer).

Το επόμενο στάδιο αποτελεί εκείνο της έκφρασης (expression step), όπου οι αλληλουχίες CRISPR και οι διαχωριστές εκφράζονται και προκύπτει ένα μακροσκελές μεταγράψωμα (transcript), γνωστό και ως pre-CRISPR RNA (pre-crRNA). Σύμπλοκα των πρωτεϊνών Cas (τα οποία κάποιες φορές περιλαμβάνουν και επιπλέον πρωτεΐνες και μόρια RNA) επεξεργάζονται το pre-crRNA και προκύπτει ένα μικρότερο CRISPR RNAs (crRNAs). Στο τελικό στάδιο της παρεμβολής (interference step), ένα σύμπλοκο Cas πρωτεϊνών (τυπικά ένα τροποποιημένο επεξεργαστικό σύμπλοκο) χρησιμοποιεί το crRNA ως οδηγό για να κόψει το DNA ή RNA στόχο. Δηλαδή, όταν το κύτταρο μολυνθεί, τα crRNAs με διαχωριστές των οποίων η αλληλουχία μοιάζει με αυτή των εισβολέων, προσδένονται στις αλληλουχίες εισβολείς και ενεργοποιούν τις Cas νουκλεάσες, οι οποίες διασπούν την αλληλουχία του εισβολέα και εμποδίζεται η εισβολή των παθογόνων.

Η παρατήρηση πως η νουκλεάση Cas9 αποτελείται από δύο ενεργές περιοχές νουκλεάσης οδήγησε στη συγκέντρωση μεγάλου ερευνητικού ενδιαφέροντος στο συγκεκριμένο σύστημα. Αναγνωρίστηκαν οι μεγάλες δυνατότητες γονιδιωματικής επεξεργασίας που προσφέρει το σύστημα CRISPR-Cas9 και έγιναν προσπάθειες προσαρμογής του για χρήση σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Τα

crRNA και tracrRNA του *Streptococcus pyogenes* συγχωνεύτηκαν σε ένα RNA οδηγό (single guide RNA, sgRNA) καθώς αυτά αναγνωρίστηκαν πως είχαν την ικανότητα να στρατολογούν και να ενεργοποιούν την Cas9 (Jinek *et al.*, 2012). Το σύνολο των προσπαθειών οδήγησε στον σχεδιασμό ενός απλοποιημένου CRISPR-Cas9 συστήματος από τα είδη *Streptococcus thermophilus* και *Streptococcus pyogenes* τα οποία έθεσαν τα θεμέλια για την επίτευξη γονιδιωματικής επεξεργασίας σε κύτταρα Σπονδυλωτών (Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013).

Αφού οι στοχοποιητικές ιδιότητες του συστήματος CRISPR/Cas9 βασίζονται μόνο στην αλληλουχία του μοναδικού RNA οδηγού, είναι πλέον πολύ εύκολο να στοχευθεί οποιαδήποτε αλληλουχία ενδιαφέροντος στο γονιδίωμα. Κάθε sgRNA αποτελείται από μία αλληλουχία 20 βάσεων, η οποία είναι συμπληρωματική με την αλληλουχία στόχο, και ακολουθείται από 72-80 βάσεις της crRNA/tracrRNA αλληλουχίας η οποία είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό της δομής βρόχου η οποία σταθεροποιεί το sgRNA (Hsu *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013). Το μόνο εμπόδιο στο σχεδιασμό των sgRNAs είναι η παρουσία του NGG στο 3' άκρο της περιοχής στόχου η οποία δρα ως PAM και απαιτείται για αναγνώριση του DNA από την Cas9 και την επακόλουθη ενεργοποίηση της Cas9 (Jinek *et al.*, 2014; Sternberg *et al.*, 2014).

Η ευρεία παρουσία των περιοχών CRISPR σε πολλά βακτήρια και αρχαία τα καθιστά πολύτιμα εργαλεία και σε άλλες εφαρμογές εκτός από τη γονιδιωματική επεξεργασία, όπως είναι η αναγνώριση ειδών μικροοργανισμών, μία διαδικασία πολύ σημαντική για διαγνωστικούς και επιδημιολογικούς σκοπούς (Kamerbeek *et al.*, 1997; Mokrousov *et al.*, 2007; Ginevra *et al.*, 2012). Επίσης έχει προταθεί η χρησιμότητά του μηχανισμού ως αντιμικροβιακός παράγοντας, με ελπίδες επιτυχίας έναντι ανθεκτικών βακτηρίων (Bikard *et al.*, 2014; Citorik *et al.*, 2014).

1.8 Σκοπός διατριβής

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της αγωνιστικής συμπεριφοράς στο zebrafish (*Danio rerio*) και των ηθολογικών προτύπων που εμφανίζει το συγκεκριμένο είδος, καθώς και η επίδραση των υποδοχέων των γλυκοκορτικοστεροειδών στην αγχώδους τύπου συμπεριφορά ενηλίκων και προνυμφικών ατόμων zebrafish. Πιο συγκεκριμένα, στόχοι της συγκεκριμένης διατριβής αποτέλεσαν οι εξής:

- μελέτη της συνέπειας της απόκρισης στην καταπόνηση μεταξύ των διαφόρων ηθολογικών προτύπων που έχουν οριστεί και περιγραφεί στο zebrafish (Κεφάλαιο 2).
- επίδραση της φλουοξετίνης στην αγωνιστική συμπεριφορά των ενηλίκων zebrafish (Κεφάλαιο 3).
- επίδραση της φλουοξετίνης στην απόκριση σε καταπόνηση των προνυμφών zebrafish (Κεφάλαιο 4).

- μελέτη της επίδρασης της σίγασης των γονιδίων των γλυκοκορτικοστεροειδών υποδοχέων στην αγχώδους τύπου συμπεριφορά των ενηλίκων zebrafish, καθώς και στην κοινωνική τους συμπεριφορά (Κεφάλαιο 5).
- επίδραση της σίγασης των γονιδίων των γλυκοκορτικοστεροειδών υποδοχέων στην απόκριση στην καταπόνηση προνυμφών zebrafish (Κεφάλαιο 6).

Κεφάλαιο 2. Ηθολογικά πρότυπα zebrafish

2.1. Εισαγωγή

Τα άτομα πολλών ζωικών ειδών παρουσιάζουν έντονες κοινωνικές αλληλεπιδράσεις και ιεραρχίες, που είναι σημαντικές για την επιβίωση, την κοινωνική μάθηση, τη διερεύνηση και αξιοποίηση των διαθέσιμων πόρων, την αναπαραγωγή και γενικότερα την αρμοστικότητα (fitness) των ατόμων ενός πληθυσμού (Sih *et al.*, 2004). Τα άτομα αυτά αναπτύσσουν συγκεκριμένες στρατηγικές (coping styles) ή ηθολογικά πρότυπα (behavioural syndromes), για την αντιμετώπιση των προκλήσεων που αντιμετωπίζουν κατά τη διάρκεια της ζωής τους (Πίνακας 2.1). Γενικά, θεωρείται ότι τα προδραστικά (proactive) άτομα ακολουθούν κυρίως μια κυριαρχική (dominant), επιθετική (aggressive), τολμηρή (bold) και στερεότυπη συμπεριφορά, ενώ τα αναδραστικά (reactive) μια συμπεριφορά υποτακτική (subordinate), επιφυλακτική (shy) και ευέλικτη (flexible) (Øverli *et al.*, 2007). Τα ηθολογικά αυτά πρότυπα συνδέονται και με αλλαγές σε μοριακό και νευρο-ενδοκρινικό επίπεδο, καθώς και με διαφορές σε σημαντικές λειτουργίες του οργανισμού, όπως ο μεταβολισμός, η απόκριση στο στρες, η υγεία, αλλά και στην περίπτωση των παραγωγικών ζώων στον αυξητικό ρυθμό, στην κατανάλωση της τροφής και στην αναπαραγωγική ικανότητα (Koolhaas *et al.*, 2010). Για παράδειγμα, εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις της τεστοστερόνης και της κορτιζόλης (ή της κορτικοστερόνης) στο αίμα, στα επίπεδα πολλών νευροδιαβιβαστών στον εγκέφαλο, καθώς και στην έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του άξονα HPA και στην ενεργότητα του συμπαθητικού και παρασυμπαθητικού νευρικού συστήματος. Για τους λόγους αυτούς, η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των βαθύτερων μηχανισμών που ρυθμίζουν την απόκριση των οργανισμών σε δυσμενή ερεθίσματα και προκλήσεις του φυσικού και κοινωνικού περιβάλλοντος είναι υψηλής προτεραιότητας τόσο σε βασικό (ασθένειες και σύνδρομα που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής, το στρες και το άγχος) όσο και σε εφαρμοσμένο (π.χ. προγράμματα γενετικής επιλογής σε παραγωγικά ζώα) επίπεδο.

Πίνακας 2.1 | Χαρακτηριστικά προδραστικών και αναδραστικών ατόμων (Korte *et al.*, 2005)

Ηθολογικό πρότυπο	Προδραστικό	Αναδραστικό
Στρατηγική αντιμετώπισης	Πάλη-φυγή (fight-flight)	Πάγωμα – κρύψιμο (freeze – hide)
Συναισθηματική κατάσταση	Επιθετικότητα και τολμηρότητα	Μη επιθετικότητα και επιφυλακτικότητα
Εξερευνητικότητα	Ταχεία και επιφανειακή	Προσεκτική και διεξοδική
Συμπεριφορική ευελιξία	Στερεότυπη	Ευέλικτη

Το zebrafish, *Danio rerio*, αποτελεί ένα σημαντικό οργανισμό μοντέλο βασικής έρευνας στις Επιστήμες Ζωής (π.χ. γενετικής, αναπτυξιακής βιολογίας, οικοτοξικολογίας, φαρμακολογίας, νευροβιολογίας), αλλά και στην Ιχθυοκαλλιέργεια. Στη φύση το zebrafish αποτελεί ένα κοινωνικό είδος, με ισχυρή τάση σχηματισμού κοπαδιών (Saverino and Gerlai, 2008). Εντούτοις, σε εργαστηριακές συνθήκες και σε πληθυσμούς χαμηλής συγκέντρωσης, εμφανίζονται επιθετικές αλληλεπιδράσεις οι οποίες στην πλειοψηφία τους καταλήγουν σε σχέσεις κυριαρχίας-υποτέλειας, τόσο σε αρσενικά όσο και σε θηλυκά άτομα. Για τη μελέτη των ηθολογικών προτύπων, έχουν σχεδιαστεί και αξιολογηθεί στο zebrafish πολυάριθμα πρωτόκολλα μελέτης του στρες (Egan *et al.*, 2009; Piato *et al.*, 2011; Pavlidis *et al.*, 2013; Pavlidis *et al.*, 2015), του άγχους (Gerlai *et al.*, 2000; Egan *et al.*, 2009; Blaser *et al.*, 2010), της επιθετικότητας (Gerlai, 2003; Pavlidis *et al.*, 2011), μάθησης και μνήμης (Gerlai, 2003; Colwill *et al.*, 2005; Ninkovic and Bally-Cuif, 2006; Pather and Gerlai, 2009), ανταμοιβής (Ninkovic and Bally-Cuif, 2006; Al-Imari and Gerlai, 2008) και κοινωνικής συμπεριφοράς (Engeszter *et al.*, 2007; Saverino and Gerlai, 2008).

Ένα από τα πλέον μελετημένα σύνδρομα στο zebrafish είναι αυτό της αγωνιστικής συμπεριφοράς (Koolhaas *et al.*, 1999), κατά την οποία ένα (συνήθως αρσενικό) άτομο συμπεριφέρεται επιθετικά σε ένα άλλο άτομο της ομάδας, το οποίο με τη σειρά του είτε εκδηλώνει παρόμοια συμπεριφορά ή δραπετεύει ή παραμένει ακίνητο και φοβισμένο στην περίπτωση που δεν μπορεί να διαφύγει (fight, flight or freeze response). Έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές στην έκφραση της αγωνιστικής συμπεριφοράς μεταξύ των δυο φύλων και αρσενικά zebrafish με πιο τολμηρή συμπεριφορά είναι πιο πιθανό να γίνουν κυρίαρχα (dominant) σε σχέση με τα ζώα που δείχνουν ένα πιο ντροπαλό (shy) ηθολογικό προφίλ (Dahlbom *et al.*, 2011). Η αγωνιστική συμπεριφορά έχει μελετηθεί και σε άλλα είδη ψαριών (Huntingford, 1976; Schjolden *et al.*, 2005), σε πτηνά (Dingemans *et al.*, 2007) και σε θηλαστικά (Benus *et al.*, 1991) και θεωρείται πρωταρχικής σημασίας για την επιβίωση, την ομοιόσταση, την κοινωνική δομή και την αναπαραγωγή. Παράλληλα, η εξερευνητική συμπεριφορά αποτελεί μία σημαντική παράμετρο εκτίμησης του ηθολογικού προφίλ ενός οργανισμού καθώς και του τρόπου με τον οποίο αντιμετωπίζει μία στρεσογόνο συνθήκη (Baker *et al.*, 2018). Έχει παρατηρηθεί σημαντική πληθυσμιακή διακύμανση ως προς την εξερευνητική συμπεριφορά των zebrafish, ενώ η εξερευνητικότητα ενός ατόμου εμφανίζει υψηλά επίπεδα σταθερότητας και επαναληψιμότητας σε ποικίλες δοκιμασίες και συνθήκες (Adriaenssens and Johnsson, 2013).

Το συγκεκριμένο πείραμα είχε ως σκοπό τον έλεγχο της υπόθεσης για τη συνέπεια (consistency) της απόκρισης στα διαφορετικά ηθολογικά πρότυπα του zebrafish.

2.2. Υλικά και Μέθοδοι

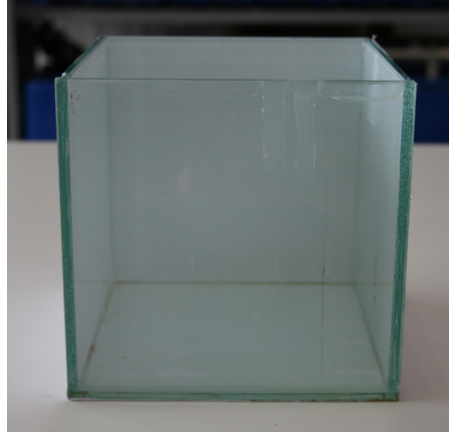
2.2.1. Χειρισμός και προέλευση πειραματόζωων

Τα zebrafish τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στα συγκεκριμένα πειράματα ήταν κατά δήλωση άγριας προέλευσης (εισαγωγή από Σιγκαπούρη) και τα προμηθευτήκαμε από τοπικό εμπορικό κατάστημα. Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά και θηλυκά ψάρια βάρους 0.43 ± 0.14 g ($x \pm SD$). Η εκτροφή τους καθώς και τα σχετικά πειράματα έγιναν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ιχθύων. Ο φωτισμός του εργαστηριακού χώρου ήταν τεχνητός και ακολουθούσε μία σταθερή φωτοπερίοδο με 12 ώρες μέρα και 12 ώρες νύχτα. Οι μητρικές δεξαμενές στις οποίες διατηρήθηκε ο κύριος όγκος των ψαριών ήταν όγκου 250L και επιφάνειας 120×50 cm², κλειστού κυκλώματος (φίλτρα της εταιρίας EHEIM) και κατασκευασμένες από γυαλί. Εκτός από τις ημέρες των πειραμάτων, τα ψάρια ταΐζονταν δύο φορές ημερησίως, με τροφή βιομηχανικής προέλευσης (Ocean Nutrition, Spirulina flakes). Οι συνθήκες του περιβάλλοντός τους διατηρούνταν σταθερές με καθημερινούς ελέγχους και μετρήσεις των διαφόρων παραμέτρων. Η θερμοκρασία ήταν στους 25 – 28°C, το pH 7.0 και το οξυγόνο κατά μέσο όρο 6.9 mg L⁻¹ με κορεσμό 97%. Παράλληλα, με τη χρήση εμπορικών συσκευασιών (Sera kit) διεξαγόταν μέτρηση των συγκεντρώσεων της αμμωνίας, νιτρικών, νιτρωδών μία φορά την εβδομάδα.

2.2.2. Συμπεριφορικές δοκιμασίες

Δυαδική αγωνιστική συμπεριφορά (paired aggression test)

Πρώτη ηθολογική δοκιμασία που εφαρμόστηκε για τον αρχικό ηθολογικό χαρακτηρισμό αποτέλεσε το πείραμα της δυαδικής αγωνιστικής συμπεριφοράς (paired aggression test), το οποίο βασίζεται στις σχέσεις κυριαρχίας-υποτέλειας που συχνά εμφανίζονται σε ζευγάρια και ομάδες zebrafish υπό εργαστηριακές συνθήκες (Larson *et al.*, 2006; Pavlidis *et al.*, 2011). Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο αφορά στον σχηματισμό ζευγαριών zebrafish του ίδιου φύλου και παρόμοιου μεγέθους και παρατήρηση της συμπεριφοράς τους για 2 ή 24 ώρες. Τα zebrafish αναισθητοποιήθηκαν με τη χρήση MS-222 (Tricaine methanesulfonate) σε συγκέντρωση 164 mg L⁻¹ προκειμένου να μετρηθεί το μήκος και το βάρος τους, αλλά και να σημανθούν με κόψιμο ενός μέρους του ουραίου πτερυγίου τους. Με την επιλογή zebrafish παρόμοιου μεγέθους, τα ζευγάρια που σχηματίστηκαν τοποθετήθηκαν σε μικρές τετράγωνες δεξαμενές των 2 L (**Εικόνα 2.1**) και αφέθηκαν να αλληλεπιδράσουν για 2 ώρες. Με το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, η συμπεριφορά των ζευγαριών καταγράφηκε και αναλύθηκε, έτσι ώστε να εντοπιστούν οι χαρακτηριστικές αγωνιστικές συμπεριφορές που υποδηλώνουν την εδραίωση μίας κοινωνικής ιεραρχίας. Προέκυψαν δύο πειραματικές ομάδες, τα κυρίαρχα ($n = 17$) και τα υποτελή ($n = 17$) ενήλικα zebrafish.



Εικόνα 2.1 | Δεξαμενή δυαδικής αγωνιστικής συμπεριφοράς.

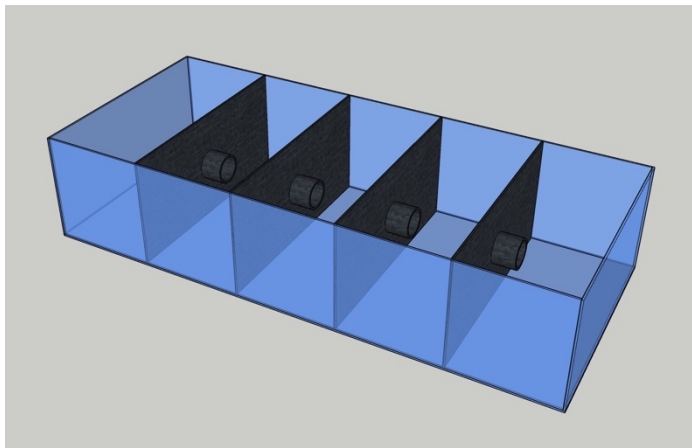
Συνοχή κοπαδιού

Το zebrafish αποτελεί ένα κοινωνικό είδος με ισχυρή τάση σχηματισμού κοπαδιού στην φύση (Engeszer *et al.*, 2007), αλλά και σε εργαστηριακές συνθήκες (Gerlai *et al.*, 2000; Miller and Gerlai, 2007). Έχει αποδειχθεί πως η συνοχή του κοπαδιού αυξάνεται όταν τα άτομα εκτίθενται σε επικίνδυνες ή στρεσογόνες συνθήκες (Canzian *et al.*, 2017; Fontana *et al.*, 2018), ενώ και η έκθεση σε αγχολυτικές ουσίες, όπως αντικαταθλιπτικά, επιδρά επίσης στη συνεκτικότητα του κοπαδιού (Gebauer *et al.*, 2011). Στους δύο πληθυσμούς κυρίαρχων και υποτελών ατόμων που προέκυψαν από το πείραμα δυαδικής αγωνιστικής συμπεριφοράς έγινε εκτίμηση της συνοχής του κοπαδιού. Η εκτίμηση της συνοχής του κοπαδιού πραγματοποιήθηκε με τη βιντεοσκόπηση των μητρικών δεξαμενών για μισή ώρα σε τρία χρονικά σημεία εντός 8 ωρών και με την περαιτέρω εξαγωγή των καρτέ του βίντεο (snapshots) κάθε 30 δευτερόλεπτα. Οι εικόνες που προέκυψαν αναλύθηκαν μέσω του λογισμικού ImageJ, όπου για κάθε φωτογραφία υπολογίστηκε το εμβαδό του κοπαδιού.

Δοκιμασία εξερευνητικής συμπεριφοράς

Στη συνέχεια, τα άτομα των δύο πειραματικών ομάδων (κυρίαρχα και υποτελή) εκτέθηκαν στη δοκιμασία εξερευνητικής συμπεριφοράς. Χρησιμοποιήθηκε μία ειδικά κατασκευασμένη γυάλινη παραλληλόγραμμη δεξαμενή των 250 L, η οποία είχε σχεδιαστεί έτσι ώστε να αποτελείται από 5 τμήματα (**Εικόνα 2.2**) (Sailer *et al.*, 2012). Το κάθε τμήμα της δεξαμενής χωριζόταν από το επόμενο με ένα μαύρο διαχωριστικό το οποίο διέθετε μία δίοδο, ειδικά σχεδιασμένη από κομμένα κομμάτια σωλήνων, προκειμένου να δίνεται η δυνατότητα στο ψάρι να μετακινείται από το ένα τμήμα της δεξαμενής στο επόμενο, χωρίς όμως να έχει οπτική επαφή με το τμήμα της δεξαμενής στο οποίο εισέρχεται. Το πρωτόκολλο προέβλεπε τη μεταφορά της κάθε πειραματικής ομάδας, αποτελούμενη από 17 άτομα, στο πρώτο τμήμα της δεξαμενής, με αποκλεισμένη τη δίοδο στο δεύτερο τμήμα. Τα ψάρια παρέμεναν και ταΐζονταν στο αρχικό αυτό κομμάτι για μία μέρα, έτσι ώστε να εξοικειωθούν

με το καινούριο περιβάλλον. Την επόμενη μέρα, η δίοδος για το δεύτερο τμήμα άνοιγε και τα ψάρια αφήνονταν να κινηθούν στον χώρο ελεύθερα για συνολικά 7 ημέρες. Ως «εξερευνητικά», χαρακτηρίστηκαν τα άτομα τα οποία με το πέρας των 7 ημερών, είχαν φτάσει στο 4^ο ή 5^ο κομμάτι της δεξαμενής. Ως «μη εξερευνητικά» χαρακτηρίστηκαν τα zebrafish τα οποία μέχρι και το τέλος της δοκιμασίας, δεν βγήκαν ποτέ από το πρώτο τμήμα της δεξαμενής. Με την ολοκλήρωση αυτής της σειράς πειραμάτων, τα άτομα πλέον διαχωρίστηκαν σε 4 πειραματικές ομάδες, «εξερευνητικά κυρίαρχα», «εξερευνητικά υποτελή», «μη εξερευνητικά κυρίαρχα», «μη εξερευνητικά υποτελή».



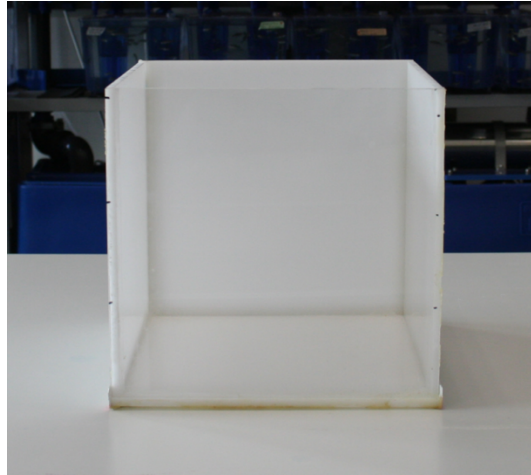
Εικόνα 2.2 | Δεξαμενή εξερευνητικής συμπεριφοράς (διαστάσεων 175 x 35 x 30 cm).

Δοκιμασία νεοφανούς δεξαμενής (novel tank test)

Τα άτομα κάθε μίας από τις 4 ομάδες που προέκυψαν, εκτέθηκαν στη δοκιμασία νεοφανούς δεξαμενής. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο εστιάζει στη μελέτη της αγχώδους συμπεριφοράς των ενηλίκων zebrafish, παρατηρώντας την τάση κάθετης εξερεύνησης τους (Levin *et al.*, 2007). Ο σχεδιασμός του έχει βασιστεί σε ευρέως χρησιμοποιούμενα πρωτόκολλα των τρωκτικών, όπως η δοκιμασία υπερυψωμένου λαβυρίνθου (elevated plus maze) και ανοιχτού πεδίου (open field test) (Stewart *et al.*, 2010). Βασίζεται στο γεγονός πως η έκθεση ενηλίκων zebrafish σε ένα καινούριο και άγνωστο περιβάλλον πυροδοτεί την έκφραση συμπεριφορών αποφυγής συνυφασμένων με ένα ευρύ ηθολογικό φαινότυπο αγχώδους τύπου. Υπό αυτές τις συνθήκες, τα zebrafish τείνουν να παραμένουν στον πυθμένα της δεξαμενής, συνήθως ακινητοποιημένα ή με κίνηση περιορισμένη στο κατώτερο αυτό τμήμα της δεξαμενής. Όσο ο χρόνος περνά, τα άτομα αρχίζουν να κινούνται πιο ελεύθερα, εξερευνώντας τα ανώτερα τμήματα της δεξαμενής. Για τον έλεγχο της συγκεκριμένης ηθολογικής απόκρισης, τα ψάρια είναι απαραίτητο να δοκιμαστούν σε δεξαμενές με τις οποίες δεν έχουν έρθει ξανά σε επαφή και οι οποίες αποτελούν ένα άγνωστο περιβάλλον.

Οι δεξαμενές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κυβικές (διαστάσεων 20 x 20 x 20 cm) κατασκευασμένες από λευκό πλεξιγκλάς πάχους 5 mm, με την μία πλευρά του κύβου διαφανή

(**Εικόνα 2.3**), επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο την παρακολούθηση της κίνησης του ψαριού στην κάθετη στήλη του νερού. Το κάθε ψάρι μεταφέρθηκε από την μητρική του δεξαμενή στην συγκεκριμένη κατασκευή και αφέθηκε να κινηθεί ελεύθερα για 6 λεπτά, κατά τη διάρκεια των οποίων η συμπεριφορά του βιντεοσκοπήθηκε, με την κάμερα τοποθετημένη μπροστά από την δεξαμενή. Με το πέρας των 6 λεπτών, το ψάρι επέστρεψε στην μητρική του δεξαμενή και η πειραματική κατασκευή άδειαζε, πλενόταν και επαναχρησιμοποιούνταν.



Εικόνα 2.3 | Νεοφανής δεξαμενή.

Η επεξεργασία των βιντεοσκοπήσεων από τις δοκιμασίες νεοφανούς δεξαμενής έγινε με τη χρήση του ειδικού λογισμικού ανάλυσης της συμπεριφοράς, Ethovision XT14 (Noldus XT, Wageningen, Netherlands). Η δεξαμενή χωρίστηκε σε 3 ίσα τμήματα τα οποία ορίστηκαν ως κατώτερη, μέση και ανώτερη ζώνη. Οι παράμετροι που ποσοτικοποιήθηκαν ήταν η μέση ταχύτητα (mean velocity, cm s^{-1}), η συνολική απόσταση που διένυσε το άτομο κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας (total distance moved, cm), η λανθάνουσα περίοδος κατά την εισαγωγή του ατόμου στην κατασκευή μέχρι και την πρώτη είσοδό του στην ανώτερη ζώνη (latency to first, s), ο χρόνος παραμονής και η συχνότητα εισόδου στην ανώτερη ζώνη (duration in upper zone (s), frequency to upper zone) και ο χρόνος παραμονής στην κατώτερη ζώνη (duration in lower zone (s)). Οι συνολικοί χρόνοι παραμονής στις ζώνες μετατράπηκαν στη συνέχεια σε ποσοστό (%) επί της συνολικής διάρκειας της δοκιμασίας.

2.2.3. Στατιστική ανάλυση

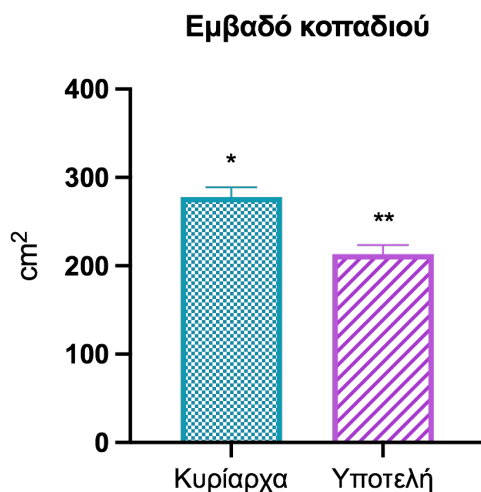
Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SigmaStat v3.1 (Jandel Scientific). Όλα τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου (SEM). Αρχικά τα δεδομένα ελέγχθηκαν ως προς την κανονικότητα της κατανομής τους (normality) και την ισότητα των διασπορών τους (homogeneity), και στις περιπτώσεις όπου κρίθηκε αναγκαίο

τροποποιήθηκαν λογαριθμικά. Τα δεδομένα από τη συνοχή του κοπαδιού αναλύθηκαν με Student's t – test, ενώ η ανάλυση των ποσοστών εξερευνητικών ή μη ατόμων έγινε με έλεγχο χ^2 (chi – square test). Τα συμπεριφορικά δεδομένα από τη δοκιμασία νεοφανούς δεξαμενής αναλύθηκαν με ανάλυση διασποράς για δύο παράγοντες (two-way analysis of variance, ANOVA). Στις περιπτώσεις των στατιστικά σημαντικών διαφορών ($P < 0.05$), η αναγνώριση των στατιστικά σημαντικών ομάδων έγινε με τους ελέγχους πολλαπλών συγκρίσεων Holm-Sidak's και Tukey's. Τα γραφήματα δημιουργήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Graph Pad Prism 6.03 (GraphPad Software, Inc, USA).

2.3. Αποτελέσματα

2.3.1. Συνοχή κοπαδιού κυρίαρχων και υποτελών

Η συνοχή του κοπαδιού, όπως εκφράστηκε με τον προσδιορισμό του εμβαδού του κοπαδιού, ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη ($P < 0.001$) στα κυρίαρχα zebrafish (277.7 ± 11.02 , $n = 38$) σε σχέση με τα υποτελή άτομα (213.2 ± 10.2 , $n = 39$; **Εικόνα 2.4**).



Εικόνα 2.4 | Εμβαδό κοπαδιού κυρίαρχων και υποτελών zebrafish. Η κάθε ράβδος συμβολίζει τον μέσο όρο \pm S.E.M. Διαφορετικοί αστερίσκοι σημαίνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων.

2.3.2. Δοκιμασία εξερευνητικότητας

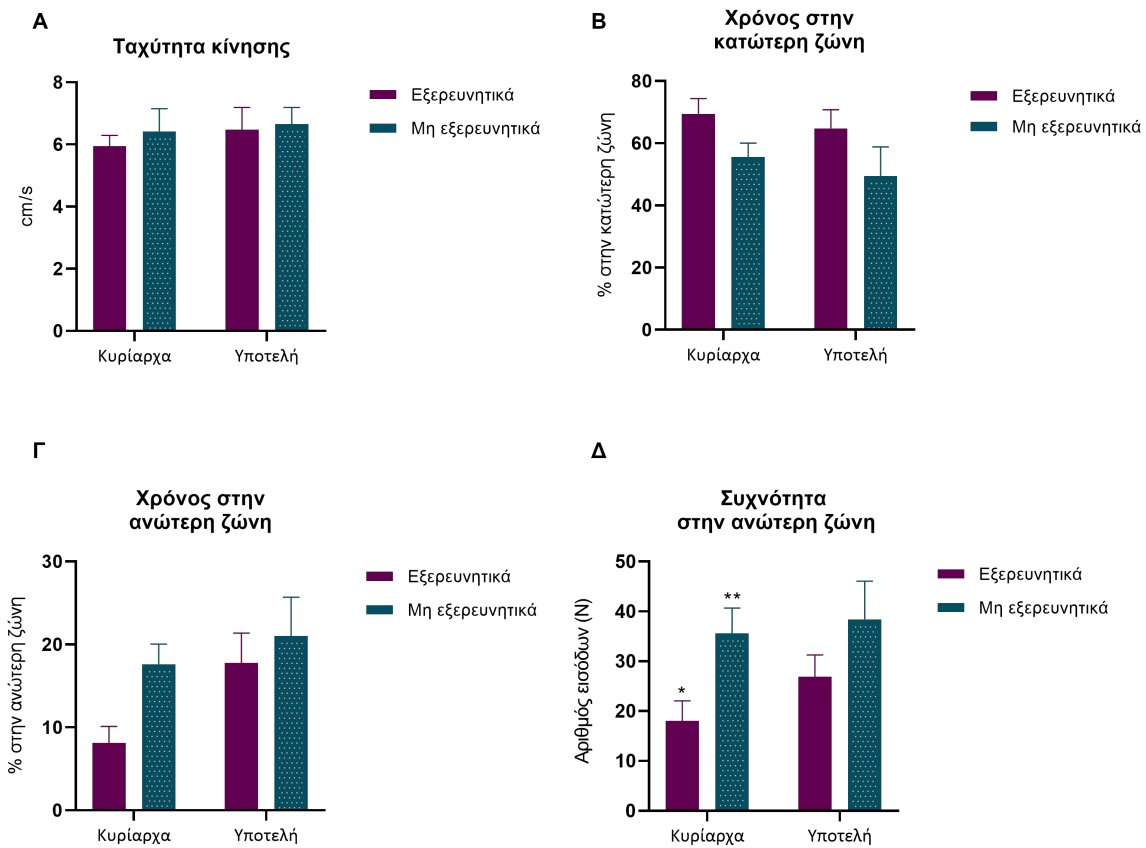
Τα κυρίαρχα και υποτελή άτομα που προέκυψαν από τη δοκιμασία δυαδικής αγωνιστικής συμπεριφοράς δοκιμάστηκαν στην εξερευνητική δεξαμενή και τα ποσοστά που προέκυψαν φαίνονται στον Πίνακα 2.2. Η στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε δεν έδειξε κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων.

Πίνακας 2.2 | Ποσοστό κυρίαρχων και υποτελών ενηλίκων zebrafish που αναγνωρίστηκαν ως εξερευνητικά και μη εξερευνητικά.

Κυρίαρχα		Υποτελή	
<i>Εξερευνητικά</i>	<i>Μη εξερευνητικά</i>	<i>Εξερευνητικά</i>	<i>Μη εξερευνητικά</i>
47.06 %	41.18 %	52.94 %	41.18 %

2.3.3. Δοκιμασία νεοφανούς δεξαμενής

Δεν εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ταχύτητα των ατόμων κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας νεοφανούς δεξαμενής (**Εικόνα 2.5 Α**). Εντοπίστηκε όμως στατιστικά σημαντική διαφορά ($F_{1,30} = 5.284$, $P = 0.029$; **Εικόνα 2.5 Β**) μεταξύ των εξερευνητικών και μη εξερευνητικών ατόμων ως προς τον χρόνο που πέρασαν στον πυθμένα της δεξαμενής. Ως προς τον χρόνο που πέρασαν στην ανώτερη ζώνη της δεξαμενής, δεν εντοπίστηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των κυρίαρχων και υποτελών ατόμων, αν και τα εξερευνητικά κυρίαρχα άτομα (18 ± 4.1 , $n = 8$) είχαν σημαντικά χαμηλότερη συχνότητα εισόδου στην ανώτερη ζώνη της δεξαμενής ($F_{1,30} = 7.130$, $P = 0.012$; **Εικόνα 2.5 Δ**) σε σύγκριση με τα κυρίαρχα μη εξερευνητικά (35.6 ± 5.1 , $n = 9$).



Εικόνα 2.5| Δοκιμασία νεοφανούς δεξαμενής κυρίαρχων και υποτελών, εξερευνητικών και μη εξερευνητικών ατόμων. (Α) Ταχύτητα κίνησης στο σύνολο της δοκιμασίας, (Β) χρόνος που πέρασαν στην κατώτερη ζώνη της δεξαμενής, (Γ) χρόνος που πέρασαν και (Δ) συχνότητα εισόδου στην ανώτερη ζώνη της δεξαμενής. Η κάθε ράβδος συμβολίζει τον μέσο όρο \pm S.E.M. Διαφορετικά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ κυρίαρχων και υποτελών, ενώ διαφορετικοί αστερίσκοι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ εξερευνητικών και μη εξερευνητικών ατόμων ($P < 0.05$).

2.4. Συζήτηση

Τα αποτελέσματα από το σύνολο των συμπεριφορικών δοκιμασιών σε κυρίαρχα και υποτελή άτομα zebrafish δεν κατάφεραν να δείξουν μία συνέπεια στην απόκριση των προδραστικών και αναδραστικών ατόμων. Τα άτομα των δύο ηθολογικών προτύπων φάνηκε να εμφανίζουν διαφορές στη συνοχή του κοπαδιού τους, αλλά όχι στην εξερευνητική τους συμπεριφορά. Τέλος, ύστερα από έκθεση στο άγνωστο περιβάλλον της νεοφανούς δεξαμενής τα εξερευνητικά άτομα των δύο ηθολογικών προτύπων εκδήλωσαν έναν πιο αγχώδη φαινότυπο σε σύγκριση με τα μη εξερευνητικά.

Πιο συγκεκριμένα, τα υποτελή άτομα που προέκυψαν από τη δοκιμασία δυαδικής αγωνιστικής συμπεριφοράς είχαν σημαντικά μεγαλύτερη συνοχή κοπαδιού σε σύγκριση με τα κυρίαρχα, όπως αυτό εκτιμήθηκε μέσω του εμβαδού του κοπαδιού. Η συμπεριφορά κοπαδιού αποτελεί μία έκφανση της κοινωνικής συμπεριφοράς στο zebrafish και χαρακτηρίζεται από μία δυναμικότητα, με το κάθε

μέλος να παρακολουθεί τα υπόλοιπα προκειμένου να προσαρμόσει τη θέση και την κίνησή του εντός της ομάδας (Miller and Gerlai, 2007). Στο zebrafish η συμπεριφορά κοπαδιού φαίνεται πως αλλάζει ως απόκριση σε φαρμακολογικούς και πειραματικούς χειρισμούς, αλλά και σε περιβαλλοντικές μεταβολές. Μερικοί από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που καθορίζουν τον σχηματισμό κοπαδιού στα zebrafish είναι η βλάστηση, η ταχύτητα ροής του νερού, η θερμοκρασία, η γεωγραφική τοποθεσία, η θήρευση και η διαθεσιμότητα της τροφής (Ruhl and McRobert, 2005; Miller and Gerlai, 2007; Orger and de Polavieja, 2017; Groneberg *et al.*, 2020). Από φαρμακολογική άποψη, η προσθήκη στη δεξαμενή φερομόνης συναγερμού προκαλεί μία ταχεία και σύντομη αποδιάταξη της ομάδας, η οποία ακολουθείται από μία σταδιακή και μακρόχρονη αύξηση στη συνοχή του κοπαδιού (Stewart *et al.*, 2015). Την ίδια δράση έχει και η οπτική επαφή με κάποιο θηρευτή. Επιπροσθέτως, έχει φανεί πως κάποια στελέχη αγρίου τύπου εμφανίζουν διαφορές στον σχηματισμό των κοπαδιών τους, με τα zebrafish άγριας προέλευσης (Wright *et al.*, 2006) και TL (Podhorna and Brown, 2002) να διακρίνονται από μία τάση μεγαλύτερης συνοχής στο κοπάδι τους σε σχέση με τα στελέχη αγρίου τύπου AB.

Στη βιβλιογραφία, οι έρευνες έκφρασης της συνοχής του κοπαδιού σε συνάρτηση με τα ηθολογικά πρότυπα εστιάζουν κυρίως στον ηθολογικό άξονα τολμηρότητας – ντροπαλότητας, με τα κοπάδια των τολμηρών ατόμων να χαρακτηρίζονται από σημαντικά υψηλότερα επίπεδα κινητικότητας, χωρίς όμως να έχει διερευνηθεί εάν εντοπίζονται διαφορές στη συνοχή του κοπαδιού. Επίσης, μία συνθήκη που παρατηρείται σε αρκετά είδη τελεόστεων είναι πως τόσο τα τολμηρά όσο και τα ντροπαλά άτομα δείχνουν ισχυρή προτίμηση εισόδου σε ομάδες τολμηρών ατόμων (Harcourt *et al.*, 2009). Η προδραστική συμπεριφορά αντικατοπτρίζει το αρχικό κίνητρο για κοινωνική αλληλεπίδραση, κι έτσι εκφράζεται η υπόθεση πως τα προδραστικά άτομα (τολμηρά, εξερευνητικά, διερευνητικά) τείνουν να είναι πιο κοινωνικά από τα αναδραστικά (ντροπαλά, φοβισμένα, νεοφοβικά). Σε κάποια είδη, η εξερευνητικότητα και η τολμηρότητα, όντως συνδέονται με ισχυρή τάση σχηματισμού κοπαδιού (Cote *et al.*, 2010; Smith and Blumstein, 2010) και με γενική συνεργατικότητα σε κοινωνικά είδη πτηνών (Scheid and Noë, 2010) και θηλαστικών (English *et al.*, 2010). Φυσικά όμως, το πώς θα εκφραστεί ο προδραστικός φαινότυπος καθορίζεται από την εγγενή κοινωνική συμπεριφορά του κάθε είδους (Sih *et al.*, 2004; Yewers *et al.*, 2016). Στην περίπτωσή μας, μικρότερη συνοχή στα κοπάδια των κυρίαρχων ατόμων φαίνεται να υποδηλώνει πως μία ομάδα με νικητές από δυαδικές αγωνιστικές αλληλεπιδράσεις δεν αποτελεί απαραίτητα και έναν πληθυσμό τολμηρών ατόμων zebrafish.

Δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της εξερευνητικής τάσης κυρίαρχων και υποτελών zebrafish εντός της ειδικά σχεδιασμένης κατασκευής. Η τάση ενός ζώου να εξερευνά κατά τη διάρκεια απρόβλεπτων και επικίνδυνων καταστάσεων αποτελεί μία ισχυρή ένδειξη του ηθολογικού του προτύπου, με την υψηλή εξερευνητική συμπεριφορά να θεωρείται χαρακτηριστική

του προδραστικού ηθολογικού προτύπου (Øverli *et al.*, 2007; Koolhaas *et al.*, 2010). Η κατηγοριοποίηση σε τολμηρά και ντροπαλά ηθολογικά προφίλ υλοποιείται στο zebrafish με βάση την εγγενή τάση των ατόμων να εμπλέκονται σε συνθήκες ρίσκου και κατ' επέκταση να εξερευνούν καινούρια και άγνωστα περιβάλλοντα (Dahlbom *et al.*, 2011; Guayasamin, 2013). Ενήλικα zebrafish που έχουν διαχωριστεί σε εξερευνητικά και μη εξερευνητικά μέσω της ηθολογικής δεξαμενής πέντε τμημάτων που χρησιμοποιήθηκε και στο συγκεκριμένο πείραμα, δεν παρουσιάζουν κάποια διαφορά στα επίπεδα κινητικότητάς τους, όμως αποκρίνονται διαφορετικά στην παρουσία ενός θηρευτή (Sailer *et al.*, 2012). Πιο συγκεκριμένα, υπό συνθήκες οπτικής επαφής με τον θηρευτή, τα χαρακτηρισμένα ως εξερευνητικά άτομα έχουν μικρότερη κινητικότητα σε σχέση με τα μη εξερευνητικά, όπως και υψηλότερη τολμηρότητα.

Η απουσία διαφορών στην εξερευνητικότητα κυρίαρχων και υποτελών ατόμων παρουσιάζει μία ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης. Είναι απαραίτητη η εκτίμηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης στα άτομα που είναι χαρακτηρισμένα ως εξερευνητικά και μη, προκειμένου να μπορέσουμε να σχηματίσουμε μία εικόνα ως προς το επίπεδο καταπόνησης της κάθε ομάδας. Επιπλέον, η εκτίμηση των επιπέδων κορτιζόλης στο νερό στα διάφορα τμήματα της συγκεκριμένης δεξαμενής θα βοηθούσε προς την περαιτέρω κατανόηση της έντασης της καταπόνησης των ατόμων που κινούνται κατά μήκος της κατασκευής.

Στη δοκιμασία νεοφανούς δεξαμενής δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην κινητικότητα μεταξύ εξερευνητικών και μη εξερευνητικών ατόμων των δύο ηθολογικών προτύπων, όπως αυτή εκτιμήθηκε μέσω της ταχύτητας κίνησης εντός της δεξαμενής. Διαφορές όμως εντοπίστηκαν μεταξύ των ηθολογικών προτύπων στο χρόνο που πέρασαν στο ανώτερο τμήμα της δεξαμενής, με τα υποτελή συνολικά να εξερευνούν περισσότερο αυτή τη ζώνη. Τέλος, η συχνότητα εισόδου στην ανώτερη αυτή ζώνη ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στα μη εξερευνητικά κυρίαρχα άτομα σε σχέση με τα εξερευνητικά άτομα του ίδιου ηθολογικού προτύπου. Τα κυρίαρχα άτομα εμφάνισαν ουσιαστικά έναν πιο επιφυλακτικό και αγχώδη φαινότυπο σε συνθήκες αγνώστου περιβάλλοντος, όπως και τα μη εξερευνητικά άτομα.

Η δοκιμασία νεοφανούς δεξαμενής αποτελεί μία δοκιμασία εκτίμησης της εξερευνητικής τάσης στην κάθετη στήλη του νερού καθώς και της στρατηγικής αντιμετώπισης που εμφανίζουν τα άτομα απέναντι σε ένα άγνωστο περιβάλλον. Με την είσοδό τους στη δεξαμενή, τα zebrafish αρχικά εμφανίζουν έναν έντονα αγχώδη συμπεριφορικό φαινότυπο, ο οποίος εκδηλώνεται ως μία γεωτακτική συμπεριφορά με βύθιση στον πυθμένα της δεξαμενής (Cachat *et al.*, 2010). Συνήθως από το δεύτερο λεπτό της δοκιμασίας, τα ψάρια έχουν ξεκινήσει την εξερεύνηση της κάθετης στήλης του νερού, οπότε και έχουν αρχίσει να προσεγγίζουν την επιφάνεια του νερού. Το πρωτόκολλο εκτός από τον αγχώδη συμπεριφορικό φαινότυπο προκαλεί επιπλέον φυσιολογικές αποκρίσεις που σχετίζονται

με το στρες, όπως αυξημένη συγκέντρωση κορτιζόλης και αυξημένο ρυθμό αναπνοής και καρδιακής λειτουργίας (Kalueff *et al.*, 2016). Δεδομένα έκθεσης προδραστικών και αναδραστικών ατόμων σε δοκιμασία νεοφανούς δεξαμενής έχουν δείξει πως τα προδραστικά άτομα περνούν σημαντικά περισσότερο χρόνο στην ανώτερη ζώνη της δεξαμενής, όντας στο σύνολο της δοκιμασίας και πιο κινητικά (Dereje *et al.*, 2012). Σημαντική διαφορά όμως αποτελεί το γεγονός πως τα zebrafish είχαν διαχωριστεί σε προδραστικά και αναδραστικά με βάση τα επίπεδα κινητικότητας τους και όχι με βάση την έκβαση μίας δυαδικής αγωνιστικής αλληλεπίδρασης όπως έγινε στην περίπτωση μας.

Το zebrafish αν και αποτελεί ένα μικρό είδος τελεόστεου εκφράζει ένα αρκετά περίπλοκο ρεπερτόριο κοινωνικής συμπεριφοράς, με περίτεχνη συμπεριφορά ερωτοτροπίας, παροδική εδαφικότητα, πολυάριθμες αγωνιστικές συμπεριφορές και συμπεριφορά κοπαδιού (Darrow and Harris, 2004; Miller and Gerlai, 2007). Οι όροι προδραστικά και αναδραστικά άτομα αποτελούν τα όρια ενός μεγάλου εύρους συμπεριφορών. Ενώ αρχικά περιγράφηκαν για τα τρωκτικά, με το πέρασμα των χρόνων έχουν εντοπιστεί και περιγραφεί σε πολλά είδη σπονδυλωτών (Koolhaas *et al.*, 1999, 2010; Øverli *et al.*, 2007). Τα δύο αυτά ηθολογικά πρότυπα χαρακτηρίζονται από δυο ποιοτικά διαφορετικές συμπεριφορικές αποκρίσεις στο στρες (Sih *et al.*, 2004; Øverli *et al.*, 2007; Koolhaas *et al.*, 2010; Baker *et al.*, 2017). Ο προδραστικός φαινότυπος αποκρίνεται με ενεργή αποφυγή, επιθετικότητα, και συμπεριφορά επιρρεπή στα ρίσκα, ενώ τα αναδραστικά άτομα χαρακτηρίζονται από μειωμένη επιθετικότητα και υψηλά επίπεδα ακινητοποίησης (freezing). Τα προδραστικά άτομα, ως τολμηρά και επιθετικά, εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα να υιοθετήσουν μία κυρίαρχη θέση στις κοινωνικές ιεραρχίες σε σχέση με τα αναδραστικά (Pottinger and Carrick, 1999; Dahlbom *et al.*, 2011; Ariyomo and Watt, 2012).

Τα προδραστικά άτομα αναπτύσσουν εύκολα σταθερές συμπεριφορικές ρουτίνες και είναι λιγότερο ευαίσθητα σε περιβαλλοντικά σημάδια, άρα έχουν ένα πλεονέκτημα σε σταθερά προβλέψιμα περιβάλλοντα, υπερασπιζόμενα τους περιβαλλοντικούς πόρους (όπως φαγητό και καταφύγιο) με επιθετικότητα. Σε αντιδιαστολή με αυτό, τα αναδραστικά άτομα είναι πιο ευέλικτα, καθώς η συμπεριφορά τους ανταποκρίνεται γρήγορα σε αλλαγές του περιβάλλοντος και μεταβαλλόμενες απαιτήσεις. Προκύπτει επομένως πως τα αναδραστικά άτομα έχουν πλεονέκτημα σε μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα όπου οι μεταβολές είναι απρόβλεπτες και οι πόροι σε ζήτηση είναι δύσκολο να μονοπωληθούν (van Oortmerssen *et al.*, 1990; Bolhuis *et al.*, 2004; Ruiz-Gomez *et al.*, 2011). Σε συμφωνία με αυτή τη θεωρία, έχει παρατηρηθεί πως σε πληθυσμούς άγριας πέστροφας, η συχνότητα των προδραστικών ατόμων ήταν υψηλότερη σε μεγάλα ποτάμια με σταθερά και προβλέψιμα περιβάλλοντα (Brelvi *et al.*, 2008). Κατ' επέκταση, τα προδραστικά άτομα φαίνεται να έχουν πλεονέκτημα όταν αναπτύσσονται σε συνθήκες αιχμαλωσίας, κάτι το οποίο αποτυπώνεται και στο zebrafish, με το στέλεχος AB να επιδεικνύει προδραστικές συμπεριφορές με μεγαλύτερη

συχνότητα σε σύγκριση με zebrafish άγριας προέλευσης (Dereje *et al.*, 2012). Εκτός από τις συμπεριφορικές διαφορές, τα προδραστικά και αναδραστικά άτομα διαφέρουν και στην νευροενδοκρινική και αυτόνομη απόκρισή τους στο στρες (Koolhaas *et al.*, 1999, 2010; Øverli *et al.*, 2007). Πιο συγκεκριμένα, τα προδραστικά άτομα αντιδρούν με υψηλά επίπεδα κατεχολαμινών στο πλάσμα και πιο ήπια αύξηση των γλυκοκορτικοστεροειδών τους, ενώ αντίθετα τα αναδραστικά άτομα παρουσιάζουν σε γενικές γραμμές μία πιο ήπια ενεργοποίηση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος και υψηλά επίπεδα γλυκοκορτικοστεροειδών.

Έρευνες στα zebrafish έχουν εδραιώσει την ύπαρξη διακριτών ηθολογικών προτύπων. Η τολμηρότητα έχει συσχετιστεί με προδραστική αντιμετώπιση καταπόνησης και μπορεί να προβλέψει το αποτέλεσμα δυαδικών αλληλεπιδράσεων (μαχών), με τελικό αποτέλεσμα την κοινωνική κυριαρχία σε άγριας προέλευσης zebrafish (Dereje *et al.*, 2012). Σε αυτή τη μελέτη, η τολμηρότητα εκτιμήθηκε με κατηγοριοποίηση των zebrafish με βάση τη συμπεριφορά τους σε ένα άγνωστο περιβάλλον, την τάση τους να αναζητούν καταφύγιο και την προθυμία τους να προσεγγίζουν ένα καινούριο αντικείμενο. Οι Tudorache *et al.* (2013) εντόπισαν διαφορετική ενεργότητα του HPI άξονα σε προδραστικά και αναδραστικά zebrafish. Ύστερα από χρόνια έκθεση σε στρεσογόνο παράγοντα, τα αναδραστικά άτομα έδειξαν υψηλότερα επίπεδα κορτιζόλης σε σύγκριση με τα προδραστικά άτομα. Επιπλέον, η επαναφορά σε επίπεδα ηρεμίας της κορτιζόλης ήταν πιο αργή στα αναδραστικά άτομα.

Η έκφραση ενός πιο αγχώδους συμπεριφορικού προφίλ των εξερευνητικών ατόμων στη δοκιμασία νεοφανούς δεξαμενής αποτελεί μία ένδειξη για επιπλέον μελέτη του συγκεκριμένου φαινοτύπου καθώς και του πειραματικού σχεδιασμού εκτίμησης της εξερευνητικής συμπεριφοράς. Πέραν από τη θεώρηση της εξερευνητικότητας ως έκφραση της τολμηρότητας, υπάρχει η φιλοσοφική θεώρησή της ως ανάγκη μείωσης της αβεβαιότητας του περιβάλλοντος (Gershman, 2019). Εξάλλου με βάση τη θεωρία της εντροπίας, οι οργανισμοί εμφανίζουν ισχυρή τάση αποφυγής των εκπλήξεων και ανάγκη επίλυσης της αβεβαιότητας του περιβάλλοντός τους (Peters *et al.*, 2017). Υπάρχει λοιπόν η πιθανότητα, τα εξερευνητικά άτομα να προσεγγίζουν τα άγνωστα τμήματα της δεξαμενής με κίνητρο τη μείωση της αβεβαιότητας και του υψηλού άγχους που τη συνοδεύει. Εάν αυτό ισχύει, υπάρχει περίπτωση η μη εξερεύνηση των άγνωστων τμημάτων της κατασκευής να υποδηλώνει μειωμένο άγχος για την αβεβαιότητα του περιβάλλοντος; Προκειμένου να διαλευκανθεί αυτό, είναι σημαντικό να εκτιμηθεί η συγκέντρωση της κορτιζόλης στο νερό στα διάφορα τμήματα της συγκεκριμένης κατασκευής ώστε να φανεί εάν η εξερεύνηση του περιβάλλοντος χώρου μειώνει τα πιθανά υψηλά επίπεδα στρες των χαρακτηρισμένων ως εξερευνητικών ατόμων.

Συμπερασματικά, οι νικητές ή χαμένοι μίας δυαδικής αγωνιστικής αλληλεπίδρασης δεν μπορούν με σιγουριά να αποτελέσουν έναν πληθυσμό προδραστικών και αναδραστικών ατόμων αντίστοιχα. Η απόκρισή τους σε νεοφανή περιβάλλοντα δεν εμφάνισε τη συνέπεια ενός προδραστικού ή

αναδραστικού ηθολογικού προτύπου. Η έκβαση της συγκεκριμένης αλληλεπίδρασης φαίνεται πως επηρεάζεται από παράγοντες που παραμένουν ακόμα άγνωστοι και της αποδίδουν μία ρευστότητα, καθώς φαίνεται πως ένα άτομο μπορεί να καταλάβει διαφορετικό ρόλο στην κοινωνική αυτή ιεραρχία εάν αλλάξει ζευγάρι. Επομένως, είναι ανάγκη να χρησιμοποιηθεί διαφορετική μέθοδος αναγνώρισης προδραστικών και αναδραστικών ατόμων, ώστε να μελετηθούν εκτενέστερα τα λοιπά χαρακτηριστικά του κάθε ηθολογικού προτύπου.

Κεφάλαιο 3. Επίδραση φλουοξετίνης στην αγωνιστική συμπεριφορά σε ενήλικα zebrafish

3.1. Εισαγωγή

Η αγωνιστική συμπεριφορά εκτείνει βαθιά τις ρίζες της στην εξέλιξη και τη δαρβινική καταλληλότητα (fitness), δεδομένου της ουσιαστικά προσαρμοστικής της φύσης (Oliveira *et al.*, 2011). Επιθετικές συμπεριφορές έχουν παρατηρηθεί ευρέως σε ένα μεγάλο αριθμό ζωικών ειδών, ειδικότερα όσων ζουν σε κοινωνικές ομάδες (Drews, 1993) και διαμορφώνουν ιεραρχίες (Paull *et al.*, 2010). Αρκετά είδη ψαριών εμφανίζουν επιθετικότητα κατά την προσπάθειά τους να αποκτήσουν πρόσβαση σε περιβαλλοντικές πηγές, συντρόφους και περιοχές, καθώς και στην προσπάθειά τους να προστατεύσουν τους απογόνους τους από ποικίλες απειλές (Huntingford and Turner, 1987).

Το zebrafish, *Danio rerio*, στην φύση σχηματίζει κοπάδια, όταν όμως βρίσκεται σε ζευγάρια εκφράζει μία επιθετική και αγχώδους τύπου συμπεριφορά, η οποία τις περισσότερες φορές οδηγεί στον σχηματισμό ιεραρχιών. Παρότι οι ιεραρχίες χαρακτηρίζονται από μία σταθερή σχέση κυρίαρχου – υποτελούς (Larson *et al.*, 2006; Dahlbom *et al.*, 2011; Pavlidis *et al.*, 2011), έχουν περιγραφεί παραδείγματα όπου αντιστρέφονται από ποικίλες περιβαλλοντικές ή διαχειριστικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, αγωγή με αντικαταθλιπτικές ουσίες ανέστρεψε προσωρινά την κυρίαρχη κοινωνική θέση σε είδη σαυρών (Deckel, 1996), ενώ σε καρκινοειδή η έκθεση σε τεχνητή σεροτονίνη μετέτρεψε τα υποτελή σε κυρίαρχα επιθετικά αρσενικά (Huber *et al.*, 1997).

Η σεροτονίνη έχει αποδειχθεί πως διαδραματίζει έναν πολύ σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στο στρες (McKittrick *et al.*, 1995; Emerson *et al.*, 2000), στις κοινωνικές αλληλεπιδράσεις (Kravitz, 2000) και στην επιθετικότητα (Raleigh *et al.*, 1991; Huber *et al.*, 1997) σε μία πληθώρα ειδών. Έχει προταθεί πως η σεροτονεργική δραστηριότητα δρα στην επιθετικότητα με το να την καταστέλλει (Porona, 2008), καθώς είναι αντιστρόφως σχετιζόμενες (Ferris *et al.*, 1997; Wallace Deckel *et al.*, 1998). Ενώ οι επιστημονικές ενδείξεις προτείνουν πως το σεροτονεργικό σύστημα συνδέεται με τη δημιουργία και διατήρηση των κοινωνικών ιεραρχιών, δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο εάν η κοινωνική θέση (rank) είναι η αιτία ή η συνέπεια των διαφορών που παρατηρούνται στη φυσιολογία και στη συμπεριφορά των κυρίαρχων και υποτελών ατόμων (Øverli *et al.*, 2004).

Η φλουοξετίνη αποτελεί έναν εκλεκτικό αναστολέα επαναπρόσληψης της σεροτονίνης (Selective Serotonin Re-uptake Inhibitor – SSRI; Wong *et al.*, 1995), ουσία η οποία χρησιμοποιείται ευρέως ως αντικαταθλιπτικό με στόχο τη θεραπεία της κατάθλιψης, του άγχους και των διαταραχών προσωπικότητας (Rossi *et al.*, 2004). Ο μηχανισμός δράσης της βασίζεται στην αναστολή της επαναπρόσληψης της σεροτονίνης από το προσυναπτικό κύτταρο, αυξάνοντας το εξωκυττάριο επίπεδο της (Vaswani *et al.*, 2003). Η σεροτονίνη έχει χαρακτηριστεί ως ένας πολύ σημαντικός

νευροδιαβιβαστής ο οποίος συνδέεται συχνά με συμπτώματα και σύνδρομα κατάθλιψης (Albert and Benkelfat, 2013; Blier and El Mansari, 2013). Επιπλέον, η σεροτονίνη εμπλέκεται στη ρύθμιση της διάθεσης και της μάθησης (Meneses and Liy-Salmeron, 2012), της όρεξης (Lam *et al.*, 2011), του ύπνου (Portas *et al.*, 2000) και της μνήμης (Seyedabadi *et al.*, 2014).

Η επιθετικότητα χρησιμοποιείται συχνά από κυρίαρχα άτομα προκειμένου να τους επιτρέψει την κατάκτηση εδάφους για αναπαραγωγή και τη διατήρηση της κοινωνικής τους κατάστασης σε σχέση με τα υποτελή άτομα. Επομένως, εντοπίζεται μία στενή σχέση μεταξύ της επιθετικότητας και της κοινωνικής ιεραρχίας (Filby *et al.*, 2010). Η κοινωνική θέση και οι ιεραρχίες κυριαρχίας αποτελούν μία μορφή στρες, το οποίο ορίζεται ως κοινωνικό στρες. Καθώς η χρόνια χορήγηση φλουοξετίνης δρα αγχολυτικά στο zebrafish (Dulawa *et al.*, 2004; Egan *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2013a), η συγκεκριμένη ουσία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα νευροφαρμακολογικό εργαλείο το οποίο ενδεχομένως να τροποποιεί το κοινωνικό στρες που βιώνει ένα ενήλικο zebrafish.

Στόχος του συγκεκριμένου πειράματος ήταν να διερευνηθούν οι διαφορές σε μοριακούς και ενδοκρινικούς ρυθμιστές στα διαφορετικά ηθολογικά πρότυπα καθώς και η σχέση της αγωνιστικής συμπεριφοράς με το σεροτονεργικό σύστημα στα ενήλικα αρσενικά zebrafish. Τα γονίδια των οποίων η έκφραση μελετήθηκε, επιλέχθηκαν εξαιτίας του ρόλου τους στην ενεργοποίηση του άξονα HPI [γλυκοκορτικοστεροειδής υποδοχέας (*gr*) (Pavlidis *et al.*, 2011), αλατοκορτικοστεροειδής υποδοχέας (*mr*) (Alsop and Vijayan, 2008), υποκρετίνη/ορεξίνη (*hcrt*) (Novak *et al.*, 2005), αργινίνη (*avt*) (Fuzzen *et al.*, 2010), προλακτίνη (*prl*) (Pavlidis *et al.*, 2015)], στο σεροτονεργικό σύστημα [*htr1Aa*, *htr1b*, *htr2b*, *slc6a4a*, *slc6a4b*] και στη νευρωνική δραστηριότητα (*c-fos*, *bdnf*) (Pavlidis *et al.*, 2015).

3.2. Υλικά & Μέθοδοι

3.2.1. Χειρισμός και προέλευση πειραματόζωων

Τα zebrafish τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στα συγκεκριμένα πειράματα ήταν άγριας προέλευσης (Σιγκαπούρης) και προμηθεύτηκαν από τοπικό εμπορικό κατάστημα. Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά ψάρια βάρους 0.45 ± 0.12 g ($x \pm SD$). Η εκτροφή τους καθώς και τα σχετικά πειράματα έγιναν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ιχθύων και ακολουθήθηκαν οι ίδιες συνθήκες εκτροφής που περιγράφηκαν στο κεφάλαιο 2.

3.2.2. Πειραματικός σχεδιασμός

Τα ενήλικα zebrafish αναισθητοποιήθηκαν σε 164 mg L^{-1} MS222, ακολούθησε η μέτρηση μήκους και βάρους τους και ένα μικρό τμήμα του ουραίου πτερυγίου τους κόπηκε προκειμένου να διευκολυνθεί η αναγνώρισή τους. Το πείραμα διεξήχθη σε 2 φάσεις. Στην Φάση I, αρσενικά ψάρια με παρόμοιο μήκος (διαφορά μήκους όχι μεγαλύτερη από 1 mm) συνδυάστηκαν σε ζευγάρια και μεταφέρθηκαν σε κυβικά γυάλινα ενυδρεία των 2 L, στα οποία αφέθηκαν 24 ώρες να

αλληλεπιδράσουν. Κάθε δεξαμενή βιντεοσκοπήθηκε για 5 λεπτά και αναλύθηκε η συμπεριφορά του κάθε ζευγαριού. Τα ζευγάρια τα οποία εμφάνισαν επιθετική συμπεριφορά και σταθερές ιεραρχίες κυρίαρχου-υποτελούς χρησιμοποιήθηκαν στην επόμενη πειραματική φάση.

Στην Φάση II, τα ζευγάρια χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, στην ομάδα ελέγχου (ομάδα C, n = 8 ζευγάρια) και σε εκείνη στην οποία χορηγήθηκε φλουοξετίνη (ομάδα F, n = 8 ζευγάρια). Πιο συγκεκριμένα, το κάθε ζευγάρι της ομάδας F μεταφέρθηκε σε μικρές δεξαμενές των 200 ml με 5 mg L⁻¹ φλουοξετίνης (Sigma F-132, Sigma-Aldrich), ενώ το κάθε ζευγάρι της ομάδας C μεταφέρθηκε σε πανομοιότυπες δεξαμενές οι οποίες περιείχαν μόνο νερό, χωρίς κάποιο επιπλέον φαρμακευτικό χειρισμό. Σε όλα τα ζευγάρια, τα κυρίαρχα χωρίζονταν από τα υποτελή με ένα μαύρο δίχτυ το οποίο χώριζε τη δεξαμενή σε δύο ίσα μέρη. Ύστερα από 2 ώρες έκθεσης στην φλουοξετίνη, τα ζευγάρια μεταφέρθηκαν στις αρχικές κυβικές πειραματικές δεξαμενές. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Blaser and Gerlai, 2006), η μέγιστη δόση φλουοξετίνης που χορηγείται σε ενήλικα zebrafish είναι συγκέντρωσης 0.1 mg L⁻¹. Η συγκεκριμένη όμως δόση αφορά πειράματα χρόνιας χορήγησης της φαρμακευτικής ουσίας, διάρκειας συνήθως δύο εβδομάδων. Η υψηλή δόση φλουοξετίνης που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα βασίστηκε σε δεδομένα που έχουν δημοσιευτεί για μύες και επίμυες [5 με 20 mg kg⁻¹, (Blanchard *et al.*, 1997; Conley and Hutson, 2007)], για τελεόστεους, *Leporinus macrocephalus*, [10 mg kg⁻¹; (Barbosa *et al.*, 2012)], *Betta splendens* (Kohlert *et al.*, 2012) και zebrafish [2.5 ή 3 mg kg⁻¹; (Norton *et al.*, 2011; Maximino *et al.*, 2013, 2014)], και τα οποία έδειξαν μία ισχυρή επίδραση στην συμπεριφορά.

Η συμπεριφορά των ζευγαριών παρατηρήθηκε για μία ώρα, βιντεοσκοπήθηκε και στη συνέχεια τα ψάρια και των δύο ομάδων θανατώθηκαν με βύθιση σε νερό με πάγο (1 : 1; (Wallace *et al.*, 2018)). Τα zebrafish ζυγίστηκαν, μετρήθηκε το μήκος τους και έπειτα ελήφθησαν δείγματα εγκεφάλου (ιστοί από δύο άτομα της ίδιας ομάδας και ηθολογικού προτύπου αποτέλεσαν ένα δείγμα), τα οποία βυθίστηκαν σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης. Στη συνέχεια, αφού κόπηκε το κεφάλι και το ουραίο πτερύγιο, τα σώματα ζυγίστηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την έναρξη των αναλύσεων προσδιορισμού της κορτιζόλης.

3.2.3. Συμπεριφορική ανάλυση

Το πρωτόκολλο της συγκεκριμένης δοκιμασίας έχει αναλυθεί στο κεφάλαιο 2. Τα δεδομένα από το πείραμα της δυαδικής αγωνιστικής συμπεριφοράς αναλύθηκαν με τη χρήση του λογισμικού VideoLAN – VLC το οποίο προσφέρει τη δυνατότητα αργής ανάλυσης κίνησης. Κυρίαρχη και υποτελής συμπεριφορά ποσοτικοποιήθηκαν με βάση συγκεκριμένες παραμέτρους. Ο χρόνος του κυνηγητού (αναλογικά της συνολικής δοκιμασίας) και ο αριθμός των επιθέσεων σχετίστηκαν με την κυρίαρχη συμπεριφορά. Κυνηγητό, σύμφωνα με τους Paull *et al.* (2010), ορίστηκε ως η «άμεση κίνηση προς

ένα άλλο ψάρι του ενυδρείου το οποίο αντιδρά αυξάνοντας την ταχύτητά του και πιθανώς αλλάζοντας την κατεύθυνσή του». Ως επίθεση χαρακτηρίζεται η επίθεση του κυρίαρχου στο υποτελές με ή χωρίς δάγκωμα (Pavlidis *et al.*, 2011). Το πάγωμα (ακινητοποίηση) σύμφωνα με τους Blaser *et al.* (2006), περιγράφεται ως «η ακινητοποιημένη κατάσταση κατά την οποία κινούνται μόνο τα βράγχια και περιστασιακά και τα μάτια». Τα περιστασιακά ακινητοποίησης παρατηρήθηκαν κυρίως όταν τα υποτελή άτομα ήταν περιορισμένα από τα κυρίαρχα στο κατώτερο τμήμα της δεξαμενής και κυρίως σε μία γωνία, ή σε πιο σπάνιες περιπτώσεις ακριβώς κάτω από την επιφάνεια του νερού.

3.2.4. Προσδιορισμός Κορτιζόλης

Η εκχύλιση της κορτιζόλης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις τεχνικές που περιγράφονται από τους Jesus *et al.* (1991) και Pavlidis *et al.* (2011). Αρχικά, τα δείγματα από τους -20°C τοποθετήθηκαν σε πάγο για να αποφευχθεί η μετάβαση στη θερμοκρασία δωματίου και σε κάθε δείγμα προστέθηκε ανάλογη με το βάρος του (5 x w/v) ποσότητα αλατούχου φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (PBS). Τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση ενός μηχανικού ομογενοποιητή και με την προσθήκη 3 ml διαιθυλεθέρα έγινε η εξαγωγή από 2 x 250 μL του ομογενοποιημένου δείγματος. Οι γυάλινοι σωλήνες με τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους -80°C για 10 λεπτά με αποτέλεσμα να παγώσει η υγρή υδάτινη φάση του εκχυλίσματος. Οι υπερκείμενες φάσεις του διαιθυλεθέρα από το κάθε δείγμα συνδυάστηκαν σε νέους γυάλινους σωλήνες και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο (45°C). Η ανασύσταση των δειγμάτων έγινε με προσθήκη 250 μl ρυθμιστικού διαλύματος ανοσοανάλυσης (EIA). Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους -20°C μέχρι την ημέρα της περαιτέρω ανάλυσής τους (σε κάθε περίπτωση σε λιγότερο από ένα μήνα).

Η κορτιζόλη κάθε δείγματος ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση ενός εμπορικού κιτ ELISA (Cayman Chemical) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ανταγωνιστική σχέση της κορτιζόλης με το σύμπλοκο κορτιζόλης-ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) για ένα περιορισμένο αριθμό θέσεων πρόσδεσης ενός μονοκλωνικού αντισώματος ειδικευμένο για την κορτιζόλη αποτελεί τη βάση της μεθόδου. Το σύμπλοκο κορτιζόλης-ακετυλοχολινεστεράσης δρα ως ιχνηθέτης της στεροειδούς ορμόνης. Σε κάθε πηγάδι της αντίδρασης, η συγκέντρωση του ιχνηθέτη που χρησιμοποιείται είναι σταθερή με την συγκέντρωση κορτιζόλης των δειγμάτων να είναι άγνωστη. Επομένως, η ποσότητα ιχνηθέτη που μπορεί να προσδεθεί στο μονοκλωνικό αντίσωμα της κορτιζόλης είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης της ορμόνης που βρίσκεται σε κάθε πηγάδι, άρα και σε κάθε δείγμα. Τα σύμπλοκα αντισώματος και κορτιζόλης, ελεύθερης και ιχνηθέτη, προσδέονται στο υπόστρωμα του πηγαδιού που είναι επενδυμένο με στρώμα ειδικού αντισώματος. Μετά από 24 ώρες, χρησιμοποιείται ένα διάλυμα πλύσης με το οποίο απομακρύνονται τα ελεύθερα αντιδραστήρια και προστίθεται το αντιδραστήριο Ellman's. Το παράγωγο της ενζυμικής αντίδρασης έχει κίτρινη απόχρωση και απορροφάει το φως στα 412 nm. Φασματοφωτομετρικά καθορίζεται η ένταση του

χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της ποσότητας του ιχνηθέτη της κορτιζόλης που έχει προσδεθεί στο πηγάδι. Παράλληλα με τη μέτρηση των δειγμάτων του πειράματος χρησιμοποιούνται και δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων, των οποίων οι απορροφήσεις χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της καμπύλης της μέτρησης. Η καμπύλη αυτή δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού των άγνωστων συγκεντρώσεων κορτιζόλης στα δείγματα. Σε όλα τα δείγματα έγινε αραιώση 1:10 με διάλυμα EIA (90 μl EIA και 10 μl δείγμα).

3.2.5. Απομόνωση RNA από εγκέφαλο zebrafish

Η απομόνωση του ολικού RNA από τον εγκέφαλο (total RNA) πραγματοποιήθηκε με το RNeasy plus mini kit (Qiagen Inc. CA, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρχικά, ο ιστός μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένα errendorfs με το διάλυμα RLT κατάλληλα διαλυμένο σε β-μερκαπτοαιθανόλη και ομογενοποιήθηκε με τη χρήση ενός ομογενοποιητή χειρός με ρότορα (TissueRuptor, Qiagen Inc. CA, USA). Τα δείγματα ομογενοποιημένου ιστού τοποθετήθηκαν για τρία λεπτά σε φυγόκεντρο (Microcentrifuge Minispin, Eppendorf Inc., USA), στη μέγιστη ταχύτητα των 20.000 g. Το υπερκείμενο που προέκυψε, μεταφέρθηκε σε νέα κατάλληλα αποστειρωμένα errendorf, με επιπλέον προσοχή ώστε να μη μεταφερθεί και η πελέτα. Ακολούθησε σύντομη φυγοκέντρηση των 30 sec στα 15.000 g. Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε RNeasy spin κολώνες, προστέθηκε αιθανόλη 70% και φυγοκεντρήθηκαν για 15 sec στα 15.000 g. Το διάλυμα που φιλτραρίστηκε απομακρύνθηκε, προστέθηκε ένα ρυθμιστικό διάλυμα και ομοίως επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση. Η έκπλυση της κολώνας ολοκληρώθηκε με την προσθήκη ενός δεύτερου ρυθμιστικού διαλύματος και φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα των 20.000 g. Στην τελική φάση πραγματοποιήθηκε έκλυση του καθαρού RNA από την κολώνα με απιονισμένο νερό απαλλαγμένο από RNασες. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -20°C για περαιτέρω ανάλυση.

Το RNA που απομονώθηκε ελέγχθηκε ποσοτικά με μέτρηση της απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας μήκους κύματος 260 nm. Οι απορροφήσεις μήκους κύματος 280 nm και 230 nm έδωσαν πληροφορίες για την ύπαρξη πρωτεϊνικών ή άλλων οργανικών προσμίξεων, αντίστοιχα. Ιδανικά, οι λόγοι A260/A280 και A260/A230 πρέπει να είναι ίσοι με $\cong 2.0$. Η ποιότητα του RNA που προέκυψε από το πρωτόκολλο εξαγωγής ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε διάλυμα 1X TAE.

3.2.6. Σύνθεση cDNA από RNA

Η σύνθεση του DNA με βάση το RNA έγινε με το QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen Inc., CA, USA). Η μέθοδος βασίζεται στη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, ένζυμο με δύο βασικές λειτουργίες, την κατάλυση της αντίστροφης μεταγραφής, σύνθεσης δηλαδή cDNA με βάση το υπάρχον RNA και αποδόμησης των σχηματισθέντων υβριδίων RNA:DNA, χωρίς όμως να δρα στο καθαρό RNA. Ένα μείγμα από συγκεκριμένη ποσότητα του RNA του δείγματος, gDNA Wipeout Buffer

και απιονισμένου νερού απαλλαγμένο από RNAσες επώαστηκε για 2 λεπτά στους 42°C. Στη συνέχεια προστέθηκε το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης, διάλυμα Quantiscript RT και RT Primer Mix και το διάλυμα που προέκυψε επώαστηκε για 15 λεπτά στους 42°C. Η τελική επώαση στους 95°C για 3 λεπτά απενεργοποίησε το ένζυμο και το δείγμα με το cDNA που συντέθηκε χρησιμοποιήθηκε στη μέθοδο της ποσοτικής PCR (qPCR).

3.2.7. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων RNA στα δείγματα

Ο αναλυτικός έλεγχος της ακεραιότητας και ποσότητας του RNA επιτυγχάνεται με την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time PCR, rtPCR). Η μέθοδος της real-time PCR, ή αλλιώς qPCR (quantitative PCR), βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης που χρησιμοποιείται για να μεγεθύνει και ταυτόχρονα να ποσοτικοποιήσει ένα στοχοποιημένο μόριο DNA. Σε αντίθεση με την κλασική PCR, η τεχνική αυτή επιτρέπει την ανίχνευση και μέτρηση της συσσώρευσης του ενισχυμένου προϊόντος καθώς προχωρά η αντίδραση, δηλαδή σε πραγματικό χρόνο κι όχι στο τέλος της αντίδρασης. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός φθορίζοντος μορίου, που προσδένεται σε δίκλινα μόρια DNA και αναφέρει την αύξηση της ποσότητας του DNA με μία αναλογική αύξηση του φθορίζοντος σήματος. Ειδικά σχεδιασμένοι θερμικοί κύκλοι, εξοπλισμένοι με μονάδες αναγνώρισης φθορισμού χρησιμοποιούνται για την παρατήρηση του φθορισμού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Η μετρούμενη φθορίζουσα δραστηριότητα αντικατοπτρίζει την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος σε κάθε κύκλο.

Η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα ήταν η SYBR Green, η οποία προσδένεται χωρίς εξειδίκευση σε δίκλινα μόρια DNA (dsDNA) και διαθέτει μικρή φθορίζουσα δραστηριότητα όταν βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα, αλλά αυξάνεται μέχρι και 1000 φορές με την πρόσδεσή της στο DNA. Επομένως, το ολικό φθορίζον σήμα από την αντίδραση είναι ανάλογο της υπάρχουσας ποσότητας dsDNA και αυξάνεται με τη μεγέθυνση του στόχου. Η SYBR Green I απορροφάει κυανό φως στα 497 nm και εκκρίνει πράσινο φως στα 520 nm. Η αντίδραση έλαβε χώρα στο μηχανήμα real time PCR (CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories, Inc.) του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Στο τέλος κάθε κύκλου, τα επίπεδα φθορισμού μετρούνται με έναν ανιχνευτή καθώς η χρωστική φθορίζει μόνο όταν προσδεθεί σε dsDNA, στο προϊόν δηλαδή της qPCR.

Η σύσταση του μείγματος αντίδρασης ήταν ίδια για όλα τα γονίδια και οι συνθήκες αντίδρασης ήταν 95°C για 3 λεπτά, 36 κύκλοι που περιλάμβαναν 95°C για 20 s (αποδιάταξη), 60°C για 30 s (υβριδισμός) και 72 °C για 20 s (επιμήκυνση). Η βέλτιστη θερμοκρασία ενίσχυσης ορίστηκε εκείνη των 60°C, απόρροια του σχεδιασμού των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν. Τα προϊόντα της αντίδρασης που προέκυψαν επαληθεύτηκε ότι ήταν τα επιθυμητά με την ανάλυση της καμπύλης τήξης, όπου μετράται ο φθορισμός που εκπέμπεται καθώς τα προϊόντα της αντίδρασης θερμαίνονται

σε θερμοκρασία μεγαλύτερη του σημείου τήξεως τους. Χρησιμοποιήθηκε εύρος θερμοκρασιών 65°C με 95°C για το σκοπό αυτό.

Έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων με εκείνα ενός DNA/RNA δείγματος γνωστής συγκέντρωσης υπό μία συγκεκριμένη διαβάθμιση συγκεντρώσεων και κανονικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου στόχου με ένα σταθερά εκφραζόμενο σε κάθε κύτταρο και κατάσταση γονίδιο. Στο συγκεκριμένο πείραμα για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β-ακτίνης. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό πρόγραμμα της συσκευής, Bio-Rad CFX Manager 2.1.

Πίνακας 3.1: Αλληλουχίες ζευγών εκκινητών

<i>Γονίδιο</i>	<i>Εκκινητής F</i>	<i>Εκκινητής R</i>
<i>b-actin</i>	5' TGTCCCTGTATGCCTCTGGT 3'	5' AAGTCCAGACGGAGGATGG 3'
<i>Gr</i>	5' ACAGCTTCTCCAGCCTCAG 3'	5' CCGGTGTTCTCCTGTTTATG 3'
<i>Mr</i>	5' CCCATTGAGGACCAATCAC 3'	5' AGTAGAGCATTGGGCGTTG 3'
<i>c-fos</i>	5' TGAAACTGACCAGCTTGAGGAT 3'	5' GTGTGCGGCGAGGATGAA 3'
<i>Hcrt</i>	5' AGAATCGGTGAAGGTGAGAA 3'	5' GATGGGCAGGTAGCAGAG 3'
<i>Bdnf</i>	5' GGCGAAGAGCGGACGAATATC 3'	5' AAGGAGACCATTAGCAGGACAG 3'
<i>Avt</i>	5' TCGTCTGCCTGCTACATCCA 3'	5' TCCGGCTGGGATCTCTTG 3'
<i>Prl</i>	5' GCTCGGTCTCTGCTGTTG 3'	5' GGTGTTGCGTTCTGGATGT 3'
<i>Htr5-1Aa</i>	5' CAGAGCAGAGCAGCACAAAG 3'	5' TGGTCTGAGAGTTCTGGTCTAATC 3'
<i>Htr5-1b</i>	5' GTGTCGGTGCTCGTGATG 3'	5' CAGCCAGATGTCGCAGATG 3'
<i>Htr5-2b</i>	5' GCTGCTCATTCTTCTGGTCAT 3'	5' GTTAGTGGCGTTCTGGAGTT 3'
<i>slc6a4a</i>	5' GTCTCCAATGGTTATCGCAGTA 3'	5' GATGACCGACAACAGGAAGT 3'
<i>slc6a4b</i>	5' GAATCCTCTGGGCTTGGTAATG 3'	5' GCTGAAGTAGACAATGGTGAAGAT 3'
<i>Orexin</i>	5' TCTACGAGATGCTGTGCCGAG 3'	5' CGTTTGCCAAGAGTGAGAATC 3'

3.2.8. Στατιστική ανάλυση

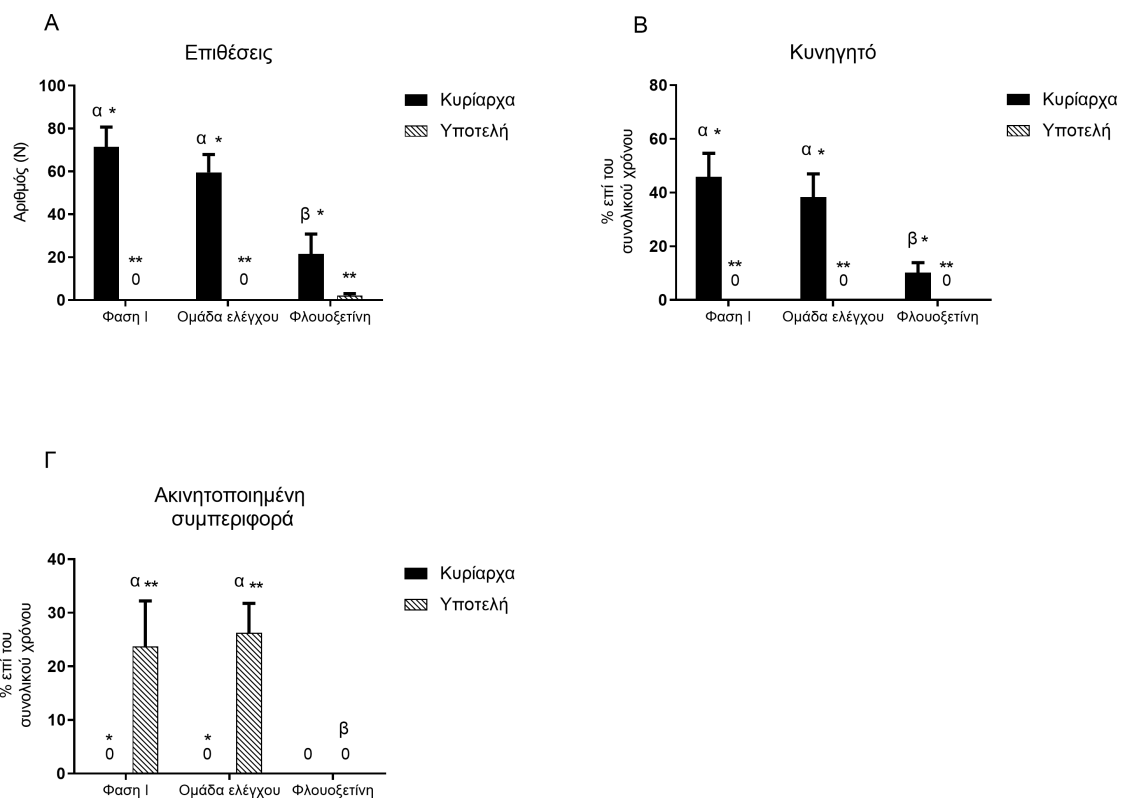
Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SigmaStat v3.1 (Jandel Scientific). Όλα τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου (SEM). Αρχικά, τα δεδομένα ελέγχθηκαν ως προς την κανονικότητα της κατανομής τους (normality) και την ισότητα των διασπορών τους (homogeneity), και στις περιπτώσεις όπου κρίθηκε αναγκαίο τροποποιήθηκαν λογαριθμικά. Τα συμπεριφορικά δεδομένα αναλύθηκαν με ανάλυση διασποράς για δύο παράγοντες (two - way analysis of variance, ANOVA). Ομοίως, η σύγκριση στις παρατηρούμενες

συγκεντρώσεις κορτιζόλης έγινε με ανάλυση διασποράς για δύο παράγοντες. Επίσης, ανάλυση διασπορών για δύο παράγοντες χρησιμοποιήθηκε και για την ανάλυση των δεδομένων από τα σχετικά επίπεδα mRNA έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων. Στις περιπτώσεις των στατιστικά σημαντικών διαφορών ($P < 0.05$), η αναγνώριση των στατιστικά σημαντικών ομάδων έγινε με τους ελέγχους πολλαπλών συγκρίσεων Holm-Sidak's και Tukey's. Τα γραφήματα δημιουργήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Graph Pad Prism 6.03 (GraphPad Software, Inc, USA).

3.3. Αποτελέσματα

3.3.1. Συμπεριφορικά δεδομένα

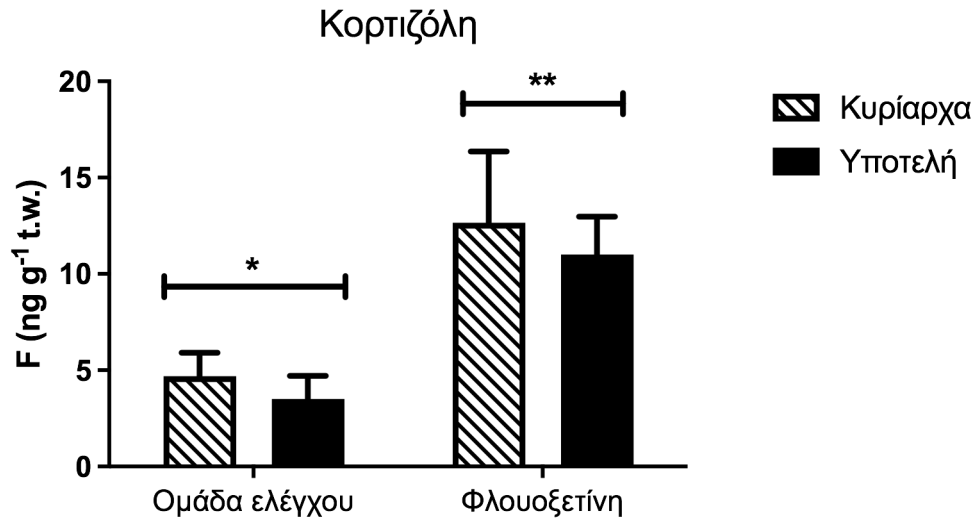
Η χορήγηση φλουοξετίνης επίδρασε σημαντικά στη συμπεριφορά των ζευγαριών zebrafish (**Εικόνα 3.1**). Τα κυρίαρχα άτομα ύστερα από την χορήγηση φλουοξετίνης (21.6 ± 9.2 , $n = 7$) έδειξαν μία μείωση στην επιθετική συμπεριφορά, εκφρασμένη μέσω μίας στατιστικά σημαντικής μείωσης στον αριθμό των επιθέσεων σε σύγκριση με τη συμπεριφορά τους στην φάση I του πειράματος (71.43 ± 9.3 , $n = 7$) ($P < 0.001$; **Εικόνα 3.1 A**). Παράλληλα, η μείωση της επιθετικής συμπεριφοράς ενισχύεται από μία στατιστικά σημαντική μείωση του χρόνου (αναλογικά με την διάρκεια) που πέρασαν να κυνηγούν τα υποτελή άτομα (Φάση I: 45.6 ± 8.8 , $n = 7$; Φλουοξετίνη: 10.2 ± 3.8 , $n = 7$) ($P < 0.001$; **Εικόνα 3.1 B**). Αντιθέτως, τα κυρίαρχα άτομα τα οποία δεν έλαβαν φλουοξετίνη (ομάδα ελέγχου) δεν έδειξαν καμία στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την συμπεριφορά που παρατηρήθηκε στην φάση I, τόσο στον αριθμό των επιθέσεών τους (59.6 ± 8.3 , $n = 7$) όσο και στον χρόνο που πέρασαν κυνηγώντας (38.3 ± 8.7 , $n = 7$). Τα υποτελή όλων των ζευγαριών που έλαβαν φλουοξετίνη, δεν έδειξαν κανένα σημάδι ακινητοποιημένης συμπεριφοράς (freezing) ύστερα από χορήγηση φλουοξετίνης (φάση I: 23.7 ± 8.5 , $n = 7$; Φλουοξετίνη: 0 , $n = 7$; $P = 0.004$), αντιθέτως έδειξαν κάποια μικρά δείγματα επίθεσης εναντίον των κυρίαρχων ατόμων (2 ± 1 , $n = 7$) (**Εικόνα 3.1 Γ**). Ομοίως με τα κυρίαρχα, τα υποτελή της ομάδας ελέγχου δεν έδειξαν καμία μείωση στη συμπεριφορά ακινητοποίησης (26.3 ± 5.5) και κανένα δείγμα αντεπίθεσης στα κυρίαρχα.



Εικόνα 3.1 | Ποσοτικοποίηση της κυρίαρχης και υποτελούς συμπεριφοράς. Η Φάση I αναφέρεται στο κομμάτι του πειράματος πριν τον φαρμακολογικό χειρισμό, η Ομάδα ελέγχου αντιπροσωπεύει την ομάδα των ατόμων που δεν έλαβαν φλουοξετίνη ενώ η Φλουοξετίνη αφορά τα άτομα τα οποία εκτέθηκαν στη φλουοξετίνη. Επιθέσεις (Α) αναφέρονται στον αριθμό των επιθέσεων κατά τη διάρκεια της κάθε δοκιμασίας (5 λεπτά) και κυνηγητό (Β) στη χρονική διάρκεια αναλογικά με το σύνολο της δοκιμασίας όπου το κάθε ψάρι κυνηγούσε τον συγκατοικό του. Η ακινητοποίηση (Γ) αποτελεί την ποσοτικοποίηση της διάρκειας του χρόνου αναλογικά με το σύνολο της δοκιμασίας όπου το ψάρι παρέμεινε ακινητοποιημένο. Στο διάγραμμα απεικονίζονται ο μέσος όρος του χρόνου (%) ή ο αριθμός των γεγονότων (N) ± τυπικό σφάλμα (S.E.M.) (n=8). Οι περιπτώσεις μηδενικού μέσου όρου αποτυπώνονται πάνω από το κάθε γράφημα. Τα γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$) μεταξύ των τριών πειραματικών ομάδων, ενώ οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τις διαφορές μεταξύ των ηθολογικών προτύπων.

3.3.2. Κορτιζόλη

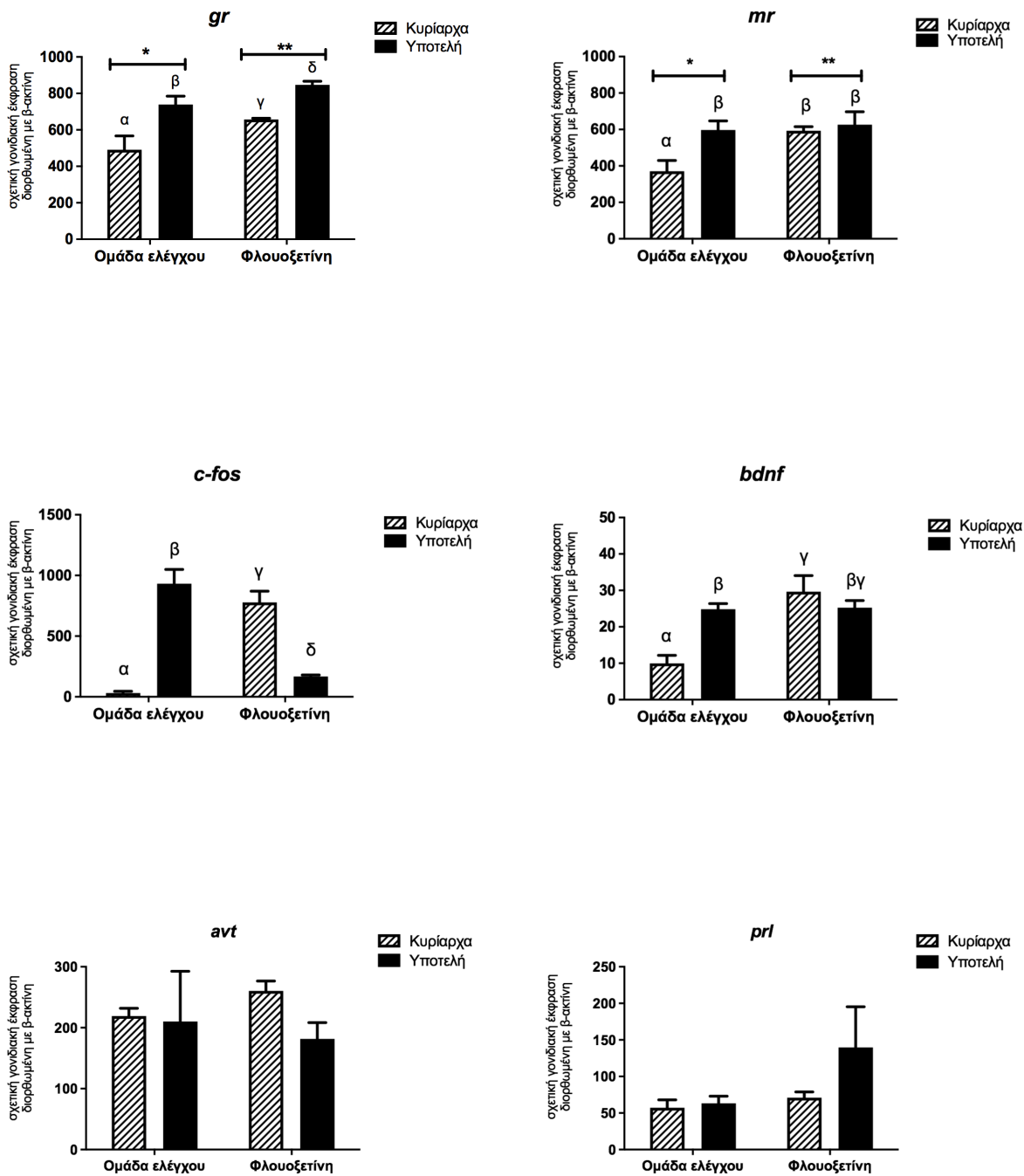
Τα δύο ηθολογικά πρότυπα (κυρίαρχα – υποτελή) δεν έδειξαν καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα κορτιζόλης είτε με τη χορήγηση της φλουοξετίνης είτε χωρίς (Εικόνα 3.2). Η ομάδα στην οποία χορηγήθηκε φλουοξετίνη εμφάνισε σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση κορτιζόλης σώματος και στις δύο ιεραρχικές ομάδες (Κυρίαρχα: 12.7 ± 3.7 , $n = 10$; Υποτελή: 11 ± 1.9 , $n = 8$) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου που δεν έλαβε το σκεύασμα φλουοξετίνης (Κυρίαρχα: 4.7 ± 1.22 , $n = 8$; Υποτελή: 3.5 ± 1.21 , $n = 8$) ($P = 0.004$).



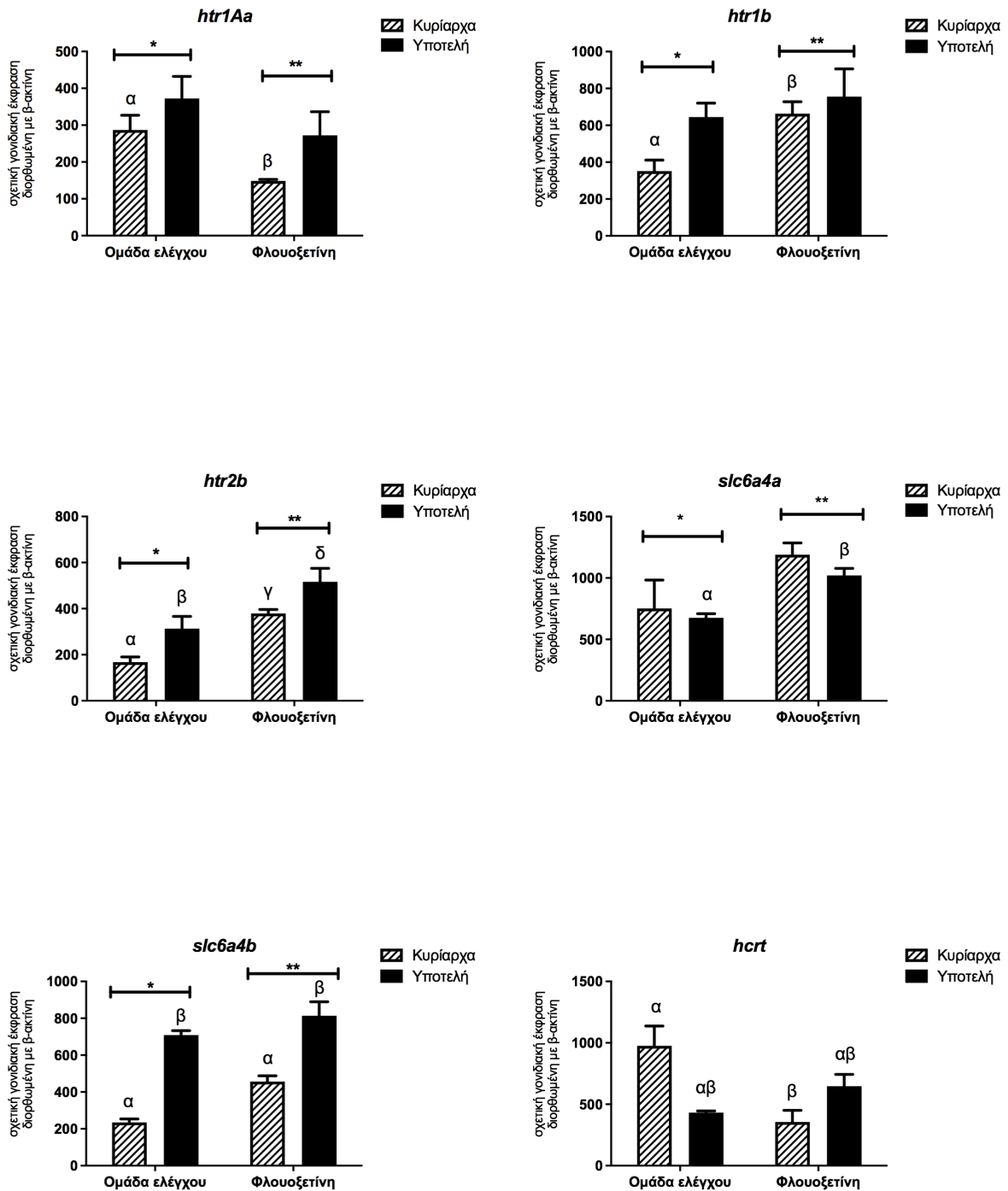
Εικόνα 3.2 | Συγκέντρωση κορτιζόλης (F) σώματος (μέσος όρος \pm S.E.M., $n = 8$ ανά ομάδα) στα ζευγάρια της Ομάδας ελέγχου (χωρίς φαρμακολογικό χειρισμό) και της ομάδας Φλουοξετίνης. Διαφορετικοί αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φαρμακολογικών χειρισμών.

3.3.3. Επίπεδα γονιδιακής έκφρασης μεταξύ κυρίαρχων και υποτελών χωρίς έκθεση σε φλουοξετίνη

Δεν υπήρξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στα μετάγραφα mRNA των γονιδίων *htr1Aa*, *htr1B*, *slc6a4a*, *avt*, *hcrt* και *pri* μεταξύ των κυρίαρχων και υποτελών zebrafish που δεν έλαβαν φλουοξετίνη (non – treated) (Εικόνες 3.3 & 3.4). Εντούτοις, non – treated υποτελή άτομα έδειξαν μία στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης των γονιδίων *gr* (1,5 fold; $P = 0.011$), *mr* (1,6 fold; $P = 0.044$), *c-fos* (30 fold; $P < 0.001$), *bdnf* (2,5 fold; $P = 0.003$), *htr2B* (1,87 fold; $P = 0.023$) και *slc6a4b* (3 fold; $P = 0.007$) σε σύγκριση με τα non-treated κυρίαρχα άτομα.



Εικόνα 3.3 | Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *gr*, *mr*, *c-fos*, *bdnf*, *avt* και *prl* σε δείγματα εγκεφάλων (μέσος όρος \pm S.E.M., $n = 4$ ένωση δύο εγκεφάλων ανά δείγμα). Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου υπολογίστηκαν από σταθερές τιμές κανονικοποιημένες με την β-ακτίνη. Διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όλες τις δυαδικές/ζευγαρωτές διαδικασίες πολλαπλής σύγκρισης, ενώ οι αστερισκοί καταδεικνύουν διαφορές ανάμεσα στους δύο χειρισμούς (με ή χωρίς φλουοξετίνη).



Εικόνα 3.4 | Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *htr1Aa*, *htr1b*, *htr2b*, *slc6a4a*, *slc6a4b* και *hcrt* σε δείγματα εγκεφάλων (μέσος όρος \pm S.E.M., $n = 4$ ένωση δύο εγκεφάλων ανά δείγμα). Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου υπολογίστηκαν από σταθερές τιμές κανονικοποιημένες με την β-ακτίνη. Διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όλες τις δυαδικές/ζευγαρωτές διαδικασίες πολλαπλής σύγκρισης, ενώ οι αστερίσκοι καταδεικνύουν διαφορές ανάμεσα στους δύο χειρισμούς (με ή χωρίς φλουοξετίνη).

3.3.4. Επίδραση της φλουοξετίνης στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων

Η χορήγηση φλουοξετίνης (FLX) είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των μεταγράφων του *htr2b* στα κυρίαρχα και στα υποτελή άτομα. Συγκεκριμένα, κυρίαρχα και υποτελή ύστερα από έκθεση σε

φλουοξετίνη έδειξαν μία αύξηση κατά 2,26 ($P = 0.003$) και 2,2 ($P = 0.003$) φορές στην έκφραση του *htr2b* σε σύγκριση με τα αντίστοιχα μετάγραφα των ψαριών ελέγχου. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *gr*, *mr*, *c-fos*, *bdnf* και *htr1b* στον εγκεφαλικό ιστό έδειξαν αντίστοιχα μία αύξηση κατά 1,4 ($P = 0.04$), 1,6 ($P = 0.04$), 25 ($P < 0.001$), 3,3 ($P < 0.001$), και 1,89 φορές ($P = 0.04$) μόνο στα κυρίαρχα άτομα στα οποία χορηγήθηκε φλουοξετίνη σε σύγκριση με τα κυρίαρχα άτομα τα οποία δεν εκτέθηκαν στην φαρμακευτική ουσία. Τέλος, τα υποτελή άτομα με έκθεση στην φλουοξετίνη έδειξαν μία αύξηση έκφρασης κατά 1,51 φορές ($P = 0.04$) στο γονίδιο *slc6a4a* σε σύγκριση με τα υποτελή της ομάδας ελέγχου.

Από την άλλη, η χορήγηση φλουοξετίνης είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση κατά 1,93 ($P = 0.02$) και 2,7 φορές ($P = 0.03$) της έκφρασης των *htr1Aa* και *hcrt* στα κυρίαρχα άτομα συγκριτικά με τα κυρίαρχα της ομάδας ελέγχου. Επιπλέον, έκθεση στη φλουοξετίνη είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση κατά 5,6 φορές ($P < 0.001$) του *c-fos* στα υποτελή συγκριτικά με τα υποτελή της ομάδας ελέγχου. Συνολικά, τα επίπεδα έκφρασης του *c-fos* αντιστράφηκαν στα κυρίαρχα και υποτελή άτομα ως αποτέλεσμα της σύντομης έκθεσης στην φλουοξετίνη.

3.4. Συζήτηση

Η σύντομη έκθεση στη φλουοξετίνη είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της επιθετικότητας στα κυρίαρχα αρσενικά, η οποία εκδηλώθηκε μέσω της μείωσης του αριθμού των επιθέσεων των κυρίαρχων αρσενικών προς τα υποτελή, όπως και του χρόνου όπου τα κυρίαρχα πέρασαν να κυνηγούν τα υποτελή. Πέρα από αυτό, η ανάλυση των συμπεριφορικών δεδομένων έδειξε και μία ισχυρή μείωση της υποτελούς συμπεριφοράς. Πριν τη χορήγηση της φλουοξετίνης, τα υποτελή περνούσαν το μεγαλύτερο μέρος της δοκιμασίας ακινητοποιημένα στο κατώτερο τμήμα της δεξαμενής, ενώ ύστερα από την έκθεση στην ουσία δεν παρατηρήθηκε ούτε ένα συμβάν ακινητοποίησης. Όπως προκύπτει από την ανάλυση, οι ιεραρχίες δεν αντιστράφηκαν υπό την επίδραση του αντικαταθλιπτικού, όμως η υποτελής συμπεριφορά μειώθηκε σημαντικά, ενώ παρατηρήθηκαν και λίγες επιθέσεις από τα υποτελή προς τα κυρίαρχα.

Τα συμπεριφορικά δεδομένα βρίσκονται σε συμφωνία με τις μέχρι τώρα δημοσιεύσεις (Egan *et al.*, 2009), οι οποίες δείχνουν μία αύξηση στην «τολμηρότητα» ύστερα από έκθεση σε φλουοξετίνη. Ο συγκεκριμένος αντικαταθλιπτικός παράγοντας έχει φανεί πως μειώνει την επιθετική συμπεριφορά των ψαριών μονομάχων, *Betta splendens* (Dzieweczynski and Hebert, 2012; Kohlert *et al.*, 2012) καθώς και τη χωροκρατική επιθετικότητα των ψαριών των κοραλλιογενών υφάλων (Perreault *et al.*, 2003). Κάποια δημοσιευμένα δεδομένα έδειξαν επίσης πως η χορήγηση φλουοξετίνης σε zebrafish οδήγησε σε μείωση των επιθέσεων, η οποία όμως ήταν μη στατιστικά σημαντική σε αντίθεση με τα δικά μας ευρήματα (Filby *et al.*, 2010). Επίσης, ενώ η χορήγηση 2.5 mg kg⁻¹ φλουοξετίνης σε zebrafish είχε

αγχογενή επίδραση στη δοκιμασία σκοτεινής/φωτεινής προτίμησης, στη δοκιμασία νεοφανούς δεξαμενής η δράση της ήταν αγχολυτική (Maximino *et al.*, 2014). Διαφορετική μελέτη εφάρμοσε σύντομη εμφάνιση σε διάλυμα φλουοξετίνης συγκέντρωσης 0.1 - 10 mg L⁻¹ πριν από τη δοκιμασία νεοφανούς δεξαμενής, χειρισμός ο οποίος δεν είχε καμία επίπτωση στην παρατηρούμενη συμπεριφορά (Stewart *et al.*, 2011). Όλη αυτή η διακύμανση στις συμπεριφορικές παρατηρήσεις μπορεί να αποδοθεί σε διαφορές στις δόσεις που χορηγήθηκαν, στον πειραματικό σχεδιασμό, ή στη διαφορετική συμπεριφορική απόκριση της κάθε γενετικής γραμμής zebrafish στον εκάστοτε πειραματικό χειρισμό. Με δεδομένο πως η φλουοξετίνη έχει εντοπιστεί σε επιφανειακά νερά, η επίδρασή της στο περιβάλλον και στη συμπεριφορά των ιχθύων έχει μελετηθεί εκτενώς. Περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις του συγκεκριμένου αντικαταθλιπτικού επιδρούν σε συμπεριφορές που σχετίζονται με την αναπαραγωγή, διατροφή και αποφυγή θηρευτών σε συγκεκριμένα άγρια είδη ψαριών (Weinberger and Klaper, 2014).

Δεν αναγνωρίστηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση κορτιζόλης μεταξύ των κυρίαρχων και των υποτελών, ανεξαρτήτως φαρμακολογικού χειρισμού. Ομοίως, οι Pavlidis *et al.* (2011) δεν εντόπισαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε κυρίαρχα και υποτελή άτομα. Επιπλέον, οξεία έκθεση σε υψηλής συγκέντρωσης φλουοξετίνη οδήγησε σε σημαντική αύξηση της κορτιζόλης σώματος στα αρσενικά και των δύο ηθολογικών προτύπων, σε σύγκριση με τα άτομα χωρίς φαρμακολογικό χειρισμό. Η συγκεκριμένη παρατήρηση έρχεται σε αντίθεση με τον κατ' εξοχήν αγχολυτικό ρόλο της φλουοξετίνης καθώς και με αρκετές δημοσιεύσεις στο zebrafish (Egan *et al.*, 2009; De Abreu *et al.*, 2014) και σε άλλα είδη (Rosado *et al.*, 2011; Piwowska *et al.*, 2012), οι οποίες δείχνουν σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης ύστερα από χορήγηση φλουοξετίνης. Εντούτοις, αξίζει να σημειωθεί πως η πλειονότητα των συγκεκριμένων ερευνών εφάρμοσε χρόνια χορήγηση της ουσίας. Ένας σημαντικός αριθμός δημοσιεύσεων στα τρωκτικά δείχνει πως οξεία έκθεση σε φλουοξετίνη προκαλεί μία ισχυρή έκλυση κορτικοστερόνης ή προγεστερόνης, ενώ η χρόνια θεραπεία εμποδίζει την οξεία αυτή δράση της ουσίας (Purdy *et al.*, 1991; Duncan *et al.*, 1998). Επιπλέον, οι Fuller and Snoddy (1990) κατέληξαν πως το μέγεθος της παρατηρούμενης αύξησης της έκλυσης κορτικοστερόνης ως απόκριση στην οξεία φλουοξετίνη είναι παρόμοιο με αυτό που προκαλείται από αρκετά στρεσογόνα ερεθίσματα. Μία και μοναδική ένεση με σιταλοπράμη (citalopram), μία ακόμα ουσία στην κατηγορία των SSRIs, οδήγησε στην αύξηση των επιπέδων ACTH και κορτικοστερόνης στο πλάσμα αρουραίων κατά έναν τρόπο εξαρτώμενο από τη δόση (Jensen *et al.*, 1999). Ομοίως, χορήγηση εκ του στόματος 40 mg σιταλοπράμης σε ανθρώπους οδήγησε σε αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης στο πλάσμα (Hawken *et al.*, 2006). Έχει προταθεί πως η φλουοξετίνη προκαλεί έκλυση στεροειδών δρώντας στον εγκέφαλο και συγκεκριμένα στην υπόφυση, αφού έκθεση σε δεξαμεθαζόνη (ένα ισχυρό συνθετικό

γλυκοκορτικοστεροειδές το οποίο εμποδίζει την έκλυση κορτικοστερόνης ή κορτιζόλης) εμπόδισε την προκαλούμενη από τη φλουοξετίνη αύξηση της κορτικοστερόνης και της προγεστερόνης που παρατηρείται στους αρουραίους (Duncan *et al.*, 1998).

Τα δεδομένα μας δείχνουν ξεκάθαρα πως διαφορετικά ηθολογικά πρότυπα σχετίζονται με διαφορές στα επίπεδα mRNA μεταγράφων των γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόκρισης στο στρες και στη νευρωνική ενεργοποίηση. Επιπλέον, έκθεση στη φλουοξετίνη είχε ως αποτέλεσμα σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, καθώς και στη συμπεριφορά των ζώων. Είναι ευρέως αποδεκτό πως τα γλυκοκορτικοστεροειδή διαδραματίζουν ένα ρόλο κλειδί στη ρύθμιση των φυσιολογικών, μεταβολικών και ηθολογικών αποκρίσεων σε οξείς και χρόνιους στρεσογόνους παράγοντες. Όταν ένας οργανισμός εκτίθεται σε μία πρόκληση για πρώτη φορά, κινητοποιείται προκειμένου να αποκριθεί γρήγορα και αποτελεσματικά. Αυτό απαιτεί την έκφραση διαφόρων συμπεριφορών, συμπεριλαμβανομένων αμυντικών και επιθετικών μοτίβων όταν η πρόκληση έχει κοινωνική φύση. Ύστερα από έκθεση σε φλουοξετίνη παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης των *gr* και *mr* γονιδίων στα κυρίαρχα άτομα, δείχνοντας πως χαμηλότερα επίπεδα μεταγράφων αυτών των γονιδίων μπορεί να σχετίζονται με την εξασθένηση της αμυντικής επιθετικότητας. Παρ' όλα αυτά, η συγκεκριμένη αύξηση της γενετικής έκφρασης του *mr* ύστερα από έκθεση σε φλουοξετίνη παρατηρήθηκε μόνο στα κυρίαρχα άτομα, και όχι στα υποτελή. Αξίζει να σημειωθεί πως η σχέση μεταξύ σεροτονίνης (5-HT) και γλυκοκορτικοστεροειδών είναι περίπλοκη και εξαρτάται από το πλαίσιο και το χρόνο (Summers and Winberg, 2006). Χρόνια υψηλά επίπεδα γλυκοκορτικοστεροειδών αναστέλλουν την επιθετικότητα, ενώ σύντομη χορήγησή τους δεν έχει κάποια αντίστοιχη δράση.

Ο εγκεφαλικός νευροτροφικός παράγοντας (*bdnf*) είναι μεταξύ άλλων σημαντικός για την ανάπτυξη, διαφοροποίηση και διατήρηση των νευρικών κυττάρων, τη συναπτική πλαστικότητα, τη μάθηση και τη μακροχρόνια μνήμη. Η σωματική άσκηση έχει φανεί πως αυξάνει τη σύνθεση του BDNF στον ανθρώπινο εγκέφαλο (Denham *et al.*, 2014; Szuhany *et al.*, 2015), ενώ το χρόνιο ήπιο στρες αυξάνει τα μετάγραφα του BDNF στο zebrafish (Pavlidis *et al.*, 2015). Γενετικές γραμμές ποντικών με περιορισμό στην έκφραση του BDNF (*bdnd* - restricted knockout mice) έδειξαν αυξημένη επιθετικότητα και κοινωνική κυριαρχία παράλληλα με αυξημένο άγχος και γνωστικά προβλήματα (Ito *et al.*, 2011). Στην παρούσα μελέτη βρέθηκαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του *bdnf* στον εγκέφαλο των κυρίαρχων ατόμων της ομάδας ελέγχου σε σύγκριση με των υποτελών ατόμων, υποστηρίζοντας την υπόθεση πως ο BDNF λειτουργεί ως ένα μόριο κατά της επιθετικότητας. Είναι γνωστό πως τα σηματοδοτικά συστήματα του BDNF και της 5-HT ρυθμίζουν την ανάπτυξη και πλαστικότητα των νευρικών συστημάτων που συμμετέχουν σε σημαντικές διαταραχές διάθεσης, όπως η κατάθλιψη και το άγχος. Επιπλέον, χορήγηση SSRIs οδήγησε σε αυξημένη έκφραση του *bdnf*

(Martinowich and Lu, 2008). Επομένως, τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος υποδηλώνουν πως και στο zebrafish, η παρατηρούμενη μείωση στην επιθετική συμπεριφορά των ατόμων που τους χορηγήθηκε φλουοξετίνη, ρυθμίζεται μέσω της αυξημένης έκφρασης του *bdnf*.

Η χορήγηση φλουοξετίνης ανέστρεψε πλήρως το μοτίβο των διαφορών στα επίπεδα έκφρασης του *c-fos* μεταξύ των κυρίαρχων και των υποτελών ψαριών. Υποτελή της ομάδας ελέγχου είχαν σχεδόν 30 φορές υψηλότερα επίπεδα μεταγράφων του *c-fos* σε σύγκριση με τα κυρίαρχα της ίδιας ομάδας, ενώ η χορήγηση φλουοξετίνης οδήγησε σε μία αύξηση κατά 25 φορές στα κυρίαρχα, καθώς και σε μία μείωση κατά 5 φορές στα υποτελή. Αύξηση των μεταγράφων του *c-fos* σε ένα νευρώνα δείχνει πρόσφατη δραστηριότητα, έτσι, η έκφραση αυτού του άμεσου - πρώιμου γονιδίου (immediate - early gene) έχει χρησιμοποιηθεί ως ένας έμμεσος δείκτης νευρωνικής δραστηριότητας (Krukoff, 1999). Μελέτες στους αρουραίους έχουν δείξει πως η έκφραση του *c-fos* ενεργοποιήθηκε σε αρκετές εγκεφαλικές περιοχές, ύστερα από χορήγηση φλουοξετίνης (Torres *et al.*, 1998; Fraga *et al.*, 2005). Σε άλλη μελέτη με αρουραίους, παρατηρήθηκε εξαρτημένη από το στρες έκφραση του *c-fos* σε περίπου 50 εγκεφαλικές περιοχές, ενώ χορήγηση του αγχολυτικού διαζεπάμ (*diazepam*) οδήγησε σε ανάλογη της δόσης μείωση της συχνότητας ακινητοποίησης (*crouching*) και της έκφρασης του *c-fos* (Beck and Fibiger, 1995). Επομένως, τα δεδομένα μας δείχνουν πως στα αρσενικά zebrafish χαμηλότερη ή υψηλότερη νευρωνική ενεργοποίηση στον εγκέφαλο σχετίζεται με επιθετική ή αμυντική αγωνιστική συμπεριφορά αντίστοιχα.

Το σεροτονεργικό σύστημα εμπλέκεται σε αρκετές φυσιολογικές, νευροενδοκρινικές και συμπεριφορικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων του στρες, του αγχους και της επιθετικότητας. Η δραστηριότητα της σεροτονίνης εξαρτάται σε πολύ σημαντικό βαθμό από τους μεταφορείς και τους υποδοχείς της. Η φλουοξετίνη, όπως κάθε SSRI, προσδέεται στους σεροτονεργικούς μεταφορείς και εμποδίζει την επαναπρόσληψη της 5-υδροξυτρυπταμίνης (5-HT) στη συναπτική σχισμή, επιτρέποντας στην 5-HT να ασκήσει τη δράση της για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Wong *et al.*, 2013a). Το zebrafish έχει δύο γονίδια σεροτονεργικών μεταφορέων, τα *slc6a4a* και *slc6a4b* (με παλαιότερη ονομασία *serta* και *sertb*, (Wang *et al.*, 2006)), τα οποία ρυθμίζουν την επαναπρόσληψη της σεροτονίνης (Norton *et al.*, 2008). Στη συγκεκριμένη μελέτη, αναλύθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των δύο γονιδίων μεταφορέων και των τριών υποδοχέων, και παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ των ομάδων των δύο φαρμακολογικών χειρισμών, όσο και μεταξύ των δύο ηθολογικών προτύπων. Πιο συγκεκριμένα, ύστερα από χορήγηση της φλουοξετίνης παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στη γονιδιακή έκφραση του *htr1b* στα κυρίαρχα και του *htr2b* στα κυρίαρχα και στα υποτελή. Η συγκεκριμένη παρατήρηση ενισχύει τα δημοσιευμένα δεδομένα για άλλα είδη (Simon and Lu, 2005), τα οποία δείχνουν πως ενεργοποίηση των υποδοχέων *htr1b* και *htr2b* σχετίζεται με την επιθετική συμπεριφορά, υποδηλώνοντας πως οι δύο υποδοχείς είναι σημαντικοί ρυθμιστές της

επιθετικής και αμυντικής αγωνιστικής συμπεριφοράς. Οφείλουμε να παρατηρήσουμε πως τα δεδομένα βασίζονται σε δείγματα από ομογενοποιημένο εγκεφαλικό ιστό και μία ανάλυση συγκεκριμένων εγκεφαλικών περιοχών είναι απαραίτητη προκειμένου να διαλευκανθεί ο ακριβής ρόλος των συγκεκριμένων υποτύπων υποδοχέων στις στρατηγικές αντιμετώπισης και στα ηθολογικά πρότυπα (Takahashi *et al.*, 2011).

Οι σεροτονεργικοί μεταφορείς σε προηγούμενες μελέτες δεν έδειξαν κάποια διαφορά ύστερα από έκθεση του zebrafish σε φλουοξετίνη (Wong *et al.*, 2013a), χωρίς όμως να διαφοροποιούνται τα άτομα ανάλογα με τη στρατηγική αντιμετώπισής τους. Τα κυρίαρχα άτομα, ασχέτως φαρμακολογικού χειρισμού, είχαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης για το *slc6a4b* σε σχέση με τα υποτελή άτομα, δείχνοντας πως αυτή η διαφορά μπορεί να οφείλεται σε υποκείμενους μηχανισμούς των ηθολογικών προτύπων στα αρσενικά ενήλικα zebrafish.

Συμπερασματικά, μία οξεία εμβάπτιση σε υψηλή δόση φλουοξετίνης προκάλεσε σημαντική μείωση της επιθετικής συμπεριφοράς στα κυρίαρχα άτομα και μία αύξηση στην τολμηρότητα των υποτελών, παρατήρηση η οποία συνδυάζεται με σημαντικές διαφορές σε μοριακούς ρυθμιστές που σχετίζονται με τη νευρωνική λειτουργία, το στρες και το άγχος. Επομένως, σύντομη χορήγηση φλουοξετίνης μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο νευρο - φαρμακολογικό εργαλείο, το οποίο να βοηθήσει στην αποσαφήνιση του ρόλου του σεροτονεργικού συστήματος στο κοινωνικό στρες και στην επιθετική συμπεριφορά των ενηλίκων zebrafish.

Κεφάλαιο 4. Επίδραση της φλουοξετίνης στην αγχώδους τύπου συμπεριφορά των προνυμφών zebrafish.

4.1. Εισαγωγή

Οι προνύμφες zebrafish είναι ιδανικές για μεγάλης κλίμακας συμπεριφορικές αναλύσεις (Brockhoff, 2006; Barros *et al.*, 2008), καθώς είναι μικρές σε μέγεθος, διαφανείς και εύκολο να χαρακτηριστούν ανατομικά. Είναι εφικτός ο γενετικός τους χειρισμός και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε έρευνες ηλεκτροφυσιολογίας (Saint-Amant and Drapeau, 2003), οπτοκινητικής (McLean and Fetcho, 2011), βιοφθορισμού (Naumann *et al.*, 2010) και φαρμακολογικών χειρισμών (Rihel and Schier, 2012). Με τα αυτοματοποιημένα συστήματα απεικόνισης και ανάλυσης της συμπεριφοράς, είναι δυνατή η ταυτόχρονη παρατήρηση έως και 96 προνυμφών σε ειδικά πιάτα κутταροκαλλιέργειας (Berghmans *et al.*, 2007; Emran *et al.*, 2008).

Το μοτίβο κινητικότητας στο zebrafish αλλάζει δυναμικά καθ' όλη τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, αντικατοπτρίζοντας τη συντονισμένη ανάπτυξη μυών, νευρικών δικτύων και νευρομυϊκών συνάψεων (Drapeau *et al.*, 2002). Τα zebrafish θεωρούνται προνύμφες από τη στιγμή της εκκόλαψης (hatching), συγκεκριμένα την 3^η μέρα μετά τη γονιμοποίηση (3 dpf) μέχρι και τη 19^η – 23^η dpf κατά προσέγγιση (Uchida *et al.*, 2002). Τα πρώτα δείγματα κινητικότητας εμφανίζονται αρκετά νωρίτερα, με αυτόματες κυματοειδείς κινήσεις (side to side coiling) παρατηρούμενες την 17^η ώρα μετά τη γονιμοποίηση (hpf) (Saint-Amant and Drapeau, 1998). Ευαισθησία στην αφή αποκτούν από την 21^η hpf, ενώ από την 27^η hpf τα έμβρυα είναι ικανά να κολυμπούν αργά. Όσο εξελίσσεται η ανάπτυξή τους, αυξάνουν σταδιακά τη συχνότητα και ταχύτητα κίνησής τους. Την 4^η με 5^η dpf εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα ξαφνικά επεισόδια κολύμβησης. Σε αυτό το στάδιο η κίνησή τους μπορεί να χωριστεί σε 2 κατηγορίες, την αργή κολύμβηση όπου το σώμα προωθείται από την κάμψη του τελικού τμήματος της ουράς και από την ξαφνική (burst) κολύμβηση που πυροδοτείται από μεγαλύτερης δυναμικότητας κάμψεις που πηγάζουν στη μέση της ουράς (Burgess *et al.*, 2010).

Οι μελέτες συμπεριφοράς των προνυμφών του zebrafish εστιάζουν στη μέτρηση της συχνότητας έναρξης στερεοτυπικών κινήσεων (Fero *et al.*, 2011) και ο σχεδιασμός των πρωτοκόλλων έχει βασιστεί στη θεώρηση των Tinbergen και Lorenz πως ακόμα και περίπλοκες συμπεριφορές μπορούν να αποδομηθούν σε μία αλληλουχία από απλές, έμφυτες συμπεριφορικές μονάδες, ονομαζόμενες ως «σταθερά πρότυπα δράσης» (fixed action patterns) (Tinbergen, 1972). Οι ηθολογικές δοκιμασίες εστιάζουν κυρίως σε συμπεριφορές απόκρισης σε συγκεκριμένα ερεθίσματα, όπως οπτικά (Orger *et al.*, 2000; Roeser and Baier, 2003), μηχανικά (Kimmel *et al.*, 1974), χημικά (Lindsay and Vogt, 2004; Matz and Krone, 2007) και ακουστικά (Best *et al.*, 2008). Πλέον, οι έρευνες στρέφονται στη μελέτη πιο περίπλοκων συμπεριφορικών φαινοτύπων, όπως τον ύπνο (Rihel *et al.*, 2010; Sorribes *et al.*,

2013), την εξερευνητική (Ahmad and Richardson, 2013) και την κοινωνική συμπεριφορά (Dreosti *et al.*, 2015).

Από την ανακάλυψή της το 1975 και την πρώτη έγκρισή της για θεραπεία της κλινικής κατάθλιψης (Henry *et al.*, 2004), η φλουοξετίνη έχει εξελιχθεί στο αντικαταθλιπτικό φάρμακο με την υψηλότερη συνταγογράφηση παγκοσμίως, καθώς χρησιμοποιείται για θεραπεία καταθλιπτικών και ψυχαναγκαστικών παθήσεων, βουλιμίας και κρίσεων πανικού (Stewart *et al.*, 2014). Η ευρεία αυτή χρήση της έχει σαν αποτέλεσμα τον εντοπισμό της στον υδροφόρο ορίζοντα σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0.012 $\mu\text{g L}^{-1}$ έως 0.93 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Kolpin *et al.*, 2002; Lister *et al.*, 2009; Weinberger and Klaper, 2014). Φαρμακολογικός χειρισμός που εστιάζει στο σεροτονεργικό σύστημα προνυμφών του zebrafish έχει εφαρμοστεί σε ένα μεγάλο αριθμό μελετών (Cunha *et al.*, 2018; Martinez *et al.*, 2019). Χορήγηση φλουοξετίνης υπό χρόνιες συνθήκες (24 ώρες) μείωσε την αυθόρμητη κίνηση καθώς και την έκφραση δύο σεροτονεργικών υποδοχέων (SERT και 5-HT_{1A}), ενώ οξεία χορήγηση φλουοξετίνης μείωσε τη συμπεριφορά απόδρασης στην ηλικία των 7 dpf, χωρίς να επηρεάζεται ο χρόνος που περνούν κοντά στα τοιχώματα της δεξαμενής (θιγμοτακτική συμπεριφορά) (Airhart *et al.*, 2007). Η κινητικότητα και η γενικότερη κολυμβητική συμπεριφορά έχουν αποδειχτεί ως οι πιο ευαίσθητοι δείκτες επίδρασης της φλουοξετίνης στο zebrafish.

Η δράση της φλουοξετίνης δεν ακολουθεί μία μονοτονική πορεία, καθώς η επίδρασή της δεν γίνεται ισχυρότερη όσο αυξάνεται η δόση χορήγησης (Al Shuraiqi *et al.*, 2021). Στη δράση της φλουοξετίνης παρατηρείται ένα φαινόμενο διπλής δράσης, το οποίο παρατηρείται στα ψυχιατρικά φάρμακα, όπου χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα από τις υψηλότερες δόσεις. Πιο συγκεκριμένα, πολύ χαμηλές δόσεις φλουοξετίνης προκάλεσαν μείωση του ολικού χρόνου κολύμβησης, ενώ η υψηλότερη συγκέντρωση προκάλεσε αύξησή του (de Farias *et al.*, 2019). Σε πειράματα με άλλα είδη τελεόστων γλυκού νερού (το κουνουπόψαρο, *Gambusia holbrooki*), η χαμηλή δόση φλουοξετίνης μείωσε την απόκριση των οργανισμών σε αλλαγές στη φωτεινότητα του περιβάλλοντος, ενώ τα άτομα τα οποία εκτέθηκαν στην υψηλή δόση φλουοξετίνης έδειξαν την ίδια συμπεριφορά με τα άτομα της ομάδας ελέγχου (Martin *et al.*, 2020).

Στόχος του συγκεκριμένου πειράματος ήταν η περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης της φλουοξετίνης στον άξονα HPI, ως συνέχεια στα αποτελέσματα του κεφαλαίου 3 όπου παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης σε ενήλικα zebrafish ύστερα από χορήγηση υψηλής συγκέντρωσης φλουοξετίνης. Στον συγκεκριμένο πειραματικό σχεδιασμό, χορηγήθηκαν διαφορετικές δόσεις φλουοξετίνης σε προνύμφες zebrafish και μελετήθηκε η συμπεριφορική τους απόκριση σε καταπόνηση καθώς και η ενεργοποίηση του άξονα HPI.

4.2. Υλικά και μέθοδοι

4.2.1. Χειρισμός και προέλευση πειραματόζων

Τα ενήλικα άτομα των οποίων οι απόγονοι χρησιμοποιήθηκαν στα συγκεκριμένα πειράματα ήταν άγριας προέλευσης (Σιγκαπούρης) και προμηθεύτηκαν από τοπικό εμπορικό κατάστημα. Οι συνθήκες εκτροφής τους έχουν περιγραφεί στο κεφάλαιο 2. Η αναπαραγωγή και τα σχετικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ιχθύων του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Τα zebrafish θεωρούνται αναπαραγωγικά ώριμα από τον 3^ο μήνα ζωής τους, είναι αναπαραγωγικά ενεργά καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου και απαιτούν να μεσολαβήσουν κατά μέσο όρο τουλάχιστον 2 ημέρες μεταξύ των ημερών ωτοκίας (Spence *et al.*, 2008). Τα έμβρυα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες των συγκεκριμένων πειραμάτων προέκυψαν μέσω φυσικών διασταυρώσεων των ενηλίκων zebrafish σε ειδικές δεξαμενές της εταιρίας Techniplast (Italy) (**Εικόνα 4.1**).

Οι συγκεκριμένες δεξαμενές γεμίζονται με 600 ml νερού και το διαφανές διαχωριστικό τοποθετείται στις εσοχές της κατασκευής. Αργά το μεσημέρι, μεταφέρονται σε αυτές μέσω μίας απόχης ένα θηλυκό άτομο και δύο αρσενικά. Σημαντική λεπτομέρεια είναι τα άτομα των δύο φύλων να έχουν μόνο οπτική επαφή επομένως τοποθετούνται εκατέρωθεν του διαφανούς διαχωριστικού. Έπειτα τοποθετείται στην δεξαμενή το ειδικό πλαστικό της σκέπαστρο και τα zebrafish αφήνονται ανενόχλητα καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας. Το επόμενο πρωί, αμέσως μετά την έναρξη της φωτεινής περιόδου, το διαχωριστικό αφαιρείται και τα zebrafish αφήνονται να αλληλεπιδράσουν. Η λεπτομερώς χαρακτηρισμένη συμπεριφορά ερωτοτροπίας αποτελείται από τα εξής στάδια:

- Το αρσενικό κυνηγάει και ακουμπάει με την αιχμή του κεφαλιού του την κοιλιακή χώρα του θηλυκού ατόμου, έτσι ώστε να καθοδηγήσει το θηλυκό στο σημείο ωτοκίας,
- Το αρσενικό κολυμπάει με τα πτερύγιά του ορθωμένα μπροστά από το θηλυκό ή το κυκλώνει, και
- Το αρσενικό κολυμπάει εμπρός πίσω ανάμεσα στο θηλυκό άτομο και το κατάλληλο σημείο ωτοκίας. Μόλις το θηλυκό προσελκυσθεί στο σημείο ωτοκίας, το αρσενικό ευθυγραμμίζει το σώμα του με το θηλυκό και σε κοντινή απόσταση με εκείνο, τρέμει σε υψηλή συχνότητα και χαμηλό πλάτος προκαλώντας την ωτοκία στο θηλυκό (Darrow and Harris, 2004). Τελικά, τα αυγά απελευθερώνονται και γονιμοποιούνται από το αρσενικό και τότε πλέον μπορούν να συλλεχθούν.



Εικόνα 4.1 | Ειδική δεξαμενή για το ζευγάρι των ενηλίκων zebrafish. Η δεξαμενή αποτελείται από 2 κατασκευές, μία διαφανή δεξαμενή 1 L στην οποία εφαρμόζει μία μικρότερη δεξαμενή με διάτρητο πυθμένα και αφαιρούμενο διαχωριστικό.

Ο ειδικός σχεδιασμός των δεξαμενών αναπαραγωγής, δεν επιτρέπει την πρόσβαση των zebrafish στα αυγά, καθώς όταν αυτά απελευθερώνονται από το θηλυκό περνούν από τις σχισμές του εσωτερικού τμήματος της δεξαμενής και εναποτίθενται στον πυθμένα. Με αυτό τον τρόπο τα αυγά προστατεύονται από την πιθανή κατάποσή τους από τους γεννήτορες zebrafish. Με την συλλογή των γονιμοποιημένων αυγών, οι γονείς επιστρέφονται στις μητρικές δεξαμενές. Στην συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία πλύσης των αυγών και μεταφοράς τους σε μικρές δεξαμενές με ειδικό νερό (EW) κατάλληλης σύστασης για αυγά και προνύμφες (egg water 50X: 25 g Instant Ocean, 39.25 g CaSO₄ και 5 g NaHCO₃ σε 1 L) και κυανό του μεθυλενίου 10 ng ml⁻¹ (methylene blue). Τις επόμενες 24 ώρες, υπό τον φακό του στερεοσκοπίου παρατηρούνται και απομακρύνονται τα νεκρά και μη γονιμοποιημένα έμβρυα. Για τις επόμενες 14 ημέρες, τα έμβρυα βρίσκονται σε ειδικές δεξαμενές, στους 28°C με σταθερή φωτοπερίοδο 12 ώρες ημέρα και 12 ώρες νύχτα. Καθημερινά το νερό στο οποίο αναπτύσσονται καθαρίζεται και ανά τρεις ημέρες ανανεώνεται με φρέσκο EW.

4.2.2. Χημικές ουσίες και διαλύματα έκθεσης

Για τις ανάγκες του συγκεκριμένου πειράματος χρησιμοποιήθηκε φλουοξετίνη (Sigma F-132, Sigma-Aldrich), η οποία ανασυστάθηκε σε διάλυμα συγκέντρωσης 4 mg ml⁻¹. Οι επιθυμητές τελικές συγκεντρώσεις προέκυψαν με περαιτέρω αραιώσεις με νερό το οποίο χρησιμοποιείται για την εκτροφή των προνυμφών (EW). Ύστερα από εκτενή μελέτη της βιβλιογραφίας αποφασίστηκε η επιλογή τριών δόσεων φλουοξετίνης, 0.5 mg L⁻¹, 1.5 mg L⁻¹ και 5 mg L⁻¹. Μελέτες μακροχρόνιας χορήγησης του αντικαταθλιπτικού φλουοξετίνη σε προνύμφες του zebrafish δεν έχουν καταφέρει να ορίσουν ένα ακριβές εύρος των ανεκτών συγκεντρώσεων στις προνύμφες του zebrafish, καθώς δεν έχουν οριστεί σαφείς δόσεις για συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίπτωσης (NOEC) και ελάχιστη

συγκέντρωση παρατηρούμενης επίπτωσης (LOEC). Από τα σχετικά δεδομένα που προκύπτουν τα τελευταία χρόνια η ελάχιστη συγκέντρωση φλουοξετίνης ικανή να προκαλέσει κάποια επίδραση στους υδρόβιους οργανισμούς παρουσιάζει ένα εύρος από 1 pM μέχρι και λίγα μM (Henry *et al.*, 2004; Fong and Molnar, 2013; Franzellitti *et al.*, 2013; Sumpter *et al.*, 2014). Η παρατηρούμενη διακύμανση στην ευαισθησία των οργανισμών στην φλουοξετίνη ενδέχεται να οφείλεται σε διαφορές στους πειραματικούς σχεδιασμούς και τις συνθήκες, όπως το είδος αλλά και η ηλικία/αναπτυξιακό στάδιο των οργανισμών, το φύλο και ο χρόνος έκθεσης. Επιπλέον η διφασική ή μη-μονοτονική σχέση συγκέντρωσης - επίδρασης της φλουοξετίνης στους οργανισμούς περιπλέκει επιπλέον τα δεδομένα (De Lange *et al.*, 2006; Painter *et al.*, 2009; Rivetti *et al.*, 2016). Πρόσφατη έρευνα έδειξε πως η χαμηλότερη συγκέντρωση φλουοξετίνης η οποία είναι ικανή να επιδράσει στην συμπεριφορά κίνησης προνυμφών zebrafish είναι 2.9 nM ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) (Zindler *et al.*, 2020). Σε ό,τι αφορά την τοξικότητα της φλουοξετίνης σε προνύμφες zebrafish, πειράματα μακροχρόνιας έκθεσης εμβρύων zebrafish (μέχρι και 7 dpf) έδειξαν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας στις δόσεις των 5.51 και 15 mg L^{-1} (de Farias *et al.*, 2019). Επιπλέον, οι υψηλές δόσεις φλουοξετίνης επηρέασαν αρνητικά τα ποσοστά εκκόλαψης των εμβρύων, καθώς και την ικανότητα ισορροπίας (equilibrium) των προνυμφών. Οι συγκεκριμένες δυσμενείς επιπτώσεις δεν εντοπίστηκαν στην δόση των 1.42 mg L^{-1} .

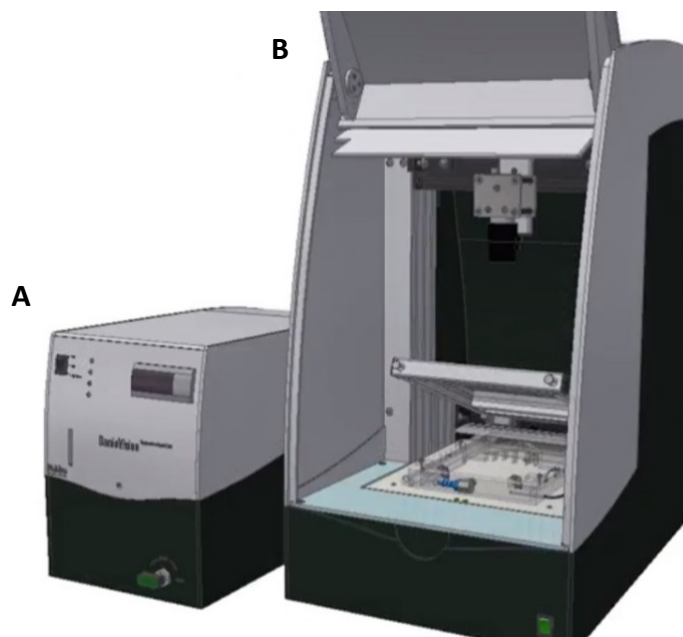
Οι δόσεις που έχουν επιλεγεί τα τελευταία χρόνια να χορηγηθούν στα έμβρυα των zebrafish προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση στη συμπεριφορά και στην απόκριση σε ερεθίσματα του περιβάλλοντος, κυμαίνονται σε εύρη των $0.346 \mu\text{g/L} - 4.84 \text{ mg/L}$ (Zindler *et al.*, 2020), $1 - 100 \mu\text{g L}^{-1}$ (Huang *et al.*, 2019), $0.5 \mu\text{g L}^{-1} - 272 \mu\text{g L}^{-1}$ (Cunha *et al.*, 2018), $0.88 - 500 \mu\text{g L}^{-1}$ (de Farias *et al.*, 2019), $12 \text{ ng L}^{-1} - 700 \mu\text{g L}^{-1}$ (Mishra *et al.*, 2017). Τέλος, έχουν διεξαχθεί μελέτες οι οποίες εκθέτουν τα έμβρυα σε μία δόση οικοτοξικολογικού ενδιαφέροντος, $0.54 \mu\text{g L}^{-1}$ (συγκέντρωση ανάλογη με την περιβαλλοντική έκθεση των υδρόβιων οργανισμών σε φαρμακευτικά απόβλητα) και $54 \mu\text{g L}^{-1}$, συγκέντρωση εντός του εύρους της ανιχνεύσιμης φλουοξετίνης στο αίμα ομφάλιου λώρου εγκύων γυναικών οι οποίες λαμβάνουν θεραπεία φλουοξετίνης (Vera-Chang *et al.*, 2018; 2019).

4.2.3. Πειραματικός σχεδιασμός

Συνολικά, οι πειραματικές ομάδες έκθεσης ήταν τέσσερις, μία ομάδα ελέγχου και τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις φλουοξετίνης (0.5 mg L^{-1} , 1.5 mg L^{-1} & 5 mg L^{-1}). Τα διαλύματα εργασίας έγιναν με διπλά απεσταγμένο νερό (nano – pure), ενώ οι τελικές αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν με EW. Χρησιμοποιήθηκαν μικροπλάκες κυτταροκαλλιέργειας 48 θέσεων (πηγαδιών), επίπεδης βάσης με 1.5 ml από το κάθε διάλυμα, EW για τα άτομα της ομάδας ελέγχου και EW εμπλουτισμένο με φλουοξετίνη στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις για τις τρεις πειραματικές ομάδες.

Η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πειραματικού θαλάμου παρακολούθησης συμπεριφοράς DanioVision (Noldus XT, Wageningen, Netherlands) (**Εικόνα 4.2**). Ο συγκεκριμένος θάλαμος εξασφαλίζει την απομόνωση των προνυμφών από εξωτερικά ερεθίσματα όπως το φως και οι δονήσεις από κινήσεις ή ομιλίες, επομένως επιτρέπει έναν αυστηρό έλεγχο των συνθηκών υπό τις οποίες παρατηρείται η συμπεριφορά των προνυμφών. Περιλαμβάνει διπλό εσωτερικό φωτισμό, λευκό φως το οποίο μπορεί να ρυθμιστεί κατάλληλα ώστε να προσομοιωθεί μέρα/νύχτα καθώς και υπέρυθρο φωτισμό (850 nm) ώστε σε καταστάσεις σκότους, η (ευαίσθητη στον υπέρυθρο φωτισμό) κάμερα να μπορεί να καταγράψει την κίνηση των προνυμφών που βρίσκονται εντός του θαλάμου. Τέλος, ο θάλαμος περιλαμβάνει και τη δυνατότητα έκθεσης των οργανισμών σε ερεθίσματα όπως δόνηση της πλατφόρμας σε διάφορα επίπεδα έντασης.

Προνύμφες WT 5 dpf μεταφέρθηκαν στις μικροπλάκες κυτταροκαλλιέργειας και η μικροπλάκα μεταφέρθηκε στον θάλαμο παρατήρησης του DanioVision όπου αφέθηκαν ανενόχλητες για δύο ώρες. Στη συνέχεια εκτέθηκαν στη δοκιμασία της κινητικής απόκρισης στην εναλλαγή φωτός - σκότους, η οποία αποτελείται από 3 εναλλαγές 10 λεπτών σκοταδιού και 10 λεπτών φωτός. Η συνολική διάρκεια της κάθε δοκιμασίας ήταν 60 λεπτά. Οι προνύμφες βρίσκονταν εντός θαλάμου σε θερμοκρασία $26 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.



Εικόνα 4.2 | Θάλαμος παρακολούθησης συμπεριφοράς του DanioVision (DanioVision Observation Chamber). (A) Μονάδα ελέγχου θερμοκρασίας, η οποία ρυθμίζει τη θερμοκρασία του νερού που ρέει μέσα στον θάλαμο παρατήρησης και εξασφαλίζει την απουσία θερμοκρασιακών μεταβολών οι οποίες θα μπορούσαν να επηρεάσουν την συμπεριφορά των προνυμφών κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. (B) Θάλαμος παρατήρησης με ενσωματωμένη κάμερα.

Οι καταγεγραμμένες δοκιμασίες αναλύθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Ethovision XT 14, το οποίο ανέλυσε την κίνηση κάθε μίας από τις 24 προνύμφες που υπήρχαν στην κάθε μικροπλάκα. Οι ηθολογικές παράμετροι που εκτιμήθηκαν ήταν η συνολική απόσταση που διένυσε η προνύμφη κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας (total distance moved, mm) καθώς και το ποσοστό του χρόνου που η κάθε προνύμφη πέρασε στο κέντρο του κάθε πηγαδιού (thigmotaxis, % of time spent in the center).

4.2.4. Προσδιορισμός κορτιζόλης

Στο τέλος της ηθολογικής δοκιμασίας, οι προνύμφες κάθε πειραματικής ομάδας, θυσιάστηκαν με βύθιση σε πάγο με νερό προκειμένου να εκτιμηθούν τα επίπεδα κορτιζόλης ύστερα από τη σύντομη χορήγηση φλουοξετίνης και την έκθεση στις εναλλασσόμενες συνθήκες φωτισμού. Μετά τη θανάτωση, η κάθε προνύμφη μεταφέρθηκε σε πλαστικά erpendorfs και αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την ανάλυση προσδιορισμού της κορτιζόλης.

Ο προσδιορισμός της κορτιζόλης από την κάθε προνύμφη ατομικά περιγράφεται από τους Samaras & Pavlidis (2020). Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα από τους -20°C τοποθετήθηκαν σε πάγο για να αποφευχθεί η μετάβαση στη θερμοκρασία δωματίου και σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 100 μl αλατούχου φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (PBS). Η ομογενοποίηση των δειγμάτων έγινε με τη χρήση ενός μηχανικού ομογενοποιητή θραύσης (τύπου bead mill disruptor), ο οποίος χρησιμοποιεί ανοξείδωτα σφαιρίδια (Tissue Lyser II, Qiagen). Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν για 2 λεπτά στους 30 Hz με την χρήση σφαιριδίων διαμέτρου 3 mm σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, το κάθε ομογενοποίημα μεταφέρθηκε σε γυάλινους σωλήνες και προστέθηκε 1 ml διαιθυλεθέρα προκειμένου να γίνει η εξαγωγή. Οι γυάλινοι σωλήνες με τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους -80°C για 3 λεπτά με αποτέλεσμα να παγώσει η υγρή υδάτινη φάση του εκχυλίσματος. Οι υπερκείμενες φάσεις του διαιθυλεθέρα από το κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν σε νέους γυάλινους σωλήνες και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 45°C για 20 λεπτά. Ύστερα από την εξάτμιση του διαιθυλεθέρα, τα δείγματα ανασυστάθηκαν με προσθήκη 100 μl ειδικού διαλύματος ανοσοανάλυσης (extraction buffer). Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την ημέρα της περαιτέρω ανάλυσής τους (σε κάθε περίπτωση σε λιγότερο από ένα μήνα).

Η κορτιζόλη κάθε δείγματος ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση ενός εμπορικού κιτ ELISA (Neogen Corporation) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μέθοδος βασίζεται στην ανταγωνιστική σχέση του συμπλόκου κορτιζόλης - ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) και της κορτιζόλης του δείγματος για ένα περιορισμένο αριθμό θέσεων πρόσδεσης ενός αντισώματος. Το μονοκλωνικό αυτό αντίσωμα είναι ειδικευμένο για την κορτιζόλη και αποτελεί βασικό συστατικό της επένδυσης του υποστρώματος του πιάτου στο οποίο λαμβάνει χώρα η αντίδραση. Το σύμπλοκο κορτιζόλης -

ενζύμου δρα ως ιχνηθέτης της στεροειδούς ορμόνης. Σε κάθε πηγάδι της αντίδρασης, η συγκέντρωση του ιχνηθέτη που χρησιμοποιείται είναι σταθερή, ενώ η συγκέντρωση κορτιζόλης των δειγμάτων είναι άγνωστη. Επομένως, η ποσότητα ιχνηθέτη που μπορεί να προσδεθεί στο μονοκλωνικό αντίσωμα της κορτιζόλης είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης της ορμόνης που βρίσκεται σε κάθε πηγάδι, άρα και σε κάθε δείγμα. Τα σύμπλοκα αντισώματος και κορτιζόλης, ελεύθερης και ιχνηθέτη, προσδένονται στο υπόστρωμα του πηγαδιού και μετά από επώαση μίας ώρας, χρησιμοποιείται ένα διάλυμα πλύσης με το οποίο απομακρύνονται τα ελεύθερα αντιδραστήρια και προστίθεται ειδικό διάλυμα το οποίο μετά από 30 λεπτά θα αντιδράσει με τον ιχνηθέτη σύμπλοκο και θα δημιουργηθεί το χρώμα της αντίδρασης. Το παράγωγο της ενζυμικής αντίδρασης έχει κυανή απόχρωση και απορροφάει το φως στα 650 nm. Η ένταση του χρώματος καθορίζεται φασματοφωτομετρικά και είναι αντιστρόφως ανάλογη της ποσότητας της κορτιζόλης στο δείγμα. Παράλληλα με τη μέτρηση των δειγμάτων του πειράματος χρησιμοποιούνται και δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων, των οποίων οι απορροφήσεις αποτελούν την βάση για την κατασκευή της καμπύλης της μέτρησης. Η καμπύλη αυτή δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού των άγνωστων συγκεντρώσεων κορτιζόλης στα δείγματα.

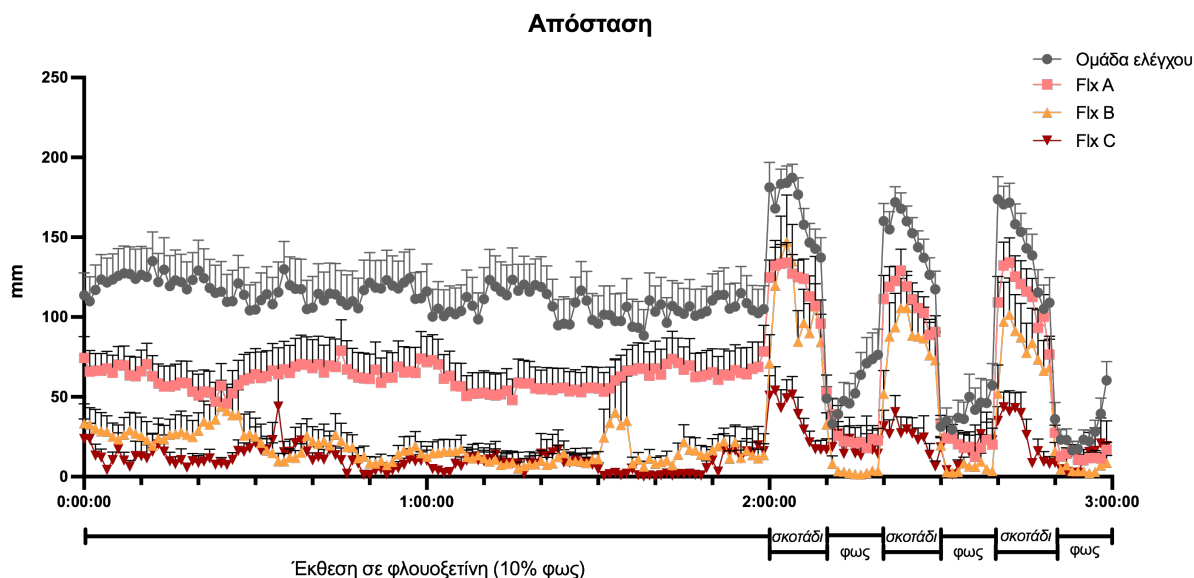
4.2.5. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SigmaStat v3.1 (Jandel Scientific). Όλα τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου (SEM). Αρχικά τα δεδομένα ελέγχθηκαν ως προς την κανονικότητα της κατανομής τους (normality) και την ισότητα των διασπορών τους (equal variance test), και σε περίπτωση που κρίθηκε αναγκαίο τροποποιήθηκαν λογαριθμικά. Σε περίπτωση πλήρωσης των δύο αυτών προϋποθέσεων, χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικά τεστ, ενώ σε περίπτωση μη πλήρωσης της κανονικότητας και ισότητας διασπορών οι αναλύσεις έγιναν με μη παραμετρικά τεστ. Πιο συγκεκριμένα, τα συμπεριφορικά δεδομένα της απόστασης που διανύθηκε εντός κάθε φωτεινής και σκοτεινής περιόδου αναλύθηκαν με ανάλυση διασποράς για δύο παράγοντες (two - way analysis of variance ANOVA). Τα δεδομένα της απόστασης όταν συνδυάστηκαν όλες οι φωτεινές και οι σκοτεινές περιόδους της δοκιμασίας αναλύθηκαν με ανάλυση διασποράς για έναν παράγοντα (one – way ANOVA). Με one – way ANOVA έγινε και η ανάλυση των δεδομένων θιγμοτακτικής συμπεριφοράς καθώς και συγκέντρωσης της κορτιζόλης. Στις περιπτώσεις των στατιστικά σημαντικών διαφορών ($P < 0.05$), η αναγνώριση των στατιστικά σημαντικών ομάδων έγινε με τους ελέγχους πολλαπλών συγκρίσεων Holm-Sidak's και Tukey's. Τα γραφήματα δημιουργήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Graph Pad Prism 6.03 (GraphPad Software Inc, USA).

4.3. Αποτελέσματα

4.3.1. Συμπεριφορικά δεδομένα

Η επίδραση του φαρμακολογικού χειρισμού στη συμπεριφορική απόκριση των προνυμφών στο στρες απεικονίζεται στην **Εικόνα 4.1**.

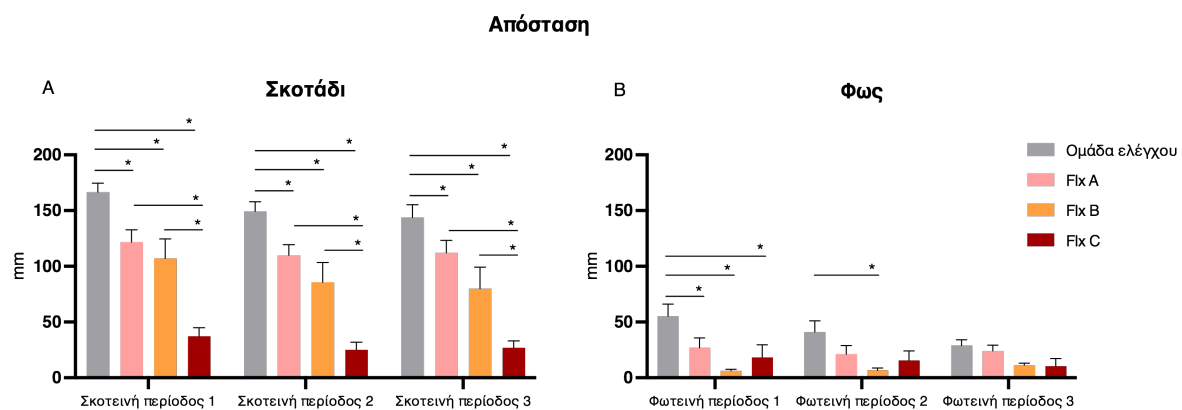


Εικόνα 4.3 | Συμπεριφορικό προφίλ ανά λεπτό. Η μέση δραστηριότητα σε συνθήκες φωτός και σκοταδιού, με τη δραστηριότητα των 5 drf προνυμφών να εκφράζεται σε συνολική απόσταση (mm) ανά λεπτό. Η ομάδα CON αποτελεί την ομάδα ελέγχου, ενώ οι ομάδες Flx A, B και C αποτελούν τις προνύμφες που εκτέθηκαν στη φλουοξετίνη, σε συγκεντρώσεις 0.5 mg L^{-1} , 1.5 mg L^{-1} , 5 mg L^{-1} αντίστοιχα. Οι 2 πρώτες ώρες αφορούν την έκθεση στην φλουοξετίνη, όπου τα άτομα βρίσκονταν στο θάλαμο με 10% ένταση φωτισμού. Την επόμενη ώρα εκτέθηκαν σε δοκιμασία με 3 εναλλαγές φωτός (25%) – σκοταδιού διάρκειας 10 λεπτών η κάθε μία. Το κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο \pm S.E.M. ($n = 24$ άτομα ανά ομάδα).

Οι προνύμφες που εκτέθηκαν στην υψηλότερη συγκέντρωση φλουοξετίνης (Flx C) παρουσίασαν την χαμηλότερη δραστηριότητα και στις τρεις περιόδους σκότους (**Εικόνα 4.4 A**). Συγκεκριμένα, στην πρώτη περίοδο σκότους, οι προνύμφες της ομάδας Flx C είχαν στατιστικά μικρότερη κινητικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Control) ($P < 0.001$), την ομάδα Flx A ($P < 0.001$) και την ομάδα Flx B ($P < 0.001$). Στη δεύτερη περίοδο σκότους, οι προνύμφες της ομάδας Flx C είχαν στατιστικά μικρότερη κινητικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($P < 0.001$), την ομάδα Flx A ($P < 0.001$) και την ομάδα Flx B ($P = 0.003$). Στην τρίτη περίοδο σκότους, οι προνύμφες της ομάδας Flx C είχαν στατιστικά μικρότερη κινητικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($P < 0.001$), την ομάδα Flx A ($P < 0.001$) και την ομάδα Flx B ($P = 0.009$). Επιπλέον η ομάδα ελέγχου παρουσίασε την υψηλότερη κινητικότητα και στις τρεις περιόδους σκότους. Συγκεκριμένα, στην πρώτη περίοδο σκότους, οι προνύμφες της ομάδας ελέγχου είχαν στατιστικά υψηλότερη κινητικότητα σε σύγκριση με τις ομάδες Flx A ($P = 0.002$), Flx B ($P = 0.001$) και Flx C ($P < 0.001$). Στη δεύτερη περίοδο σκότους, οι προνύμφες της ομάδας ελέγχου είχαν στατιστικά υψηλότερη κινητικότητα σε σύγκριση με τις ομάδες Flx A ($P =$

0.006), Flx B ($P < 0.001$) και Flx C ($P < 0.001$). Στην τρίτη περίοδο σκότους, οι προνύμφες της ομάδας ελέγχου είχαν στατιστικά υψηλότερη κινητικότητα σε σύγκριση με τις ομάδες Flx A ($P = 0.025$), Flx B ($P < 0.001$) και Flx C ($P < 0.001$).

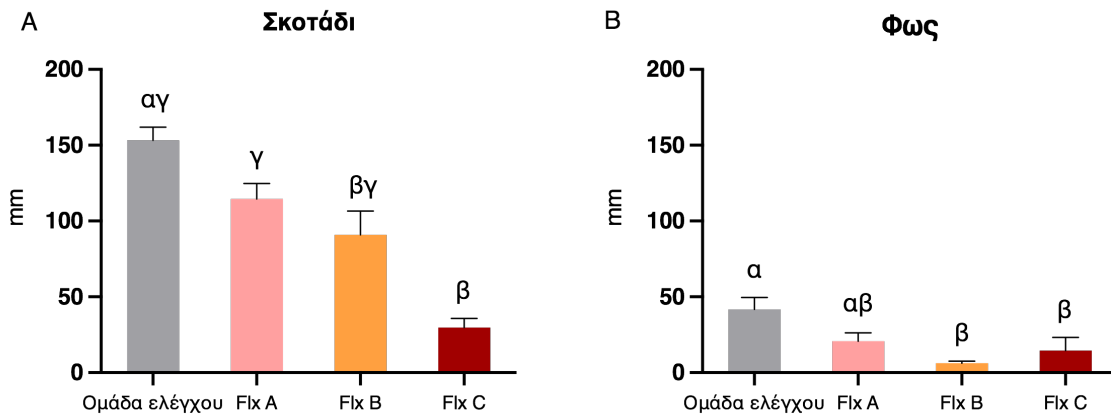
Στις περιόδους φωτός η κινητικότητα των προνυμφών μειώθηκε με την κάθε εναλλαγή (**Εικόνα 4.4 B**). Η ομάδα ελέγχου παρουσίασε την υψηλότερη κινητικότητα μόνο στις δύο πρώτες φωτεινές περιόδους. Συγκεκριμένα, στην πρώτη φωτεινή περίοδο, οι προνύμφες της ομάδας ελέγχου είχαν στατιστικά υψηλότερη κινητικότητα σε σύγκριση με την ομάδα Flx A ($P = 0.007$), Flx B ($P < 0.001$) και Flx C ($P = 0.004$). Στη δεύτερη περίοδο φωτός, οι προνύμφες της ομάδας ελέγχου είχαν στατιστικά υψηλότερη κινητικότητα μόνο σε σύγκριση με την Flx B ($P = 0.007$). Στην τρίτη περίοδο φωτός, δεν εντοπίστηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τεσσάρων ομάδων.



Εικόνα 4.4 | Απόσταση στις τρεις εναλλαγές φωτός (B) και σκοταδιού (A) (μέσος όρος \pm S.E.M. ($n = 24$ άτομα ανά ομάδα)). Η ομάδα CON αποτελεί την ομάδα ελέγχου, ενώ οι ομάδες Flx A, B και C αποτελούν τις προνύμφες που εκτέθηκαν στη φλουοξετίνη, σε συγκεντρώσεις 0.5 mg L^{-1} , 1.5 mg L^{-1} , 5 mg L^{-1} . Η κάθε ράβδος αντιπροσωπεύει τη συνολική απόσταση που διάνυσαν οι προνύμφες στην κάθε περίοδο 10 λεπτών. Η στατιστική ανάλυση έγινε με two – way ANOVA. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τεσσάρων φαρμακολογικών χειρισμών.

Η συνολική απόσταση υπό συνθήκες απουσίας φωτός ήταν σημαντικά χαμηλότερη στην ομάδα Flx C (14.6 ± 8.6 , $n = 12$) σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου (41.7 ± 7.9 , $n = 24$) και Flx A (20.8 ± 5.5 , $n = 24$) ($F_{3,68} = 14.477$, $P < 0.001$; **Εικόνα 4.5 A**). Η ομάδα Flx B παρουσίασε μικρότερη κινητικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Υπό συνθήκες φωτισμού, η συνολική απόσταση της ομάδας ελέγχου (153.2 ± 8.7 , $n = 24$) ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με αυτή των ομάδων Flx B (90.9 ± 15.7 , $n = 12$) και Flx C (29.7 ± 6 , $n = 12$) ($H_{3,68} = 35.549$, $P < 0.001$; **Εικόνα 4.5 B**).

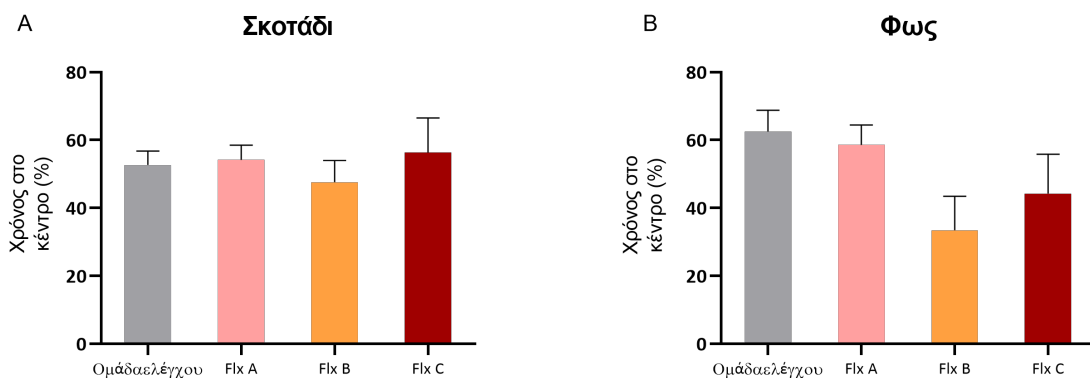
Συνολική απόσταση



Εικόνα 4.5 | Συνολική απόσταση στις συνθήκες φωτός (B) και σκοταδιού (A) (μέσος όρος \pm S.E.M. ($n = 12 - 24$ άτομα ανά ομάδα)). Η ομάδα CON αποτελεί την ομάδα ελέγχου, ενώ οι ομάδες Flx A, B και C αποτελούν τις προνύμφες που εκτέθηκαν στη φλουοξετίνη, σε συγκεντρώσεις 0.5 mg L^{-1} , 1.5 mg L^{-1} , 5 mg L^{-1} . Η κάθε ράβδος αντιπροσωπεύει τη συνολική απόσταση που διάνυσαν οι προνύμφες της κάθε ομάδας. Η στατιστική ανάλυση έγινε με ανάλυση Kruskal – Wallis και one – way ANOVA. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τεσσάρων φαρμακολογικών χειρισμών.

Η θιγμοτακτική συμπεριφορά των προνυμφών εκτιμήθηκε υπολογίζοντας το χρόνο που εκείνες πέρασαν στην κεντρική ζώνη της αρένας (Εικόνα 4.6). Δεν εντοπίστηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ούτε κατά τη διάρκεια των σκοτεινών περιόδων ($H_{3,68} = 1.037$, $P = 0.8$; Εικόνα 4.6 A), αλλά ούτε και των φωτεινών ($F_{3,65} = 2.665$, $P = 0.06$; Εικόνα 4.6 B).

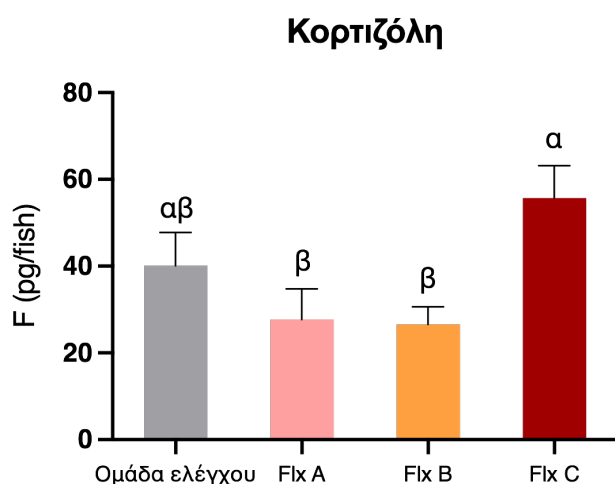
Θιγμοτακτική συμπεριφορά



Εικόνα 4.6 | Χρόνος που πέρασαν στο κεντρικό τμήμα της αρένας συνολικά στις φωτεινές (A) και σκοτεινές περιόδους (B) (μέσος όρος \pm S.E.M. ($n = 24$ άτομα ανά ομάδα)). Η ομάδα CON αποτελεί την ομάδα ελέγχου, ενώ οι ομάδες Flx A, B και C αποτελούν τις προνύμφες που εκτέθηκαν στη φλουοξετίνη, σε συγκεντρώσεις 0.5 mg L^{-1} , 1.5 mg L^{-1} , 5 mg L^{-1} . Η ανάλυση έγινε με ανάλυση Kruskal - Wallis.

4.3.2. Κορτιζόλη

Τα άτομα της ομάδας FlxC ($55.7 \pm 7.5 \text{ ng g}^{-1}$, $n = 10$) είχαν σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση κορτιζόλης σε σχέση με τις προνύμφες των ομάδων FlxB ($26.6 \pm 4.1 \text{ ng g}^{-1}$, $n = 11$) και FlxA ($27.7 \pm 7.1 \text{ ng g}^{-1}$, $n = 11$) ($H_{3,40} = 3.820$, $P = 0.02$; **Εικόνα 4.7**).



Εικόνα 4.7 | Συγκέντρωση κορτιζόλης (F) στις προνύμφες zebrafish 5 dpf (μέσος όρος \pm S.E.M. ($n = 12$ άτομα ανά ομάδα). Η ομάδα CON αποτελεί την ομάδα ελέγχου, ενώ οι ομάδες Flx A, B και C αποτελούν τις προνύμφες που εκτέθηκαν στη φλουοξετίνη, σε συγκεντρώσεις 0.5 mg L^{-1} , 1.5 mg L^{-1} , 5 mg L^{-1} . Η στατιστική ανάλυση έγινε με one – way ANOVA. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τεσσάρων φαρμακολογικών χειρισμών.

4.4. Συζήτηση

Η κολυμβητική συμπεριφορά και συγκεκριμένα η κινητικότητα αποτελούν τους πλέον ευαίσθητους δείκτες της επίδρασης των φαρμακολογικών χειρισμών στις προνύμφες zebrafish. Η σύντομη έκθεση στη φλουοξετίνη είχε ως αποτέλεσμα τη συνολική μείωση της κινητικότητας των προνυμφών καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Η ομάδα με την έκθεση στην υψηλότερη συγκέντρωση φλουοξετίνης (Flx C) παρουσίασε τη χαμηλότερη κινητικότητα καθώς και τη μικρότερη απόκριση στις εναλλαγές φωτός – σκοταδιού. Γενικά, κάθε σκοτεινή περίοδος χαρακτηρίστηκε από μία σταθερότητα στην απόκριση αποφυγής, με τις τρεις πειραματικές ομάδες να παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλότερη κινητικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Με την πρώτη έκθεση σε φως, οι προνύμφες στις οποίες είχε χορηγηθεί φλουοξετίνη είχαν σημαντικά χαμηλότερη κινητικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, κάτι το οποίο όμως δεν συνεχίστηκε και στις επόμενες φωτεινές περιόδους.

Εναλλασσόμενες περιόδοι φωτός και σκότους προκαλούν ένα σταθερό και επαναλαμβανόμενο μοτίβο κινητικής απόκρισης στις προνύμφες zebrafish (MacPhail *et al.*, 2009). Στο συγκεκριμένο πείραμα, η σταδιακή αύξηση της δραστηριότητας κατά τη φωτεινή περίοδο παρατηρήθηκε μόνο στις

προνύμφες της ομάδας ελέγχου, ενώ στις προνύμφες στις οποίες χορηγήθηκε φλουοξετίνη η μείωση της δραστηριότητάς τους παρέμεινε σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια κάθε φωτεινής περιόδου. Αυτού του είδους μείωση στην απόκριση στο φως έχει παρατηρηθεί σε προνύμφες ύστερα από έκθεση σε ουσίες που μειώνουν το κατώφλι ευαισθησίας στο φως (Matsui *et al.*, 2006). Παρατήρηση η οποία ενδεχομένως σχετίζεται με το γεγονός πως η φλουοξετίνη έχει φανεί πως επιδρά στη λειτουργία του αμφιβληστροειδούς στους ανθρώπους, προκαλώντας προβλήματα όρασης στους ασθενείς που τη χρησιμοποιούν ως αντικαταθλιπτική θεραπεία (Hughes *et al.*, 2016).

Τα δεδομένα από την επίδραση που ασκεί η σύντομη έκθεση στη φλουοξετίνη είναι σε γενικές γραμμές αρκετά περιορισμένα. Σύντομη έκθεση σε 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ φλουοξετίνης μείωσε την κινητική δραστηριότητα σε είδη κυπρίνων (Winder *et al.*, 2012) και σε ψάρια μονομάχους (*Betta splendens*) (Kohlert *et al.*, 2012). Επιπλέον, σύντομη έκθεση 2 ωρών σε φλουοξετίνη ποικίλων δόσεων (από 0.2 έως 2 mg L^{-1}), μείωσε σημαντικά τη συμπεριφορά αποφυγής σε προνύμφες zebrafish ηλικίας 7 dpf (Richendrer *et al.*, 2012). Έκθεση σε 0.5 μM (0.15 mg L^{-1}) φλουοξετίνης για 24 ώρες μείωσε τη συνολική κινητικότητα των προνυμφών σε συνθήκες ηρεμίας, καθώς και την κινητική απόκριση αποφυγής σε φωτεινά και μηχανικά ερεθίσματα (Faria *et al.*, 2021). Ταυτόχρονη χορήγηση φαρμακολογικών ουσιών που αυξάνουν (δεπρενύλη) και μειώνουν (PCPA) τη σεροτονίνη, επανέφερε την κινητικότητα των προνυμφών, τόσο σε συνθήκες ηρεμίας όσο και ύστερα από έκθεση σε στρεσογόνα ερεθίσματα (Sallinen *et al.*, 2009; Faria *et al.*, 2021). Η συμπεριφορική αυτή επαναφορά δείχνει πως η σεροτονίνη αποτελεί το ρυθμιστή κλειδί για τις συγκεκριμένες συμπεριφορικές αποκρίσεις των προνυμφών στη φλουοξετίνη.

Τα περισσότερα πειράματα χορήγησης φλουοξετίνης σε προνύμφες zebrafish αφορούν μακροχρόνια έκθεση στην ουσία, η οποία ξεκινάει από το ζυγωτό και εκτείνεται μέχρι και πέρα από το στάδιο έναρξης της ελεύθερης κολύμβησης, στις 4–5 dpf (Cunha *et al.*, 2018; de Farias *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2019; Zindler *et al.*, 2020). Συμπεριφορικές παρατηρήσεις δείχνουν μείωση της κολυμβητικής συμπεριφοράς των προνυμφών και σε αυτόν τον πειραματικό σχεδιασμό, η οποία ενδέχεται να οφείλεται στη δράση της φλουοξετίνης πάνω στην έκφραση βασικών νευροδιαβιβαστών (Airhart *et al.*, 2007; Njagi *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2013b). Στην περίπτωση των ενήλικων zebrafish με μακροχρόνια έκθεση στη φλουοξετίνη, η μείωση της απόστασης που διάνυσαν στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου, συνοδεύτηκε από μείωση της οριζόντιας δραστηριότητας. Παρόμοια παρατήρηση ύστερα από χορήγηση φλουοξετίνης έγινε και σε νεαρά άτομα σολομού (Clements and Schreck, 2007) καθώς και στο είδος *Cyprinodon variegatus* (Winder *et al.*, 2012). Ομοίως, ενήλικα κυπρινοειδή του είδους *Pimephales promelas* (fathead minnows) που εκτέθηκαν σε περιβαλλοντικού ενδιαφέροντος δόσεις φλουοξετίνης μείωσαν την απόσταση κίνησής τους καθώς και την απόκρισή τους σε θηρευτές (Weinberger II and Klaper, 2014). Η μειωμένη απόκριση

αποφυγής θηρευτών αποτελεί μία καθολική παρατήρηση ύστερα από χορήγηση φλουοξετίνης σε αρκετά είδη ιχθύων (Gaworecki and Klaine, 2008; Barbosa *et al.*, 2012; Pelli and Connaughton, 2015). Η επίδραση στην κινητικότητα και στην κολυμβητική συμπεριφορά ενδέχεται να οφείλεται τόσο σε αλλαγές στα επίπεδα σεροτονίνης όσο και διαφόρων νευροστεροειδών.

Η θιγμοτακτική συμπεριφορά των προνυμφών δεν παρουσίασε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στο σύνολο της πειραματικής διαδικασίας. Η θιγμόταξη αποτελεί ένδειξη άγχους και στρες σε πολλούς οργανισμούς μοντέλα (Treit and Fundytus, 1988; Kallai *et al.*, 2007; Champagne *et al.*, 2010; Gerlai, 2010; Maximino *et al.*, 2010), και εκτός από την εκτενή μελέτη της στα τρωκτικά, έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμα πρωτόκολλα μελέτης της σε ενήλικα zebrafish (López-Patiño *et al.*, 2008; Champagne *et al.*, 2010; Dadda *et al.*, 2010) καθώς και σε άλλα είδη ιχθύων (Sharma *et al.*, 2009). Στο πείραμα των Richendrfer *et al.* (2012), χορήγηση 2 mg L⁻¹ φλουοξετίνης για 2 ώρες σε 7 dpf προνύμφες zebrafish δεν είχε κάποια επίδραση στη θιγμοτακτική συμπεριφορά, σε αντίθεση με τη χορήγηση διαζεπάμης, η οποία προκάλεσε αισθητή μείωση. Η διαζεπάμη αποτελεί μία βενζοδιαζεπίνη, η οποία χρησιμοποιείται για την ηρεμιστική και αγχολυτική της δράση, τόσο σε περιπτώσεις διαταραχών ύπνου και άγχους, όσο και σε περιπτώσεις κρίσεων πανικού (Roy-Byrne *et al.*, 1991). Η μείωση της θιγμόταξης με σύντομη έκθεση στο αγχολυτικό διαζεπάμη και όχι στο αντικαταθλιπτικό φλουοξετίνη αποτελεί μία πιθανή ένδειξη ανάγκης περαιτέρω διερεύνησης για το αν η θιγμόταξη αποτελεί συμπεριφορικό φαινότυπο άγχους ή φόβου.

Η δράση της φλουοξετίνης εξαρτάται ισχυρά από τη δόση στην οποία χορηγείται, ενώ δεν φαίνεται να ακολουθεί μία μονοτονική δράση. Όντως, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη συμπεριφορική απόκριση μεταξύ των προνυμφών που εκτέθηκαν σε διαφορετικές δόσεις φλουοξετίνης. Μεταξύ των ομάδων με τις τρεις δόσεις φλουοξετίνης, η κινητική απόκριση σε συνθήκες σκότους ήταν σημαντικά διαφορετική, με την ομάδα Flx A να παρουσιάζει την υψηλότερη κινητικότητα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η επίδραση της φλουοξετίνης εξαρτάται από τη συγκέντρωσή της, με χαμηλότερες συγκεντρώσεις του αντικαταθλιπτικού να μειώνουν τα επίπεδα ορμονών στρες και υψηλότερες συγκεντρώσεις να τα αυξάνουν. Οι Yang *et al.* (2014) έδειξαν πως έμβρυα zebrafish είχαν μειωμένα επίπεδα ACTH όταν εκτέθηκαν στο αντικαταθλιπτικό αμιτρυπτίνη σε δόσεις των 10 και 100 ng L⁻¹, ενώ είχαν υψηλότερη συγκέντρωση όταν εκτέθηκαν σε 1 mg L⁻¹, συμπεραίνοντας πως η θεραπευτική δράση περιορίζεται κυρίως στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Επιπλέον, σύντομη έκθεση προνυμφών zebrafish σε 2 mg L⁻¹ φλουοξετίνης είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά μεγαλύτερη μείωση ταχύτητας σε σύγκριση με τις προνύμφες που εκτέθηκαν σε 0.2 mg L⁻¹ ουσίας (Richendrfer *et al.*, 2012).

Η χρόνια χορήγηση SSRIs αποτελεί μία θεραπευτική λύση για αρκετές αγχώδεις διαταραχές, μεταξύ αυτών τις διαταραχές πανικού (Bruce *et al.*, 2003), τη διαταραχή κοινωνικού άγχους (Blanco

et al., 2003) και μετατραυματικού στρες (Berlant 2003). Εντούτοις, στην αρχική φάση της θεραπείας έχει φανεί πως στους ανθρώπους εντείνονται τα συμπτώματα άγχους (Jick et al., 2004; Grillon et al., 2007), με την αγχογενή αυτή δράση να έχει δειχθεί σε πολλά μοντέλα οργανισμούς (Kurt et al., 2000; Belzung et al., 2001; Drapier et al., 2007; Liu et al., 2010), και κυρίως στα τρωκτικά. Έχει υποτεθεί πως αυξημένη νευροδιαβίβαση της σεροτονίνης σχετίζεται με την αγχογένεση, ενώ μία μείωσή της ενδέχεται να έχει αγχολυτική δράση. Ο ρόλος της σεροτονίνης στο άγχος είναι περίπλοκος και εξαρτάται από την νευροδιαβίβασή της σε πολλαπλές εγκεφαλικές περιοχές, τον τύπο των συμπεριφορικών δοκιμασιών που χρησιμοποιούνται για να εκτιμήσουν το άγχος καθώς και το συναισθηματικό και γνωστικό πλαίσιο των δοκιμασιών (Handley et al., 1993; Salchner and Singewald, 2002). Οι Bagdy et al. (2001) κατέληξαν πως το αυξημένο άγχος ύστερα από οξεία χορήγηση φλουοξετίνης στα τρωκτικά και πιθανώς και στους ανθρώπους ρυθμίζεται από την ενεργοποίηση των 5 – HT_{2C} υποδοχέων. Επιπλέον κατέληξαν πως και οι υποδοχείς 5 – HT_{1A} και 5 – HT_{2C} συμμετέχουν στη μείωση της κινητικότητας που προκαλούν τα SSRIs.

Η επίδραση της φλουοξετίνης φαίνεται να εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, μεταξύ αυτών από το χρόνο και τη διάρκεια της έκθεσης στο φάρμακο και από το εάν η επίδραση εκτιμάται ύστερα από κάποια έκθεση σε στρεσογόνο παράγοντα. Επίσης το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο βρίσκεται ο οργανισμός επηρεάζει σημαντικά την επίδραση της σεροτονεργικής ρύθμισης με μακροχρόνιες επιπτώσεις, μεταξύ αυτών στην ανάπτυξη και έκφραση του HPA/HPI άξονα και στην εκδήλωση συμπεριφορών άγχους (Kiryanova et al., 2013). Έκθεση σε φλουοξετίνη κατά το εμβρυικό στάδιο επιδρά στη θνητότητα και στην ανάπτυξη. Ακόμα και πολύ χαμηλές δόσεις φλουοξετίνης (0.0015μM) για 80 ώρες αμέσως μετά τη γονιμοποίηση μειώνουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την αποτοξίνωση και επιδρούν στη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων (Cunha et al., 2016). Επιπλέον, έκθεση σε φλουοξετίνη κατά το εμβρυικό και προνυμφικό στάδιο αλλάζει τη έκφραση σεροτονεργικών γονιδίων (Pei et al., 2017) καθώς και γονιδίων σχετικών με τον HPI άξονα (Kwan et al., 2016).

Η ομάδα με την έκθεση στην υψηλότερη συγκέντρωση φλουοξετίνης είχε σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση κορτιζόλης σε σύγκριση με τις ομάδες A και B. Οι προνύμφες των ομάδων A και B παρουσίασαν μία μειωμένη συγκέντρωση κορτιζόλης χωρίς όμως να εντοπιστεί κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά με την ομάδα ελέγχου. Η υψηλότερη συγκέντρωση που δόθηκε στην ομάδα C αποτελεί συνέχεια του πειράματος του κεφαλαίου 3, οπότε είναι και όμοια με τη συγκέντρωση που δόθηκε στα ζεύγη κυρίαρχων και υποτελών ατόμων για το σύντομο διάστημα των 2 ωρών. Ομοίως με τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου κεφαλαίου, παρατηρήθηκε μία σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση της κορτιζόλης, σε σύγκριση τόσο με την ομάδα ελέγχου όσο και με τις ομάδες που εκτέθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις του αντικαταθλιπτικού παράγοντα. Όπως αναφέρθηκε και

στο κεφάλαιο 3, μακροχρόνια χορήγηση φλουοξετίνης ($200 \mu\text{g L}^{-1}$) σε ενήλικα zebrafish έχει ως αποτέλεσμα μείωση των επιπέδων κορτιζόλης (Cachat *et al.*, 2010). Παρατηρήσεις σε πλήθος σπονδυλωτών συμφωνούν στο ότι η χρόνια έκθεση σε φλουοξετίνη μειώνει το άγχος, τις αποκρίσεις κορτικοστερόνης και την ευαισθησία του HPA άξονα (Li *et al.*, 1994; Duncan *et al.*, 1998; Norcross *et al.*, 2008; Egan *et al.*, 2009). Παράλληλα, ακόμα και σύντομη έκθεση ενηλίκων zebrafish σε φλουοξετίνη μπορεί να προκαλέσει μείωση της απόκρισης της κορτιζόλης σε οξύ στρες (De Abreu *et al.*, 2014), ενώ έκθεση στην ουσία στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια μείωσε την απόκριση στο στρες και την παραγωγή κορτιζόλης σε ενήλικα αρσενικά και θηλυκά zebrafish σε βάθος τριών γενεών (Vera-Chang *et al.*, 2018).

Αντίθετα με αυτές τις παρατηρήσεις, βρίσκονται τα αποτελέσματα από πειράματα μακροχρόνιας χορήγησης φλουοξετίνης σε γαστερόστεους (three – spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*) (Sebire *et al.*, 2015). Έκθεση σε 3 δόσεις φλουοξετίνης (3.2 , 10 και $32 \mu\text{g L}^{-1}$) αύξησε σημαντικά τη συγκέντρωση της κορτιζόλης όταν αυτή μετρήθηκε την 9η ημέρα χορήγησης της ουσίας. Η συγκεκριμένη αύξηση όμως δεν παρατηρήθηκε την 19η ημέρα χορήγησης του αντικαταθλιπτικού, όπου η συγκέντρωση κορτιζόλης των ομάδων με τις δύο χαμηλότερες δόσεις είχε επανέλθει στο ίδιο επίπεδο με την ομάδα ελέγχου, ενώ τα άτομα με την υψηλότερη δόση φλουοξετίνης εξακολουθούσαν να εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση κορτιζόλης. Αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης ύστερα από έκθεση σε φλουοξετίνη για 24 ώρες παρατηρήθηκε και σε ένα είδος πεσκανδρίτσας (Morando *et al.*, 2009). Αντίστοιχη παρατήρηση έχει γίνει και σε αρουραίους, με υψηλότερα επίπεδα κορτικοστεροειδών ύστερα από χορήγηση φλουοξετίνης (0.75mg kg^{-1}) για 4 εβδομάδες (Fuller and Snoddy, 1990; Taylor *et al.*, 1996). Ενδιαφέροντα αποτελέσματα προέκυψαν ύστερα από μακροχρόνια χρήση (2 hpf έως 5 dpf) ενός ισχυρού αναστολέα επαναπρόσληψης της σεροτονίνης και νοραδρεναλίνης, της βενλαφαξίνης, σε προνύμφες zebrafish (Tang *et al.*, 2021). Χαμηλή δόση της ουσίας αύξησε σημαντικά τη συγκέντρωση κορτιζόλης στις προνύμφες, δράση η οποία αντιστράφηκε με παράλληλη χορήγηση μελατονίνης. Στην περίπτωση αυτή, η βενλαφαξίνη άσκησε ρυθμιστική δράση στην κορτιζόλη μέσω του μονοπατιού cAMP/pCREB.

Η κατάθλιψη καθώς και οι αγχώδεις διαταραχές σχετίζονται συχνά με υπερενεργό άξονα HPA (Bhagwagar *et al.*, 2005) ή απορρύθμιση του ενδοκρινικού άξονα του στρες (Duncan *et al.*, 1998). Τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα φαίνεται πως δρουν στον άξονα HPA, κυρίως μέσω αλλαγών στους υποδοχείς GR και MR (Bjartmar *et al.*, 2000). Υποστηρίζεται πως η φλουοξετίνη επιδρά στη γενετική έκφραση του *gr* και *mr*, καθώς και στην έκφραση των μεταφορέων GABA στον εγκέφαλο, προκαλώντας κατ' αυτό τον τρόπο μείωση της απόκρισης στο στρες (Wong *et al.*, 2010; 2013b; Ziv *et al.*, 2013). Τα δεδομένα από την επίδραση των SSRIs στα επίπεδα κορτιζόλης ασθενών παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση. Χρόνια χορήγηση SSRI μείωσε τα επίπεδα κορτιζόλης και κανονικοποίησε την

καταστολή της κορτιζόλης στη δοκιμασία της δεξαμεθαζόνης (Aihara *et al.*, 2007). Παρ' όλα αυτά, σε μερικές μελέτες έχει φανεί αδύνατο να εντοπιστεί μείωση της κορτιζόλης ύστερα από χρόνια χορήγηση SSRI (Vythilingam *et al.*, 2004; Weber-Hamann *et al.*, 2007). Από την άλλη, η σύντομη χρήση SSRI έχει φανεί πως ενεργοποιεί τον άξονα HPA (Holsboer and Barden, 1996), καθώς παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα κορτιζόλης στην ηρεμία και μειωμένη καταστολή της κορτιζόλης σε χρήστες SSRI (Manthey *et al.*, 2011). Έχει προταθεί πως ασθενείς με κατάθλιψη έχουν χαρακτηριστικά υψηλά επίπεδα κορτιζόλης, ενδεχομένως λόγω αυξημένης ενεργότητας του άξονα HPA. Παρόλα αυτά, οι Piwowarska *et al.* (2012) δεν εντόπισαν υψηλότερα επίπεδα κορτιζόλης στα άτομα με κατάθλιψη ούτε και μείωση της κορτιζόλης με χορήγηση φλουοξετίνης, μετρώντας την ώρες μετά τη χορήγησή της σε διάστημα έως και 8 εβδομάδων. Παρατήρησαν όμως μία διαφορά μεταξύ των ατόμων που αποκρίθηκαν στην αντικαταθλιπτική θεραπεία και εκείνων που δεν είχαν κάποια απόκριση, καθώς η κορτιζόλη μειώθηκε με τη χορήγηση φλουοξετίνης μόνο στα άτομα που αποκρίθηκαν στη θεραπεία. Ενδεχομένως, οι καταθλιπτικοί ασθενείς να έχουν πρόβλημα όχι τόσο στα επίπεδα ηρεμίας τους, όσο στα επίπεδα απόκρισης της κορτιζόλης σε ένα στρεσογόνο ερέθισμα (Peeters *et al.*, 2003). Η υπόθεση αυτή στηρίζεται επιπλέον από το γεγονός πως η υπερενεργότητα του HPA θεωρείται παράγοντας μη απόκρισης στην φλουοξετίνη ή αργής απόκρισης (Young *et al.*, 2004). Αποδυνάμωση του άξονα HPA έχει υποτεθεί επίσης πως σχετίζεται με την θεραπευτική αποτελεσματικότητα των αντικαταθλιπτικών (Pariante, 2009).

Στα θηλαστικά έχει όντως εντοπιστεί μία σύνδεση μεταξύ της εγκεφαλικής σεροτονεργικής δραστηριότητας και του άξονα HPA (Dinan, 1996; Carrasco and Van De Kar, 2003). Σήματα του στρες ενεργοποιούν προσυναπτικούς σεροτονεργικούς υποδοχείς, οι οποίοι διεγείρουν τη νευροενδοκρινική δραστηριότητα μέσω του συμπαθητικού νευρικού συστήματος (ΣΝΣ) ή μέσω του HPA άξονα. Αυτό με τη σειρά του θα οδηγήσει στην παραγωγή νοραδρεναλίνης ή γλυκοκορτικοστεροειδών αντίστοιχα, προκειμένου να προκληθούν περιφερικές αποκρίσεις. Στο ΣΝΣ, τα σήματα του υποθαλάμου προκαλούν έκκριση νοραδρεναλίνης σε τοπικούς (localized) συμπαθητικούς νευρώνες που νευρώνουν άμεσα την περιφέρεια του σώματος. Αντίθετα, στον HPA άξονα, οι νευρώνες του υποθαλάμου που ενεργοποιούνται από τη σεροτονίνη εκκρίνουν CRH, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την έκκριση ACTH από την υπόφυση και τελικά τη σύνθεση γλυκοκορτικοστεροειδών από τα επινεφρίδια (μεσονεφρικό ιστό στους τελεόστεους). Τα γλυκοκορτικοστεροειδή στη συνέχεια κυκλοφορούν ελεύθερα στο αίμα και μπορούν να προσδεθούν στον υποδοχέα GR (Kwan *et al.*, 2016). Στους τελεόστεους, η έκκριση κορτιζόλης ελέγχεται εκτός από τον άξονα HPA και από έναν μηχανισμό αρνητικής ανάδρασης όπου αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης σηματοδοτούν μείωση της ACTH μέσω του υποθαλάμου και της υπόφυσης (Mommensen *et al.*, 1999). Είναι αρκετές οι έρευνες που υποστηρίζουν πως η υποθαλαμική σεροτονίνη συμμετέχει στη ρύθμιση

του άξονα HPI, καθώς ένεση με σεροτονίνη ή με αγωνιστή του σεροτονεργικού υποδοχέα 5-HTR_{1A} προκαλεί έκκριση κορτιζόλης στα σαλμονοειδή (Winberg *et al.*, 1997; Höglund *et al.*, 2002) και σε είδη πεσκανδρίτσας (Medeiros *et al.*, 2010). Υπερενεργοποίηση της σεροτονεργικής σηματοδότησης κατά την κρίσιμη περίοδο της εγκεφαλικής ανάπτυξης, έχει φανεί πως αυξάνει σημαντικά την έκφραση του GR στον ιππόκαμπο των αρουραίων (Mitchell *et al.*, 1990). Επιπλέον, ενεργοποίηση του GR στον ιππόκαμπο ελέγχει τη ρύθμιση της αρνητικής ανάδρασης της κορτιζόλης, μειώνοντας την απόκριση του HPA στο στρες (Sapolsky *et al.*, 1984; Zhang *et al.*, 2013). Διαφωτιστική είναι η μελέτη της δράσης της σεροτονίνης στον άξονα HPI σε χρυσόψαρα, όπου αποκάλυψε *in vivo* και *in vitro* πως αγωνιστές σεροτονίνης προκαλούν έκκριση κορτιζόλης (Lim *et al.*, 2013). Πιο συγκεκριμένα φάνηκε πως η σεροτονίνη μπορεί να ενεργοποιήσει άμεσα την απελευθέρωση γλυκοκορτικοστεροειδών από το μεσόνεφρο, με τη δράση αυτή να πραγματοποιείται μέσω πολλών τύπων σεροτονεργικών υποδοχών. Τέλος έδειξαν πως τα χρωμοφόρα κύτταρα (chromaffin) του πρόνεφρου περιέχουν σεροτονίνη.

Συμπερασματικά, σύντομη χορήγηση τριών δόσεων φλουοξετίνης σε προνύμφες zebrafish προκάλεσε σημαντική μείωση της κινητικότητάς τους, με την ομάδα η οποία εκτέθηκε στην υψηλότερη συγκέντρωση φλουοξετίνης (Flx C) να παρουσιάζει τη χαμηλότερη κινητικότητα καθώς και τη μικρότερη απόκριση στις εναλλαγές φωτός – σκοταδιού. Επιπλέον, επιβεβαιώνεται η δράση υψηλής συγκέντρωσης φλουοξετίνης στον άξονα HPI, όπως έδειξε η σημαντικά μεγαλύτερη συγκέντρωση κορτιζόλης στις προνύμφες της συγκεκριμένης ομάδας.

Κεφάλαιο 5. Αγχώδους τύπου και κοινωνική συμπεριφορά σε ενήλικα zebrafish με σίγαση γονιδίων υποδοχέων γλυκοκορτικοστεροειδών

5.1. Εισαγωγή

Ο όρος προσωπικότητα αντιπροσωπεύει ατομικές διαφορές σε συναισθηματικά, κινητικά και γνωσιακά χαρακτηριστικά ιδιοσυγκρασίας (temperament), τα οποία παραμένουν σταθερά υπό διαφορετικές συνθήκες, περιβάλλοντα και χρονικές στιγμές (Sih *et al.*, 2004; Bell, 2007; Volgin *et al.*, 2019). Συμπεριφορικές και νευροβιολογικές μελέτες των τελευταίων ετών έχουν εισαγάγει τον όρο προσωπικότητα και σε άλλα είδη εκτός από τον άνθρωπο και τα πρωτεύοντα. Είναι γνωστό πως γενετικοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις ατομικές συμπεριφορικές διαφορές, τόσο στους ανθρώπους (Bouchard and Loehlin, 2001), όσο και στα ζώα (van Oers *et al.*, 2005). Χαρακτηριστικά ιδιοσυγκρασίας, όπως τα επίπεδα ενεργητικότητας, η ευαισθησία, η προσαρμοστικότητα, η διάθεση, η επιμονή και η ικανότητα συγκέντρωσης, μπορούν να ερμηνευθούν καθώς και να καταταχθούν ως παράγοντες κινδύνου για διάφορες ψυχιατρικές διαταραχές, όπως διαταραχή ελλειμματικής προσοχής/συγκέντρωσης (ΔΕΠΥ, ADHD), κατάθλιψη και άγχος (Fox and Pine, 2012). Οι διαφορές αυτές στην ιδιοσυγκρασία παρατηρούνται και στα τρωκτικά (Podhorna and Brown, 2002; Drossoroulou *et al.*, 2004). Πρόσφατες έρευνες έδειξαν πως εξερευνητικά ποντίκια είναι λιγότερο αγχώδη στη δοκιμασία φωτεινότητας/σκοτεινότητας καθώς και στον υπερυψωμένο σταυροειδή λαβύρινθο (elevated plus-maze), σε σύγκριση με τα χαμηλής εξερευνητικότητας ποντίκια (Kazlauskas *et al.*, 2005). Ανάλογες συμπεριφορικές διαφορές παρατηρούνται και μεταξύ διαφορετικών γενετικών γραμμών. Είναι γνωστό πως τα ποντίκια της γενετικής γραμμής C57BL/6 είναι λιγότερο εξερευνητικά και περισσότερο αγχώδη, επιδεικνύουν χαμηλότερους ρυθμούς μάθησης σε σχετικές δοκιμασίες, αλλά έχουν καλύτερη επίδοση στον λαβύρινθο νερού, σε σύγκριση με τα ποντίκια της γραμμής DBA/2 (Podhorna and Brown, 2002).

Η σχετική βιβλιογραφία έχει αρχίσει να εμπλουτίζεται και με δεδομένα για χαρακτηριστικά ιδιοσυγκρασίας στους τελεόστεους (Francis, 1990; Burns, 2008) και μεταξύ αυτών και στο zebrafish (Tran and Gerlai, 2013; Yuan *et al.*, 2018): ντροπαλότητα - τολμηρότητα, αποφυγή - εξερευνητικότητα, κινητική δραστηριότητα, επιθετικότητα και κοινωνικότητα (Conrad *et al.*, 2011). Έχουν εντοπιστεί διακριτές ατομικές διαφορές στη συμπεριφορά των zebrafish, με ξεκάθαρη δυνατότητα ταξινόμησης σε υποκατηγορίες υψηλής, μέσης και χαμηλής κινητικότητας και αντίστοιχα άγχους (Tran and Gerlai, 2013; Stewart *et al.*, 2014). Επιπλέον, η ντροπαλότητα στο zebrafish φαίνεται να σχετίζεται με αγχώδους τύπου μειωμένη εξερευνητικότητα και απόκριση στους στρεσογόνους παράγοντες (Oswald *et al.*, 2013). Από την άλλη, η τολμηρότητα σχετίζεται με κοινωνική κυριαρχία, η οποία εκτιμάται μέσω δοκιμασιών κοινωνικής και επιθετικής φύσης (Dahlbom *et al.*, 2011).

Ο τρόπος με τον οποίο οι οργανισμοί επιλέγουν να αντιμετωπίσουν κοινωνικές καταστάσεις έχει συσχετιστεί με διαφορές στην έκφραση γονιδίων του άξονα HPI. Η δοκιμασία «κατοίκου – εισβολέα» (resident – intruder model) στα τρωκτικά έχει βοηθήσει να συλλεχθεί αρκετή γνώση για τις στρατηγικές αντιμετώπισης καταστάσεων και τους μηχανισμούς που τις διέπουν. Έχει φανεί πως η κοινωνική αυτή αντιπαράθεση προκαλεί αύξηση της ACTH μόνο στο πλάσμα των αρουραίων κατοίκων που αποκρίθηκαν με παθητικότητα, ενώ οι επιθετικοί κάτοικοι δεν έδειξαν κάποια αύξηση στην ACTH (Ebner *et al.*, 2005). Οι παρατηρήσεις αυτές επεκτείνονται στα πρωτεύοντα (Cristóbal-Azkarate *et al.*, 2007) καθώς και σε άλλα είδη όπως οι χοίροι και οι όρνιας, όπου τα άτομα που αντέδρασαν ενεργητικά στις στρεσογόνες συνθήκες, δεν έδειξαν αύξηση στην ενεργοποίηση του άξονα HPI και στα επίπεδα των γλυκοκορτικοστεροειδών, σε σχέση με εκείνα με την πιο παθητική αντιμετώπιση (Hessing, 1994; Korte *et al.*, 1997; Ruis *et al.*, 2000). Η προτίμηση για παθητική – μη επιθετική επίλυση προβλημάτων, η οποία φαίνεται πως σχετίζεται με ενεργοποίηση του άξονα HPI και αυξημένα επίπεδα της ACTH και των γλυκοκορτικοστεροειδών (Bohus *et al.*, 1987; Koolhaas *et al.*, 1999; Ebner *et al.*, 2005), ταυτίζεται με την αναδραστική στρατηγική αντιμετώπισης στρεσογόνων καταστάσεων.

Οι διαφορές στην ιδιοσυγκρασία και στην αντιμετώπιση καταστάσεων αποκαλύπτονται όχι μόνο στα πλαίσια μίας οξείας και σύντομης καταπόνησης, αλλά και σε έκθεση σε χρόνιες συνθήκες καταπόνησης. Πρωτόκολλα χρόνιου απρόβλεπτου στρες έχουν αναπτυχθεί σε πολυάριθμα μοντέλα οργανισμούς, όπου η συνεχής έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες αποσκοπεί στην εμφάνιση συμπτωμάτων έντονου άγχους και στη μοντελοποίηση της κλινικής κατάθλιψης και των σχετικών διαταραχών της διάθεσης (Pittenger and Duman, 2008). Στο zebrafish, η πρώτη μελέτη αντίστοιχου πρωτοκόλλου έδειξε αύξηση επιπέδων άγχους, μειωμένη γνωσιακή λειτουργία, αυξημένη έκφραση Crf και μειωμένη έκφραση του Gr (Piato *et al.*, 2011). Επιπροσθέτως, οι Chakravarty *et al.* (2013) έπειτα από εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου χρόνιας καταπόνησης στο zebrafish παρατήρησαν έναν φαινότυπο άγχους και διαταραχής διάθεσης. Ο συμπεριφορικός αυτός φαινότυπος υπέθεσαν πως πηγάζει από αλλαγές στην πρωτεϊνική έκφραση στον εγκέφαλο, η οποία αποδόθηκε σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Αν και τα πρωτόκολλα χρόνιου απρόβλεπτου στρες στο zebrafish αποτελούνται από υψηλής έντασης στρεσογόνους παράγοντες, όταν ενήλικα zebrafish εκτέθηκαν σε πρωτόκολλο χρόνιου απρόβλεπτου στρες χαμηλής έντασης δεν επηρεάστηκε ούτε η συμπεριφορά τους αλλά ούτε και η συγκέντρωση κορτιζόλης στο σώμα τους (Pavlidis *et al.*, 2015).

Υπάρχει σημαντική ατομική διαφοροποίηση στη ρύθμιση της γλυκοκορτικοστεροειδούς απόκρισης ύστερα από έκθεση σε στρεσογόνες προκλήσεις (Kirschbaum *et al.*, 1995; Federenko *et al.*, 2004; Foley and Kirschbaum, 2010), διαφοροποίηση η οποία έχει συσχετιστεί με ευαισθησία στην ανάπτυξη ψυχοπαθολογίας (Kirschbaum *et al.*, 1995; de Kloet *et al.*, 2005; Kudielka *et al.*, 2006). Η

πιθανότητα η ατομική διαφορά στην απόκριση των γλυκοκορτικοστεροειδών να σχετίζεται με διαφορετικά ηθολογικά πρότυπα έχει φανεί σε μελέτες με αρουραίους. Συγκεκριμένα, τρεις γενετικές γραμμές αρουραίων με διακριτή διαφορά στο μέγεθος της απόκρισης των γλυκοκορτικοστεροειδών (κορτικοστερόνη) ύστερα από έκθεση σε στρες, έδειξαν διαφορές και στα ηθολογικά τους πρότυπα (Walker *et al.*, 2017). Η γραμμή με την υψηλότερη γλυκοκορτικοστεροειδή απόκριση παρουσίασε υψηλή επιθετικότητα και αγχώδους τύπου συμπεριφορά.

Η πρώτη προσπάθεια σίγασης των γονιδίων για τους γλυκοκορτικοστεροειδείς υποδοχείς έγινε σε γενετικές γραμμές ποντικών και έδειξε πως τα γλυκοκορτικοστεροειδή είναι απαραίτητα για τη σωστή ανάπτυξη και οργανογένεση (Cole *et al.*, 1995). Τα ποντίκια της συγκεκριμένης γενετικής γραμμής, λόγω αναπνευστικής ανεπάρκειας, αδυνατούσαν να επιβιώσουν λίγες ώρες μετά τη γέννησή τους. Ο περιορισμός αυτός οδήγησε στην ανάπτυξη διαγονιδιακών ποντικών με στοχευμένη σίγαση των συγκεκριμένων γονιδίων σε ιστούς. Υπό το φως των συγκεκριμένων πειραμάτων, σε ποντίκια με σίγαση του GR στον εγκέφαλο παρατηρήθηκε μείωση της αγχώδους συμπεριφοράς, καταδεικνύοντας τον ρόλο των γλυκοκορτικοστεροειδών στη ρύθμιση της συμπεριφοράς (Tronche *et al.*, 1999). Εξάλλου, ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα γλυκοκορτικοστεροειδών έχουν εντοπιστεί σε ψυχιατρικές παθήσεις, όπως η σχιζοφρένεια, οι διαταραχές διάθεσης και το μετατραυματικό στρες (Silverman and Sternberg, 2012), καθώς και εξαρτήσεις σε ναρκωτικές ουσίες και αλκοόλ (Ambroggi *et al.*, 2009).

Πρωταρχικές έρευνες που συγκρίνουν γενετικές γραμμές zebrafish με σίγαση στα γονίδια των γλυκοκορτικοστεροειδών φώτισαν τους διακριτούς και συμπληρωματικούς ρόλους των MR και GR σηματοδοτήσεων στην ανάπτυξη του άξονα στρες (Faught and Vijayan, 2018). Ενήλικα zebrafish με σίγαση στο γονίδιο του GR ($gr^{s357/s357}$) επιδεικνύουν μειωμένη εξερευνητικότητα και διαταραγμένη ικανότητα εξοικείωσης (habituation) σε στρεσογόνες καταστάσεις, όπως νεοφανείς συνθήκες (Ziv *et al.*, 2012). Η απουσία λειτουργικού GR είχε ως αποτέλεσμα έναν συμπεριφορικό φαινότυπο που προσέγγιζε εκείνον της κατάθλιψης στους ανθρώπους, φαινότυπος ο οποίος φάνηκε να αντιστρέφεται από τη φλουοξετίνη (Sireeni *et al.*, 2020). Αν και στο είδος *Oryzias latipes* έχει μελετηθεί μία μετάλλαξη σίγασης του MR, δεν μελετήθηκε ο ρόλος του συγκεκριμένου υποδοχέα στη λειτουργία του άξονα HPI (Sakamoto *et al.*, 2016). Συμπεριφορικά δεδομένα όμως σε ενήλικα άτομα έδειξαν πως επηρεάστηκε η κινητική συμπεριφορά απόκρισης σε οπτικά κινητικά ερεθίσματα.

Στα πλαίσια των πειραμάτων του συγκεκριμένου κεφαλαίου χρησιμοποιήθηκαν τρεις γενετικές γραμμές ενηλίκων zebrafish, οι $gr^{-/-}$, $mr^{-/-}$ και τα αγρίου τύπου (WT) ως ομάδα ελέγχου. Οι δύο πρώτες γενετικές γραμμές χαρακτηρίζονται από σίγαση του γονιδίου που εκφράζει τον γλυκοκορτικοστεροειδή υποδοχέα (GR) και τον αλατοκορτικοστεροειδή υποδοχέα (MR), αντίστοιχα. Οι ηθολογικές παρατηρήσεις σε άτομα $gr^{-/-}$ είναι περιορισμένες, ενώ η συμπεριφορά των $mr^{-/-}$

ατόμων έχει μελετηθεί μέχρι τώρα μόνο σε προνυμφικό αναπτυξιακό επίπεδο. Στόχος της συγκεκριμένης μελέτης ήταν ο ηθολογικός χαρακτηρισμός των γενετικών γραμμών με σίγαση στα γονίδια των υποδοχέων γλυκοκορτικοστεροειδών. Βασική έμφαση δόθηκε στον εντοπισμό διαφορών στη συμπεριφορική απόκριση σε συνθήκες υψηλού στρες και νεοφανών συνθηκών, αλλά και σε συνθήκες χρόνιας καταπόνησης. Επιπλέον μελετήθηκε η κοινωνική και αγωνιστική συμπεριφορά των zebrafish των συγκεκριμένων γενετικών γραμμών.

5.2. Υλικά & Μέθοδοι

5.2.1. Χειρισμός και προέλευση πειραματόζωων

Οι γενετικές γραμμές zebrafish οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στα συγκεκριμένα πειράματα, $gr^{-/-}$, $mr^{-/-}$, καθώς και η γραμμή αγρίου τύπου (WT) αποτέλεσαν χορηγία της Καθηγήτριας Luisa Dalla Valle (Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πάντοβα, Ιταλία). Το γενετικό υπόβαθρο των γενετικών μεταλλάξεων και της γραμμής αγρίου τύπου ήταν κοινό (Tg(9xGCRE-HSV.U123:EGFP)ia20) (Benato *et al.*, 2014). Η εκτροφή, η αναπαραγωγή και τα σχετικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ιχθύων του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Η διαβίωση των zebrafish έγινε στο ειδικό κλειστό σύστημα ανακύκλωσης του νερού ZebTEC Active Blue Stand Alone (Techniplast), το οποίο αποτυπώνεται στην **Εικόνα 5.1**. Το συγκεκριμένο σύστημα διαθέτει βιολογικό και μηχανικό φίλτρο καθαρισμού του νερού, καθώς και σύστημα αποστείρωσης του εισαγόμενου νερού προκειμένου να εξασφαλιστεί η επιθυμητή ποιότητα. Επιπλέον δίνει τη δυνατότητα σταθερής ρύθμισης και ελέγχου των παραμέτρων του νερού. Στα πλαίσια αυτά, η θερμοκρασία νερού στις δεξαμενές του συστήματος διατηρείται στους 28°C, το pH στο 7.0 και η αγωγιμότητα στο 450 μS . Παράλληλα, με τη χρήση εμπορικών συσκευασιών (Sera kit) διεξαγόταν μέτρηση των συγκεντρώσεων της αμμωνίας, νιτρικών, νιτρωδών μία φορά το μήνα για επιβεβαίωση της σωστής λειτουργίας του βιολογικού φίλτρου του συστήματος. Ο φωτισμός του εργαστηριακού χώρου ήταν τεχνητός και ακολουθούσε μία σταθερή φωτοπερίοδο με 12 ώρες μέρα και 12 ώρες νύχτα.

Από την ηλικία των 15 dpf (στάδιο προνύμφης), τα zebrafish εισάγονται στο σύστημα στέγασης εξασφαλίζοντας συνεχή ροή νερού. Κατά το στάδιο αυτό, στεγάζονται σε ειδικές δεξαμενές του συστήματος (1 L) εξοπλισμένες με ειδικά φίλτρα με οπές διαμέτρου 300 μm , οι οποίες προστατεύουν τις προνύμφες από την ροή του νερού. Όσο μεγαλώνουν οι προνύμφες, χρησιμοποιούνται φίλτρα με μεγαλύτερες οπές (500 μm), οι οποίες εξασφαλίζουν καλύτερη ροή νερού στην δεξαμενή και καλύτερο περιβάλλον διαβίωσης. Με την ολοκλήρωση του πρώτου μήνα ζωής τους, τα νεαρά πλέον zebrafish (juveniles) μεταφέρονται σε μεγαλύτερες δεξαμενές των 3.5 L ή 8 L, ανάλογα με την πυκνότητα της ομάδας. Μέχρι και την ενηλικίωση τους (3 μήνες), οι δεξαμενές στις οποίες

στεγάζονται φέρουν ειδικό φίλτρο με οπές διαμέτρου 800 μm , οι οποίες προστατεύουν τα νεαρά zebrafish από την ροή του νερού.



Εικόνα 5.1 | Σύστημα στέγασης zebrafish με παροχή γλυκού νερού φιλτραρισμένου μέσω συστήματος αντίστροφης ώσμωσης. Το σύστημα επιτρέπει ανακύκλωση και αποστείρωση νερού καθώς και συνεχή παρακολούθηση και ρύθμιση των παραμέτρων του νερού (θερμοκρασία, pH και αγωγιμότητα).

Τα ψάρια ταΐζονταν δύο φορές ημερησίως, εκτός από τις ημέρες των πειραμάτων. Τα ενήλικα zebrafish (ηλικίας > 3 μηνών) ταΐζονταν δύο φορές ημερησίως με την εμπορική τροφή “Zebrafeed 400-600 μm ” ειδικά σχεδιασμένη για το είδος *Danio rerio* (Sparos, Portugal) καθώς και με ζωντανή *Artemia salina*. Οι προνύμφες μέχρι και την 5^η dpf δεν ταΐζονται καθώς εξασφαλίζουν την αναγκαία

τροφή από την λέκιθο. Από την ηλικία των 5 dpf αρχίζει η χορήγηση τροφής, η οποία είναι εξειδικευμένη για το κάθε αναπτυξιακό στάδιο (Spragos, Portugal). Συγκεκριμένα, από την 5^η μέχρι και την 10^η μέρα, οι προνύμφες ταΐζονται με “Zebrafeed < 100 μm”. Από την 10^η μέχρι και την 15^η μέρα, χορηγείται τροφή “Zebrafeed 100 - 200 μm”. Από την 15^η μέρα μέχρι και 35^η μέρα, οι προνύμφες ταΐζονται με “Zebrafeed 200 - 400 μm”. Επιπλέον της συγκεκριμένης τροφής, δίνεται καθημερινά ζωντανή *Artemia salina*.

5.2.2. Διαδικασία εκκόλαψης και αποκελυφοποίησης της γαρίδας *Artemia salina*

Αρχικά παρασκευάζεται το διάλυμα καλλιέργειας κύστεων *Artemia* με προσθήκη 45 g άλατος Instant Ocean σε 1.5 L απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αναδεύεται μέχρι να ενσωματωθεί το αλάτι στον όγκο του νερού και μεταφέρεται σε ειδικό κωνικό δοχείο στο οποίο υπάρχει συνεχής τροφοδοσία αέρα με ειδική αντλία. Στην συνέχεια, προστίθενται 3 g κύστεων *Artemia salina* και επωάζονται για 24 ώρες στους 27°C. Με το πέρας των 24 ωρών και προτού δοθεί η *Artemia* στα zebrafish, είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός των ναυπλίων από τα κελύφη και τις κύστες οι οποίες δεν έχουν εκκολαφθεί. Για τον σκοπό αυτό, το διάλυμα περνάει από έναν ισχυρό μαγνήτη ο οποίος συγκρατεί τις εμπλουτισμένες με σίδηρο κύστες της *Artemia* και οι ναύπλιοι παρασύρονται. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται δύο φορές και τελικά προκύπτει ένα διάλυμα το οποίο περιέχει μόνο τους ναυπλίους της *Artemia salina*. Το συγκεκριμένο διάλυμα φιλτράρεται σε ειδικό κόσκινο το οποίο συγκρατεί τους ναυπλίους και τους ξεπλένει με απεσταγμένο νερό. Τελικά προκύπτει ένα διάλυμα όγκου 750 ml με ζωντανή *Artemia salina*, το οποίο χορηγείται στα zebrafish των διαφόρων ηλικιών με χρήση πλαστικής πιπέτας Pasteur.

5.2.3. Γονοτυπική ανάλυση

Στα πλαίσια της διαχείρισης των γενετικών γραμμών και διεξαγωγής των πειραμάτων ήταν απαραίτητος ο προσδιορισμός του γονοτύπου των zebrafish ως προς την κάθε μετάλλαξη. Για τον λόγο αυτό ακολουθήθηκε μία διαδικασία γονοτύπησης. Οι προνύμφες zebrafish (< 29 dpf, days post fertilization) θανατώθηκαν σε 600 mg L⁻¹ MS222 και τοποθετήθηκαν σε erpendorfs με 20 μl καυστικό νάτριο (50 mM NaOH). Τα νεαρά (1 - 3 μηνών) και τα ενήλικα zebrafish (> 3 μηνών) αναισθητοποιήθηκαν σε 100 mg L⁻¹ και 164 mg L⁻¹ MS222 αντίστοιχα (Matthews and Varga, 2012; Owen and Kelsh, 2021) και το καθένα μεταφέρθηκε σε ένα τρυβλίο Petri με ελάχιστο νερό. Εκεί με τη χρήση ενός νυστεριού κόπηκε ένα κομμάτι από το ουραίο πτερύγιο, το οποίο μεταφέρθηκε με ειδική λεπτή λαβίδα σε erpendorf το οποίο περιείχε 40 μl και 80 μl αντίστοιχα NaOH (50 mM).

Τα erpendorfs με το δείγμα ιστού επώαστηκαν για 15 λεπτά στους 95°C ώστε να διαλυθούν οι μεμβράνες και να εξαχθεί το DNA και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση μέσω vortex. Στη συνέχεια, 1 μl

από το συγκεκριμένο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε σε PCR, για να ενισχυθεί το σήμα από το γενετικό υλικό που είχε εξαχθεί.

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Για τον πολλαπλασιασμό του τμήματος του γονιδιώματος με την υπό διερεύνηση μεταλλαγή ακολουθήθηκε η συγκεκριμένη διαδικασία. Σε eppendorfs κατάλληλα για PCR προστέθηκαν 1 μl από το απομονωμένο DNA, 0,25 μl από το ζεύγος των εκκινητών, 5 μl ενζύμου πολυμεράσης και 3,5 μl dH₂O. Οι συνθήκες αντίδρασης PCR ήταν 95°C για 3 λεπτά και 36 κύκλοι που περιλάμβαναν 95°C για 20 s, 60°C για 30 s και 72°C για 2 λεπτά.

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Τέλος, για να εξαχθεί το επιθυμητό συμπέρασμα σχετικά με την ύπαρξη ή μη της επιθυμητής μεταλλαγής παρασκευάστηκε ένα πήκτωμα αγαρόζης 3.5% w/v. Για το πήκτωμα χρησιμοποιήθηκε TBE buffer 1X ώστε να επιτευχθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια στην απεικόνιση του μοριακού βάρους των δειγμάτων. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα DNA από zebrafish αγρίου τύπου, το οποίο έχει γνωστό γονότυπο και έχει ενισχυθεί το σήμα του με PCR. Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα παρατηρείται σε θάλαμο με υπεριώδη φωτισμό και κάμερα. Οι φωτογραφίες που λαμβάνονται από τον θάλαμο μελετώνται και τα άτομα χαρακτηρίζονται ως ομοζυγώτες ή ετεροζυγώτες.

5.2.4. Συμπεριφορικές δοκιμασίες

Οι συμπεριφορικές δοκιμασίες εφαρμόστηκαν σε τρεις πειραματικές ομάδες, *gr*^{-/-}, *mr*^{-/-} και WT, με την κάθε ομάδα να αποτελείται από 10 - 15 άτομα. Το σύνολο των συμπεριφορικών δοκιμασιών πραγματοποιήθηκε μεταξύ των ωρών 10:00 – 15:00 και πάντα 1 ώρα μετά το πρώτο τάισμα της ημέρας. Η δεξαμενή με την ομάδα των ψαριών προς δοκιμασία μεταφερόταν στο δωμάτιο συμπεριφορικών δοκιμασιών μία ώρα πριν την έναρξη του πειράματος, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί το στρες μεταφοράς και χειρισμού.

Στα πλαίσια των συγκεκριμένων πειραμάτων, η ίδια ομάδα ψαριών από κάθε γενετική γραμμή χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις δοκιμασίες, αφήνοντας 2 εβδομάδες μεταξύ της κάθε δοκιμασίας προκειμένου τα ψάρια να συνέλθουν από την όποια καταπόνηση. Ο συγκεκριμένος σχεδιασμός αποφασίστηκε προκειμένου οι πειραματικές διαδικασίες να είναι σύμφωνες με τη συνθήκη των 3Rs (Refinement – βελτίωση, Reduction – μείωση, Replacement – αντικατάσταση), οι οποίες θεσπίστηκαν με στόχο την προστασία της ευζωίας των ειδών που χρησιμοποιούνται στην έρευνα ('The Principles of Humane Experimental Technique', 1960).

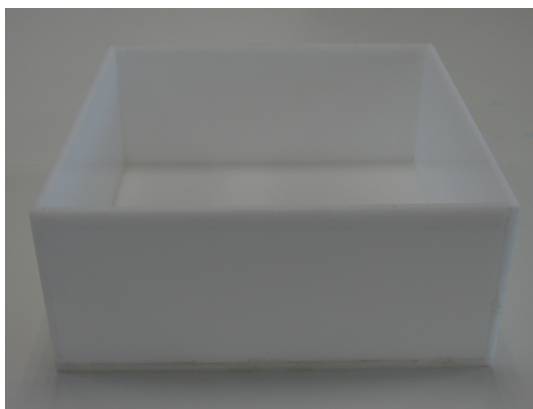
Δοκιμασία νεοφανούς δεξαμενής

Το πρωτόκολλο της συγκεκριμένης δοκιμασίας έχει περιγραφεί αναλυτικά στο κεφάλαιο 2 (σελ. 46).

Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (open field test – OFT)

Με το πέρας δύο εβδομάδων, απαραίτητος χρόνος ώστε τα άτομα να συνέλθουν από το στρες της διαχείρισης και ηθολογικής δοκιμασίας, τα zebrafish εκτέθηκαν στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου. Αποτελεί και αυτή μία προσπάθεια εκτίμησης της απόκρισης σε ένα άγνωστο περιβάλλον, με τη διαφορά πως εστιάζει στην οριζόντια εξερευνητική τάση των zebrafish (Stewart *et al.*, 2012). Σημαντική παράμετρος εκτίμησης των επιπέδων καταπόνησης των οργανισμών είναι η θιγμοτακτική τους συμπεριφορά, ο χρόνος δηλαδή που περνούν κοντά στα τοιχώματα της δεξαμενής (thigmotaxis) καθώς και το πόσο επιφυλακτικοί είναι στην προσέγγιση και είσοδό τους στο κέντρο της κατασκευής. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης δοκιμασίας κατασκευάστηκε μία δεξαμενή διαστάσεων 40 x 40 x 15 cm από λευκό πλεξιγκλάς πάχους 5 mm (**Εικόνα 5.2**). Στην δεξαμενή τοποθετούνταν 6 L νερού συστήματος, τα οποία ανανεώνονταν κάθε 3 δοκιμασίες. Με την εισαγωγή του στην συγκεκριμένη κατασκευή, το κάθε ψάρι αφέθηκε να κινηθεί ελεύθερα για 30 λεπτά, κατά τη διάρκεια των οποίων η συμπεριφορά του βιντεοσκοπήθηκε μέσω μίας κάμερας τοποθετημένης πάνω από την δεξαμενή.

Οι καταγραφές από τις δοκιμασίες ανοιχτού πεδίου αναλύθηκαν με τη χρήση του Ethovision XT14. Η δεξαμενή χωρίστηκε σε 2 τμήματα τα οποία ορίστηκαν ως κεντρική ζώνη και περιφέρεια. Οι παράμετροι που επιλέχθηκαν ήταν η μέση ταχύτητα (mean velocity, cm s^{-1}), η συνολική απόσταση που διένυσε το άτομο κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας (total distance moved, cm), η λανθάνουσα περίοδος κατά την εισαγωγή του ατόμου στην κατασκευή μέχρι και την πρώτη είσοδό του στην κεντρική ζώνη (latency to first, s), χρόνος παραμονής στην κεντρική ζώνη (duration in center (s), frequency to center). Οι συνολικοί χρόνοι παραμονής στη ζώνη ενδιαφέροντος μετατράπηκαν στη συνέχεια σε ποσοστό (%) επί της συνολικής διάρκειας της δοκιμασίας.

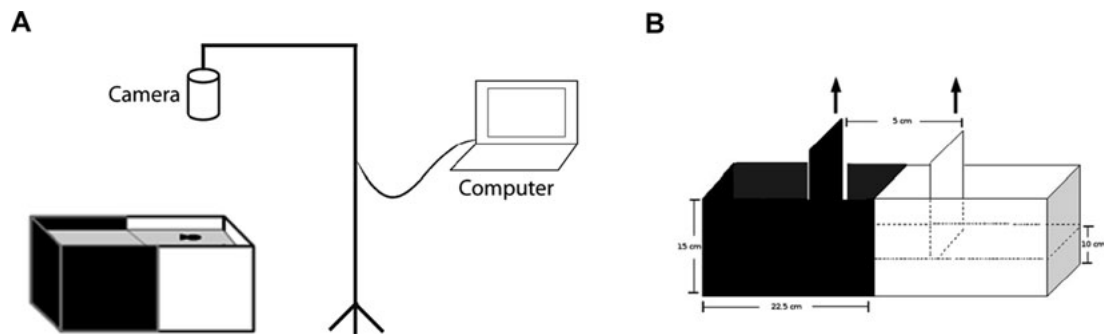


Εικόνα 5.2 | Η δεξαμενή ανοιχτού πεδίου για τα ενήλικα zebrafish.

Δοκιμασία προτίμησης φωτός/σκότους

Η δοκιμασία προτίμησης φωτός/σκότους αποτελεί ένα ακόμα πρωτόκολλο βασισμένο στην εξερευνητική τάση των zebrafish, με την διαφορά πως σε αυτό τα άτομα εκτίθενται σε σαφείς συνθήκες επιλογής. Ο σχεδιασμός του έχει βασιστεί σε πρωτόκολλα για τα τρωκτικά, όπου η κινητική δραστηριότητα και στους δύο διακριτούς χώρους αποτελεί ένδειξη στρες (Hascoët *et al.*, 2001). Βάση ανάπτυξης του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου αποτέλεσε η φυσική αποστροφή των τρωκτικών για τα φωτεινά περιβάλλοντα και η παρατήρηση της επιλογής τους να ακολουθήσουν την εξερευνητική τους τάση ή όχι. Αντίστοιχα έχει προταθεί πως και τα zebrafish παρουσιάζουν μία φυσική προτίμηση στα σκοτεινά περιβάλλοντα (Serra *et al.*, 1999), αν και υπάρχουν πλέον ενδείξεις και για το αντίθετο (Champagne *et al.*, 2010).

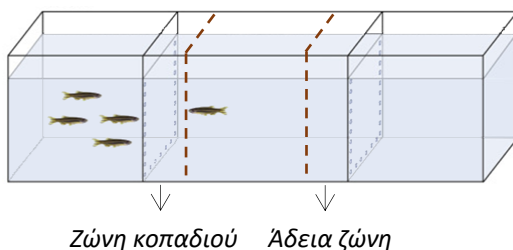
Για τον σκοπό του συγκεκριμένου πειράματος κατασκευάστηκε μία δεξαμενή σύμφωνα με την περιγραφή των Maximino *et al.* (2010), μήκους 45 x 15 x 10 cm (**Εικόνα 5.3**). Η δεξαμενή αποτελείται από λευκό πλεξιγκλάς με την μισή να είναι καλυμμένη από μαύρο αυτοκόλλητο, χωρίζοντας την ουσιαστικά σε δύο τμήματα, ένα φωτεινό (λευκό) και ένα σκοτεινό (μαύρο). Ο φωτισμός του πειραματικού δωματίου αποτελεί έναν κρίσιμο παράγοντα σχεδιασμού του πειράματος, καθώς η ένταση του φωτισμού φαίνεται πως καθορίζει σημαντικά την συμπεριφορά των ψαριών και την προτίμησή τους προς το σκοτεινό ή φωτεινό τμήμα της δεξαμενής. Ο φωτισμός του χώρου είχε περιοριστεί στα 500 lux, καθώς zebrafish τα οποία δοκιμάζονται στη συγκεκριμένη δοκιμασία υπό συνθήκες χαμηλού φωτισμού (250 lux) τείνουν να περνούν περισσότερο χρόνο στο λευκό τμήμα της δεξαμενής σε σύγκριση με εκείνα που δοκιμάζονται σε εντονότερη φωτεινότητα (500 lux) (Stewart *et al.*, 2011). Το κάθε ψάρι τοποθετήθηκε στο κέντρο της δεξαμενής και έπειτα από τρία λεπτά αφαιρέθηκε η δομή που το περιόριζε στο κέντρο της δεξαμενής και το ψάρι αφέθηκε για 30 λεπτά να κινηθεί ελεύθερο. Η κάμερα ήταν τοποθετημένη πάνω από την δεξαμενή και η συμπεριφορά βιντεοσκοπήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Η ανάλυση της καταγεγραμμένης συμπεριφοράς με το Ethovision XT 14 μας επέτρεψε να ποσοτικοποιήσουμε την προτίμηση του ζώου καθώς και την έκφραση αγχώδους συμπεριφοράς. Οι παράμετροι οι οποίοι υπολογίστηκαν για την συγκεκριμένη δοκιμασία ήταν ο συνολικός χρόνος που το άτομο παρέμεινε στο λευκό τμήμα της δεξαμενής (total time in white compartment, s) και η συχνότητα στο μαύρο τμήμα της δεξαμενής (entries in black zone).



Εικόνα 5.3 | Η δεξαμενή φωτός/σκότους για τα ενήλικα zebrafish. Α. Αποτύπωση της διάταξης του πειραματικού εξοπλισμού. Η κάμερα είναι συνδεδεμένη με τον υπολογιστή ώστε τα καταγεγραμμένα βίντεο να αναλυθούν με το κατάλληλο λογισμικό και τοποθετείται πάνω από το λευκό τμήμα της δεξαμενής καθώς η κίνηση των zebrafish στο σκοτεινό τμήμα δεν μπορεί να αναλυθεί. Β. Σχεδιασμός της πειραματικής κατασκευής (εικόνα από Stewart *et al.* (2011)).

Δοκιμασία κοινωνικής προτίμησης ενηλίκων zebrafish

Η δοκιμασία κοινωνικής προτίμησης αναπτύχθηκε έχοντας ως στόχο την εκτίμηση της κοινωνικότητας των zebrafish (Wright and Krause, 2006a). Αποτελεί ένα πρωτόκολλο στο οποίο παρατηρείται και αναλύεται η προτίμηση των ενηλίκων zebrafish έναντι δύο επιλογών, με την μία επιλογή να είναι ένα κοπάδι από zebrafish ίδιας ηλικίας και γενετικής γραμμής, όπως αποτυπώνεται στην **Εικόνα 5.4**.



Εικόνα 5.4 | Δεξαμενή κατάλληλη για εκτίμηση της κοινωνικής προτίμησης, με το προς δοκιμή ψάρι να εισάγεται στο κεντρικό της τμήμα. Μελετάται η επιλογή του να κινηθεί προς την πλευρά με το κοπάδι ή προς την άδεια πλευρά (εικόνα από Angiulli *et al.*, 2020).

Η δεξαμενή έχει διαστάσεις 50 x 20 x 20 cm, με δύο διάτρητα διαχωριστικά, τα οποία δημιουργούν τρία τμήματα. Το κεντρικό τμήμα έχει διαστάσεις 30 x 20 x 20 cm. Το σύνολο της δεξαμενής αποτελείται από λευκό πλεξιγκλάς, με τα διαχωριστικά των 3 τμημάτων να είναι διαφανή. Στην δεξαμενή τοποθετείται νερό συστήματος όγκου 8 L. Μία ώρα πριν την έναρξη της δοκιμασίας, τοποθετείται μία ομάδα 4 ψαριών της ίδιας ηλικίας και γενετικής γραμμής και αφήνονται ανενόχλητα προκειμένου να εξοικειωθούν με την κατασκευή και να εμφανίσουν συμπεριφορά κοπαδιού. Με το πέρας της μίας ώρας, τοποθετείται στο κεντρικό (εσωτερικό) τμήμα της δεξαμενής το ψάρι προς δοκιμασία (ίδιας γενετικής γραμμής με το κοπάδι) και αφήνεται να κινηθεί ελεύθερα

στον χώρο για 30 λεπτά, όπου και βιντεοσκοπείται η συμπεριφορά του, με την κάμερα τοποθετημένη πάνω από την δεξαμενή. Το κοπάδι όπως και το νερό της δεξαμενής αλλάζει κάθε τρεις δοκιμασίες.

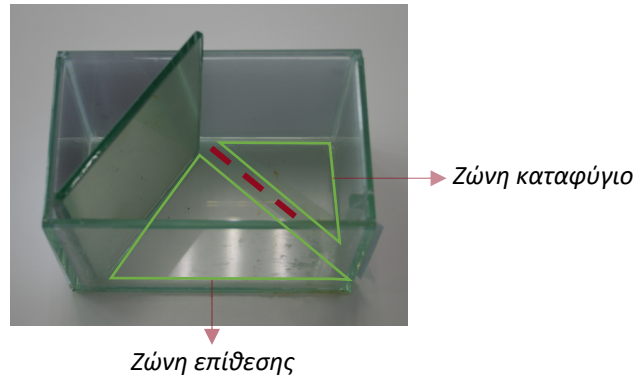
Η καταγεγραμμένη συμπεριφορά αναλύθηκε με το ειδικό λογισμικό Ethovision XT14. Το κεντρικό τμήμα της δεξαμενής στο οποίο βρίσκεται το ψάρι προς μελέτη, χωρίζεται σε 3 άνισα τμήματα (όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.2), ένα κεντρικό τμήμα και 2 ζώνες που εφάπτονται των διαχωριστικών της δεξαμενής. Προκύπτουν 2 ζώνες μελέτης, η «ζώνη κοπαδιού» και η «άδεια ζώνη». Οι παράμετροι που ποσοτικοποιήθηκαν ήταν η μέση ταχύτητα (mean velocity, cm/s), ο χρόνος παραμονής και η συχνότητα εισόδου στην ζώνη κοπαδιού (duration in shoal zone (s), frequency to shoal zone). Οι συνολικοί χρόνοι παραμονής στις ζώνες μετατράπηκαν στη συνέχεια σε ποσοστό (%) επί της συνολικής διάρκειας της δοκιμασίας.

Δοκιμασία δυαδικής αγωνιστικής συμπεριφοράς

Το πρωτόκολλο της συγκεκριμένης δοκιμασίας έχει αναλυθεί στο κεφάλαιο 2. Στα πλαίσια της συμπεριφορικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό VideoLAN – VLC το οποίο προσφέρει τη δυνατότητα αργής ανάλυσης κίνησης. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που αναλύθηκε στο κεφάλαιο 4 για την ποσοτικοποίηση της κυρίαρχης και υποτελούς συμπεριφοράς.

Δοκιμασία καθρέπτη

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο παρατηρεί την αλληλεπίδραση ενός ενήλικου zebrafish με το είδωλό του στον καθρέπτη, το οποίο μπορεί να θεωρηθεί ένας αντίπαλος οπότε και εκφράζεται ένα μέρος των επιθετικών συμπεριφορών του είδους (Gerlai *et al.*, 2000). Η δοκιμασία καθρέπτη αποτελεί ένα από τα πλέον προτιμώμενα πρωτόκολλα στη μελέτη της επιθετικής συμπεριφοράς στο ενήλικο zebrafish, λόγω του εύρους των πλεονεκτημάτων της όπως η απλότητα και η μηδαμινή πιθανότητα τραυματισμού του πειραματόζωου (καθώς δεν κινδυνεύει από πραγματικές επιθέσεις). Για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν γυάλινες παραλληλόγραμμες δεξαμενές των 2 L (**Εικόνα 5.5**), όπου στην μία τους πλευρά είχε τοποθετηθεί ένας καθρέπτης. Αρχικά, με τον καθρέπτη γυρισμένο ανάποδα, το ψάρι εισάγεται στην δεξαμενή και αφήνεται να εξοικειωθεί με τον χώρο για 5 λεπτά. Με το πέρας των 5 λεπτών, ο καθρέπτης γυρνάει έτσι ώστε το ψάρι να μπορεί να δει το είδωλό του και η συμπεριφορά του ζώου καταγράφεται για 5 λεπτά. Ο καθρέπτης τοποθετείται με μία κλίση, ώστε να δημιουργείται μία περιοχή της δεξαμενής χωρίς να υπάρχει κάποιο είδωλο στον καθρέπτη. Με αυτόν τον σχεδιασμό, το ψάρι έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδράσει με το είδωλό του κατ' επιλογή.



Εικόνα 5.5 | Η δεξαμενή για τη δοκιμασία του καθρέπτη.

Η καταγεγραμμένη συμπεριφορά αναλύθηκε με το ειδικό λογισμικό Ethovision XT14. Ορίστηκαν δύο ζώνες ανάλογα με την θέση τους στον καθρέπτη, οι οποίες ονομάστηκαν «ζώνη επίθεσης» και «ζώνη καταφύγιο» (**Εικόνα 5.5**). Οι παράμετροι που ποσοτικοποιήθηκαν ήταν η μέση ταχύτητα (mean velocity, cm/s), η συνολική απόσταση που διένυσε το άτομο κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας (total distance moved, cm), ο χρόνος παραμονής στην ζώνη καταφύγιο (duration in hide zone (s)) και η συνολική διάρκεια ακινησίας των ατόμων κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας (freezing, s). Οι συνολικοί χρόνοι παραμονής στις ζώνες ή χρόνοι ακινησίας των ατόμων μετατράπηκαν στη συνέχεια σε ποσοστό (%) επί της συνολικής διάρκειας της δοκιμασίας.

Χρόνια καταπόνηση

Η επίδραση της χρόνιας καταπόνησης εκτιμήθηκε με τη χρήση ενός πρωτοκόλλου, ο σχεδιασμός του οποίου βασίστηκε σε σχετικές δημοσιευμένες μελέτες στο zebrafish (Pavlidis *et al.*, 2015). Η διάρκειά του ήταν 15 ημέρες και χρησιμοποιήθηκαν 7 δυνάμει στρεσογόνα ερεθίσματα (Πίνακας 5.1).

Πίνακας 5.1 | Τα ερεθίσματα που χρησιμοποιήθηκαν στο πρωτόκολλο χρόνιας καταπόνησης.

Κυνηγητό με απόχη για 5 λεπτά (Fanouraki <i>et al.</i> , 2011)
Περιορισμός μέσα σε απόχη για 5 λεπτά (Ramsay <i>et al.</i> , 2009)
Έκθεση στον αέρα για 30s σε συνδυασμό με αλλαγή δεξαμενής 3 φορές (Fanouraki <i>et al.</i> , 2011)
Μείωση ωφέλιμου όγκου κατά 2/3 για 30 λεπτά (Ramsay <i>et al.</i> , 2006; Pavlidis <i>et al.</i> , 2015)
Απομόνωση σε δοχεία όγκου 80 ml για 1 ώρα (Parker <i>et al.</i> , 2012)
Κλείσιμο φωτός κατά τη διάρκεια της ημέρας (3 φορές για 15 λεπτά) (Pavlidis <i>et al.</i> , 2015)
Άνοιγμα φωτός κατά τη διάρκεια της νύχτας (3 φορές για 15 λεπτά) (Pavlidis <i>et al.</i> , 2015)

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και σχηματίστηκαν δύο πειραματικές ομάδες για κάθε γενετική γραμμή, οι ομάδες ελέγχου (WT CON, *gr*^{-/-} CON, *mr*^{-/-} CON) και εκείνες της χρόνιας καταπόνησης (WT CHR, *gr*^{-/-} CHR, *mr*^{-/-} CHR). Επομένως, χρησιμοποιήθηκαν 12 όμοιες δεξαμενές με ωφέλιμο όγκο νερού 3.5 L και τοποθετήθηκαν 6 ψάρια σε κάθε μία. Η αναλογία των θηλυκών ως προς τα αρσενικά άτομα ήταν 1:2. Μετά από μία εβδομάδα εξοικείωσης, οι οργανισμοί υποβάλλονταν δύο φορές την ημέρα σε ένα από τα στρεσογόνα ερεθίσματα του Πίνακα 3.1. Η θερμοκρασία και ο καθαρισμός του νερού γινόταν καθημερινά με την χρήση κατάλληλων εξαρτημάτων, ενώ σε καθημερινή βάση επιτελούνταν προσδιορισμός του οξυγόνου, αμμωνίας και pH. Ο χρόνος και η αλληλουχία εφαρμογής των ερεθισμάτων άλλαζε καθημερινά με σκοπό την αποφυγή της εξοικείωσης και τη διατήρηση του απρόβλεπτου της στρεσογόνου κατάστασης. Οι ομάδες ελέγχου διατηρήθηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες νερού και συνωστισμού για 15 μέρες που διήρκεσε το πείραμα, χωρίς να τους εφαρμοστεί κάποιο στρεσογόνο ερέθισμα.

Μία μέρα μετά το πέρας των 15 ημερών εφαρμογής του χρόνιου στρες, τα ψάρια από κάθε δεξαμενή θανατώθηκαν σε δοχεία με πάγο και νερό. Ακολούθησε η δειγματοληψία, όπου τα σώματα (χωρίς το κεφάλι και το ουραίο πτερύγιο) τοποθετήθηκαν σε πλαστικά erpendorfs στους -20°C προκειμένου να προσδιοριστεί η κορτιζόλη. Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, με εξαίρεση την ημέρα της δειγματοληψίας, τα ψάρια σιτίζονταν καθημερινά 2 φορές την ημέρα το 3.5% της συνολικής βιομάζας της κάθε δεξαμενής.

5.2.5. Προσδιορισμός Κορτιζόλης

Η διαδικασία προσδιορισμού της κορτιζόλης έχει αναλυθεί στο κεφάλαιο 3 (σελ. 59).

5.2.6. Στατιστική ανάλυση

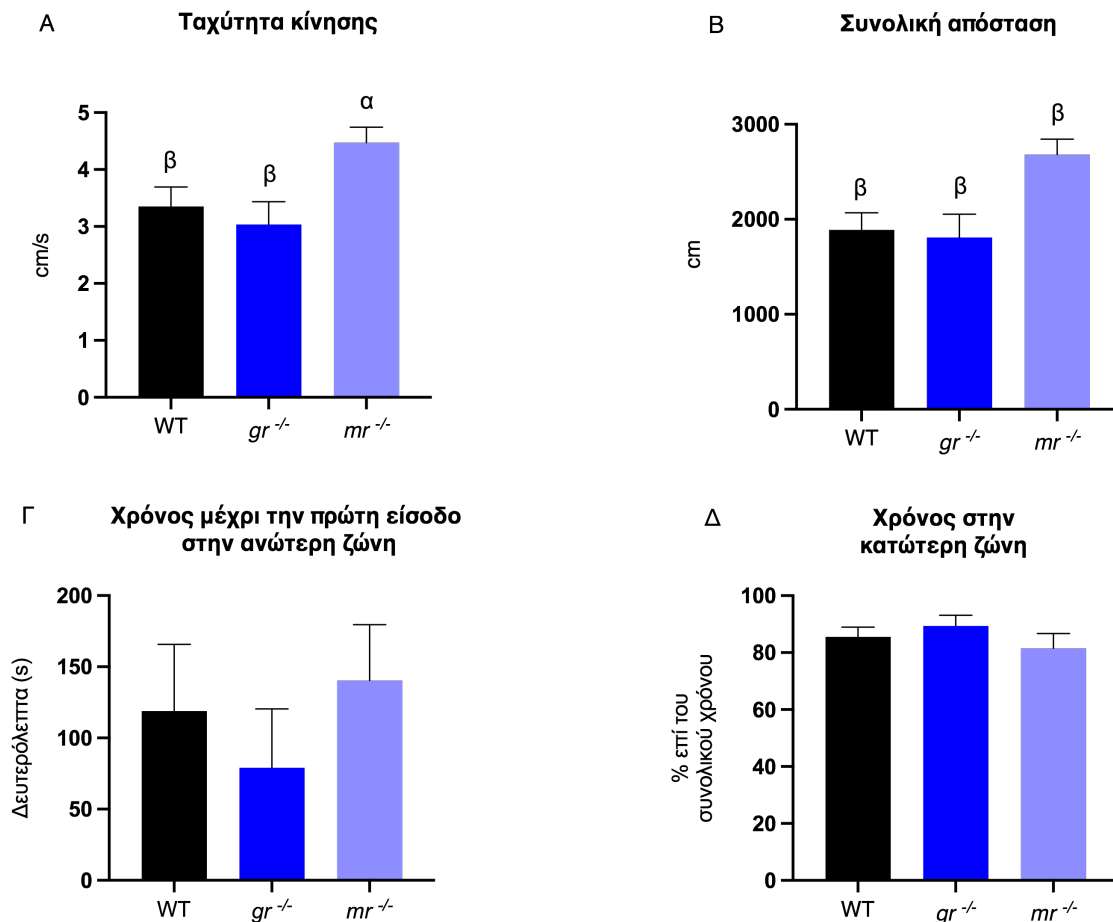
Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SigmaStat v3.1 (Jandel Scientific). Όλα τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα του μέσου (S.E.M.). Αρχικά τα δεδομένα ελέγχθηκαν ως προς την κανονικότητα της κατανομής τους (normality) και την ισότητα των διασπορών τους (homogeneity), και στην περίπτωση που κρίθηκε αναγκαίο τροποποιήθηκαν λογαριθμικά. Σε περίπτωση πλήρωσης των δύο αυτών προϋποθέσεων, χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικά τεστ, ενώ σε περίπτωση μη πλήρωσης της κανονικότητας και ισότητας διασπορών οι αναλύσεις έγιναν με μη παραμετρικά τεστ. Πιο συγκεκριμένα, τα συμπεριφορικά δεδομένα αναλύθηκαν με ανάλυση διασποράς για έναν παράγοντα (one – way ANOVA), με εξαίρεση τα δεδομένα από τη δοκιμασία καθρέπτη τα οποία αναλύθηκαν με ανάλυση διασποράς για δύο παράγοντες (two - way analysis of variance ANOVA). Η ανάλυση των ποσοστών των ζευγαριών *gr*^{-/-}, *mr*^{-/-} και WT που εμφάνισαν ιεραρχικές σχέσεις εντός 2 ωρών έγινε με έλεγχο

χ^2 (chi – square test). Two – way ANOVA χρησιμοποιήθηκε και για τα δεδομένα από τη συγκέντρωση της κορτιζόλης. Στις περιπτώσεις των στατιστικά σημαντικών διαφορών ($P < 0.05$), η αναγνώριση των στατιστικά σημαντικών ομάδων έγινε με τους ελέγχους πολλαπλών συγκρίσεων Holm-Sidak's και Tukey's. Τα γραφήματα δημιουργήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Graph Pad Prism 6.03 (GraphPad Software, Inc, USA).

5.3. Αποτελέσματα

5.3.1. Δοκιμασία νεοφανούς δεξαμενής

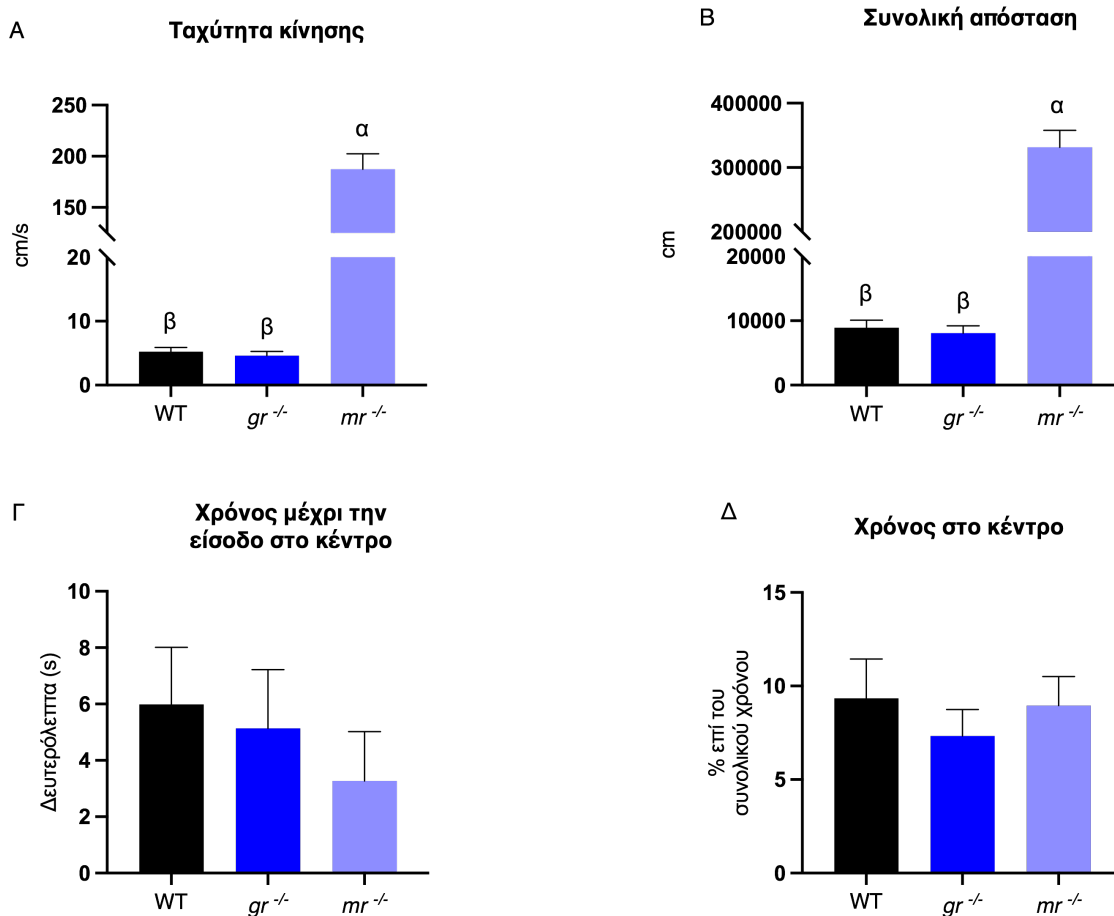
Τα άτομα $mr^{-/-}$ (4.5 ± 0.3 , $n = 17$) είχαν μεγαλύτερη ταχύτητα κίνησης σε σύγκριση με τα άτομα αγρίου τύπου (3.4 ± 0.3 , $n = 15$) και $gr^{-/-}$ (3.03 ± 0.4 , $n = 15$) ($F_{2,44} = 5.224$, $P = 0.009$; **Εικόνα 5.6 Α**). Επιπλέον, τα άτομα $mr^{-/-}$ (2681 ± 163.1 , $n = 17$) διάνυσαν τη μεγαλύτερη απόσταση σε σύγκριση με τα άτομα αγρίου τύπου (1889 ± 180 , $n = 15$) και $gr^{-/-}$ (1810 ± 244 , $n = 15$) ($H_{2,44} = 10.506$, $P = 0.005$; **Εικόνα 5.6 Β**). Δεν εντοπίστηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στον χρόνο μέχρι την πρώτη είσοδο στην ανώτερη ζώνη ($F_{2,44} = 0.67$, $P = 0.52$; **Εικόνα 5.6 Γ**) ούτε στο ποσοστό του χρόνου που πέρασαν στο κατώτερο τμήμα της δεξαμενής ($F_{2,48} = 1.05$, $P = 0.36$; **Εικόνα 5.6 Δ**).



Εικόνα 5.6 | Δοκιμασία νεοφανούς δεξαμενής στα άτομα των τριών γενετικών γραμμών (WT, *gr*^{-/-}, *mr*^{-/-}). (A) Ταχύτητα κίνησης (cm/s), (B) συνολική απόσταση (cm) που διάνυσαν τα άτομα των τριών γενετικών γραμμών, (Γ) χρόνος μέχρι την πρώτη είσοδο στο ανώτερο τμήμα της δεξαμενής και (Δ) ποσοστό χρόνου που πέρασαν στο κατώτερο τμήμα της δεξαμενής. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των γενετικών γραμμών. Η κάθε ράβδος αποτυπώνει τον μέσο όρο \pm S.E.M ($n = 15 - 17$ ανά ομάδα).

5.3.2. Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου

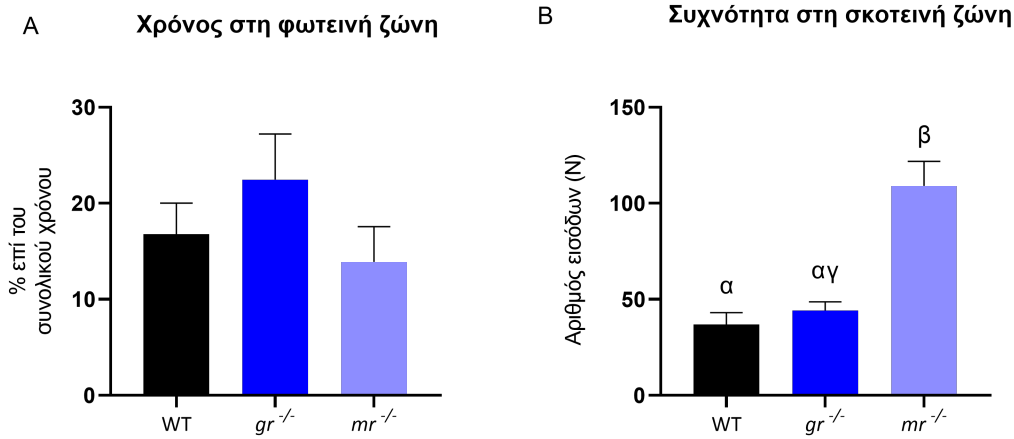
Τα αποτελέσματα από τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου στα άτομα των τριών γενετικών γραμμών zebrafish αποτυπώνονται στην **Εικόνα 5.7**. Τα άτομα *mr*^{-/-} (187.5 ± 14.9 , $n = 15$) είχαν μεγαλύτερη ταχύτητα κίνησης σε σύγκριση με τα άτομα αγρίου τύπου (5.2 ± 0.7 , $n = 11$) και *gr*^{-/-} (4.6 ± 0.7 , $n = 10$) ($H_{2,33} = 25.831$, $P < 0.001$; **Εικόνα 5.7 A**). Επιπλέον, τα άτομα *mr*^{-/-} (331527 ± 26195 , $n = 15$) διάνυσαν τη μεγαλύτερη απόσταση σε σύγκριση με τα άτομα αγρίου τύπου (8933 ± 1167 , $n = 11$) και *gr*^{-/-} (8084 ± 1116 , $n = 10$) ($F_{2,33} = 299.98$, $P < 0.001$; **Εικόνα 5.7 B**). Δεν εντοπίστηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στον χρόνο μέχρι την πρώτη είσοδο στο κεντρικό τμήμα ($F_{2,33} = 0.24$, $P = 0.79$; **Εικόνα 5.7 Γ**) ούτε στο ποσοστό του χρόνου που πέρασαν στο κεντρικό τμήμα της δεξαμενής ($F_{2,33} = 0.43$, $P = 0.65$; **Εικόνα 5.7 Δ**).



Εικόνα 5.7 | Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου στα άτομα των τριών γενετικών γραμμών (WT, *gr*^{-/-}, *mr*^{-/-}). (A) Ταχύτητα κίνησης (cm/s), (B) συνολική απόσταση (cm) που διάνυσαν τα άτομα των τριών γενετικών γραμμών, (Γ) χρόνος μέχρι την πρώτη είσοδο στο κεντρικό τμήμα της δεξαμενής και (Δ) ποσοστό χρόνου που πέρασαν στο κεντρικό τμήμα της δεξαμενής. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των γενετικών γραμμών. Η κάθε ράβδος αποτυπώνει τον μέσο όρο ± S.E.M (*n* = 15 ανά ομάδα).

5.3.3. Δοκιμασία προτίμησης φωτός/σκότους

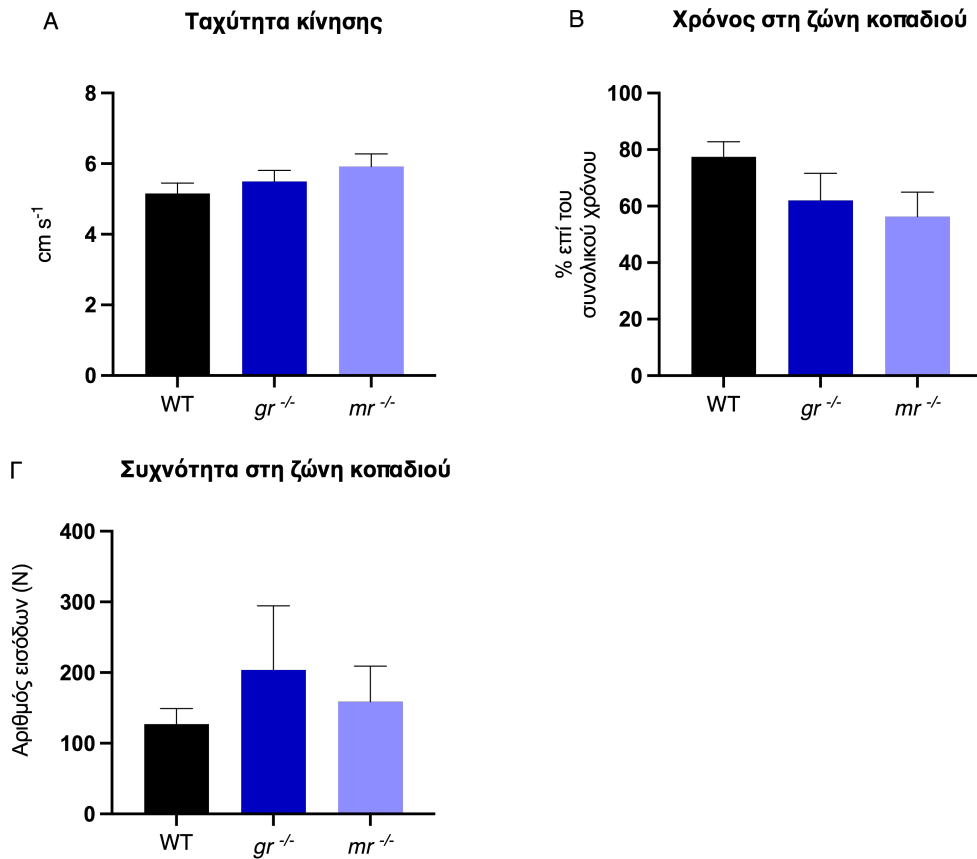
Στη δοκιμασία προτίμησης φωτός/σκότους δεν εντοπίστηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στον χρόνο που τα άτομα της κάθε γενετικής γραμμής πέρασαν στο λευκό τμήμα της δεξαμενής ($F_{2,34} = 1.409$, $P = 0.258$; **Εικόνα 5.8 A**). Η ανάλυση με one – way ANOVA υπέδειξε ένα σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό εισόδων των ατόμων *mr*^{-/-} (109 ± 12.8 , $n = 15$) στο σκοτεινό τμήμα της δεξαμενής ($F_{2,34} = 15.792$, $P < 0.001$; **Εικόνα 5.8 B**).



Εικόνα 5.8 | Δοκιμασία προτίμησης φωτός/σκότους στα άτομα των τριών γενετικών γραμμών (WT, *gr*^{-/-}, *mr*^{-/-}). (A) Ποσοστό χρόνου που πέρασαν στο λευκό τμήμα της δεξαμενής και (B) αριθμός εισόδων στο σκοτεινό τμήμα της δεξαμενής. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των γενετικών γραμμών. Η κάθε ράβδος αποτυπώνει τον μέσο όρο \pm S.E.M ($n = 8 - 15$ ανά ομάδα).

5.3.4. Δοκιμασία κοινωνικής προτίμησης

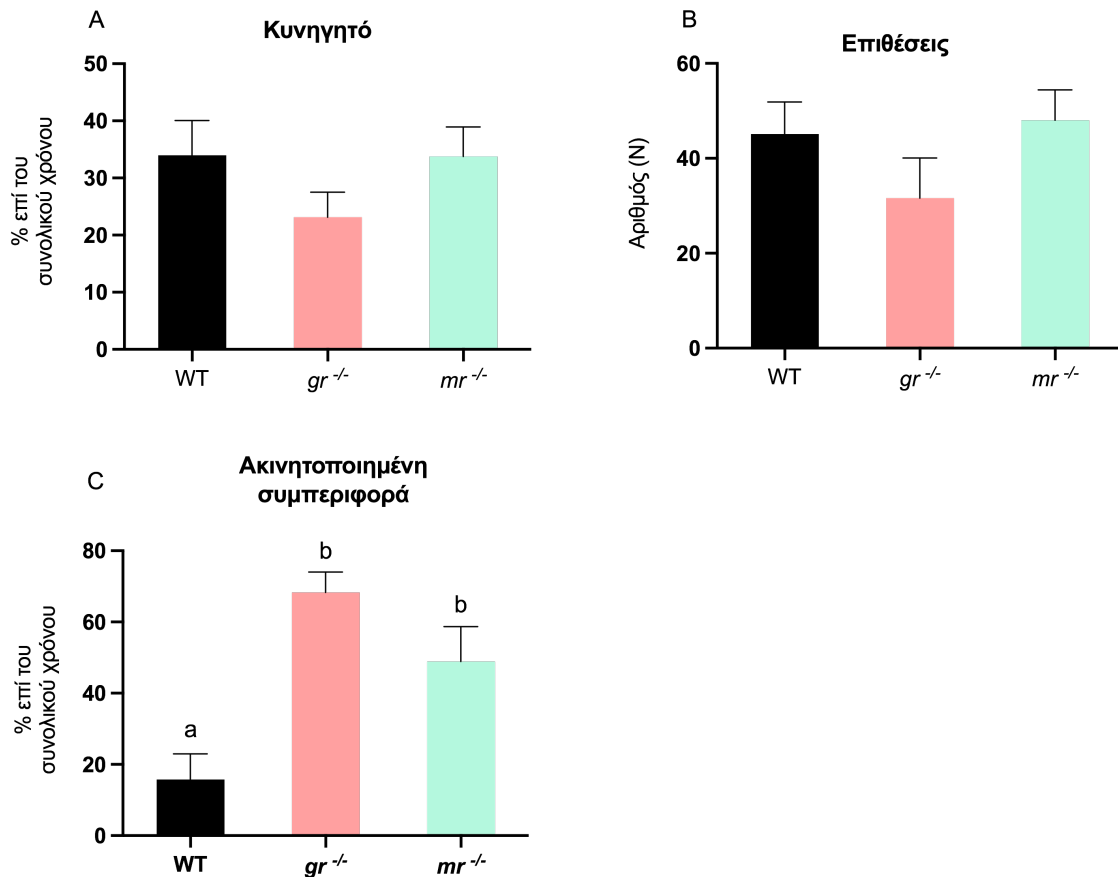
Οι συμπεριφορικές παράμετροι οι οποίες εκτιμήθηκαν στα πλαίσια της δοκιμασίας κοινωνικής προτίμησης δεν έδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών γενετικών γραμμών ενηλίκων zebrafish (ταχύτητα κίνησης: $F_{2,30} = 1.403$, $P = 0.26$; χρόνος στη ζώνη κοπαδιού: $F_{2,30} = 0.104$, $P = 0.902$; συχνότητα στη ζώνη κοπαδιού: $H_{2,30} = 0.659$, $P = 0.719$; **Εικόνα 5.9**).



Εικόνα 5.9 | Δοκιμασία κοινωνικής προτίμησης στα άτομα WT, *gr*^{-/-}, *mr*^{-/-}. (A) Ταχύτητα κίνησης (cm s⁻¹), (B) ποσοστό χρόνου επί της συνολικής δοκιμασίας που πέρασαν στη ζώνη κοπαδιού και (C) συχνότητα εισόδου στη ζώνη κοπαδιού. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one - way ANOVA. Η κάθε ράβδος αποτυπώνει τον μέσο όρο ± S.E.M (*n* = 8 - 14 ανά ομάδα).

5.3.5. Δοκιμασία δυαδικής αγωνιστικής συμπεριφοράς

Η δοκιμασία δυαδικής αγωνιστικής συμπεριφοράς δεν έδειξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στην συμπεριφορά των κυρίαρχων ατόμων των τριών γενετικών γραμμών, ενώ τα υποτελή της ομάδας ελέγχου (15.8 ± 7.2 , *n* = 8) πέρασαν σημαντικά λιγότερο χρονικό διάστημα σε ακινησία (freezing behavior) σε σύγκριση με τα άτομα *gr*^{-/-} (68.3 ± 5.7 , *n* = 5) και *mr*^{-/-} (48.9 ± 9.8 , *n* = 3) ($F_{2,13} = 13.98$, $P < 0.001$; **Εικόνα 5.10**).



Εικόνα 5.10 | Δοκιμασία δυαδικής αγωνιστικής συμπεριφοράς στα άτομα WT, *gr*^{-/-}, *mr*^{-/-}. Ποσοτικοποίηση της κυρίαρχης και υποτελούς συμπεριφοράς. (A) Κυνηγητό (chasing) αναφέρεται στη χρονική διάρκεια αναλογικά με το σύνολο της δοκιμασίας όπου το κάθε κυρίαρχο ψάρι κυνηγούσε τον συγκάτοικό του, ενώ (B) οι επιθέσεις (attacks) αναφέρονται στον αριθμό των επιθέσεων κατά τη διάρκεια της κάθε δοκιμασίας (5 λεπτά). (C) Η ακινητοποίηση (Freezing) αποτελεί την ποσοτικοποίηση της διάρκειας του χρόνου αναλογικά με το σύνολο της δοκιμασίας όπου το υποτελές ψάρι πέρασε ακινητοποιημένο. Στο διάγραμμα απεικονίζονται ο μέσος όρος του χρόνου (%) ή ο αριθμός των γεγονότων (N) ± τυπικό σφάλμα (S.E.M.) (n=3 - 8). Τα γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$) μεταξύ των τριών γενετικών γραμμών.

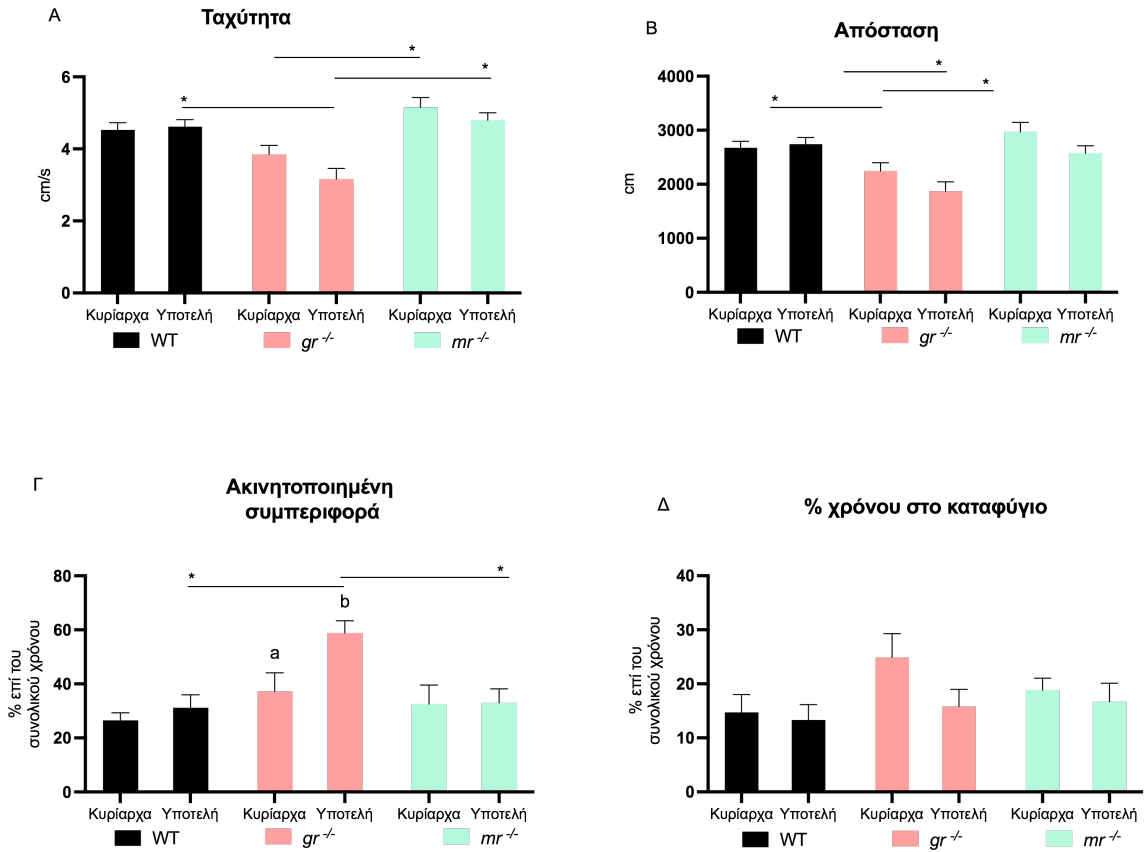
Το πρωτόκολλο της δυαδικής δοκιμασίας περιελάμβανε έναν χρόνο αναμονής μέχρι την εμφάνιση της αγωνιστικής συμπεριφοράς στα ζευγάρια από 2 έως 24 ώρες. Με το πέρας των 2 ωρών γινόταν η πρώτη παρατήρηση των ζευγαριών προκειμένου να διερευνηθεί εάν έχει σχηματιστεί μία σχέση ιεραρχίας. Στην περίπτωση όπου οι ιεραρχίες δεν είχαν δημιουργηθεί, τα ζευγάρια αφήνονταν για 24 επιπλέον ώρες, όπου τότε γινόταν η δεύτερη παρατήρηση. Το 80% των ατόμων *mr*^{-/-} σχημάτισαν μία σχέση ιεραρχίας εντός 2 ωρών, σε αντίθεση με το 44.4% των *gr*^{-/-} και το 60% των ατόμων αγρίου τύπου (Πίνακας 5.2).

Πίνακας 5.2 | Ποσοστό ζευγαριών $gr^{-/-}$, $mr^{-/-}$ και WT που εμφάνισαν ιεραρχικές σχέσεις εντός 2 ωρών.

$gr^{-/-}$	$mr^{-/-}$	WT
44.4 %	80%	60%

5.3.6. Δοκιμασία καθρέφτη

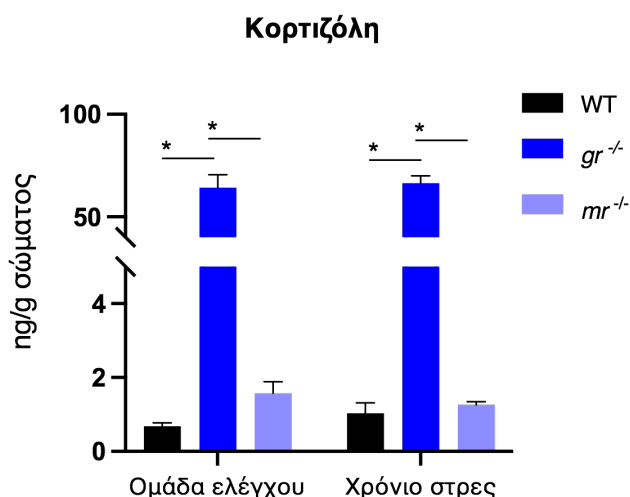
Τα κυρίαρχα $gr^{-/-}$ άτομα (3.8 ± 0.3 , $n = 12$) εμφάνισαν χαμηλότερη ταχύτητα κίνησης στη δοκιμασία καθρέφτη σε σύγκριση με τα κυρίαρχα $mr^{-/-}$ (5.2 ± 0.3 , $n = 12$) ($F_{2,68} = 19.760$, $P < 0.001$; **Εικόνα 5.11 Α**). Τα υποτελή $gr^{-/-}$ (3.2 ± 0.3 , $n = 12$) είχαν επίσης χαμηλότερη ταχύτητα κίνησης σε σύγκριση με τα άτομα αγρίου τύπου (4.6 ± 0.2 , $n = 13$) και τα $mr^{-/-}$ (4.8 ± 0.2 , $n = 12$). Σε ό,τι αφορά την απόσταση που διανύθηκε από τα υποτελή $gr^{-/-}$ (1871 ± 172.2 , $n = 12$) παρατηρήθηκε το ίδιο μοτίβο, με σημαντικά χαμηλότερη τιμή σε σχέση με τα υποτελή αγρίου τύπου (2741 ± 124 , $n = 13$) και τα $mr^{-/-}$ (2576 ± 135.6 , $n = 12$) ($F_{2,68} = 14.188$, $P < 0.001$; **Εικόνα 5.11 Β**). Ομοίως, τα κυρίαρχα $gr^{-/-}$ (2246 ± 151.2 , $n = 12$) διάνυσαν τη χαμηλότερη απόσταση σε σχέση με τα κυρίαρχα $mr^{-/-}$ (2969 ± 175.1 , $n = 12$). Επιπλέον, σε ό,τι αφορά την ακινητοποιημένη συμπεριφορά (freezing) εντός της δοκιμασίας καθρέφτη, τα υποτελή $gr^{-/-}$ (58.9 ± 4.5 , $n = 12$) είχαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό σε σύγκριση με τα zebrafish αγρίου τύπου (31.2 ± 4.8 , $n = 13$) και τα $mr^{-/-}$ (33 ± 5.1 , $n = 12$) ($F_{2,68} = 14.188$, $P = 0.001$; **Εικόνα 5.11 Γ**). Εντοπίστηκε και στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των κυρίαρχων (37.2 ± 6.9 , $n = 12$) και των υποτελών $gr^{-/-}$ ($P = 0.006$) σε ό,τι αφορά τη συμπεριφορά ακινητοποίησης τους στη δοκιμασία καθρέφτη, κάτι το οποίο δεν ίσχυε για τις δύο άλλες γενετικές γραμμές. Τέλος δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τον χρόνο που πέρασαν τα άτομα εντός της ζώνης «καταφύγιο» της συγκεκριμένης δεξαμενής (**Εικόνα 5.11 Δ**).



Εικόνα 5.11 | Δοκιμασία καθρέπτη στα άτομα των τριών γενετικών γραμμών με δύο ηθολογικά πρότυπα (WT, *gr*^{-/-}, *mr*^{-/-}, DOM & SUB). Στο διάγραμμα απεικονίζονται (Α) η ταχύτητα, (Β) απόσταση, (C) ποσοστό χρόνου αναλογικά με το σύνολο της δοκιμασίας που το ψάρι πέρασε ακίνητοποιημένο και (D) το ποσοστό χρόνου αναλογικά με το σύνολο της δοκιμασίας που το ψάρι πέρασε στη ζώνη «καταφύγιο» της δεξαμενής. Η κάθε μπάρα υποδηλώνει τον μέσο όρο ± τυπικό σφάλμα (S.E.M.) (n=10). Τα γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$) μεταξύ των ηθολογικών προτύπων, ενώ οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τις διαφορές μεταξύ των γενετικών γραμμών.

5.3.7. Κορτιζόλη χρόνιας καταπόνησης

Η έκθεση στο πρωτόκολλο χρόνιας καταπόνησης δεν είχε κάποια στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα κορτιζόλης των τριών γενετικών γραμμών (**Εικόνα 5.12**). Ωστόσο, τα άτομα *gr*^{-/-} (ομάδα ελέγχου: 64.2 ± 6.4 , n = 10; χρόνιο στρες: 66.4 ± 3.6 , n = 10) είχαν σημαντικά μεγαλύτερη συγκέντρωση κορτιζόλης σώματος σε σύγκριση με τα άτομα αγρίου τύπου (ομάδα ελέγχου: 0.7 ± 0.1 , n = 10; χρόνιο στρες: 1.03 ± 0.3 , n = 10) και άτομα *mr*^{-/-} (ομάδα ελέγχου: 1.6 ± 0.3 , n = 10; χρόνιο στρες: 1.3 ± 0.1 , n = 10), τόσο στην ομάδα ελέγχου όσο και στην ομάδα της χρόνιας καταπόνησης ($F_{2,54} = 302.413$, $P < 0.001$; **Εικόνα 5.12**).



Εικόνα 5.12 | Συγκέντρωση κορτιζόλης (F) σώματος (μέσος όρος \pm S.E.M., $n = 10$ ανά ομάδα) στα άτομα των τριών γενετικών γραμμών (WT, *gr*^{-/-}, *mr*^{-/-}) με έκθεση σε συνθήκες χρόνιου στρες ή όχι. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των γενετικών γραμμών.

5.4. Συζήτηση

Στη δοκιμασία νεοφανούς δεξαμενής τα άτομα *mr*^{-/-} είχαν στατιστικά σημαντική υψηλότερη κινητικότητα σε σύγκριση με τα άτομα αγρίου τύπου αλλά και τα *gr*^{-/-}. Δεν εντοπίστηκε κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών γενετικών γραμμών ως προς τον χρόνο που πέρασαν στο κατώτερο τμήμα της δεξαμενής ούτε και τον χρόνο που χρειάστηκαν ώστε να εισέλθουν για πρώτη φορά στο ανώτερο τμήμα της δεξαμενής. Όμοια ήταν η παρατήρηση και για τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου, όπου και εδώ τα άτομα *mr*^{-/-} είχαν στατιστικά σημαντική υψηλότερη κινητικότητα σε σύγκριση με τα άτομα αγρίου τύπου αλλά και τα *gr*^{-/-}.

Η δοκιμασία νεοφανούς δεξαμενής έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την εκτίμηση της δράσης φαρμακολογικών χειρισμών, καθώς και για την ηθολογική φαινοτύπηση γενετικών γραμμών με σίγαση σε γονίδια ενδιαφέροντος. Αποτελεί ένα πολύτιμο πρωτόκολλο που προσφέρει ταχεία διάκριση μεταξύ αγχολυτικών και αγχογενών συνθηκών και ουσιών. Αυξημένο στρες συσχετίζεται με την αύξηση του χρόνου μέχρι την πρώτη είσοδο στο ανώτερο τμήμα της δεξαμενής καθώς και την αύξηση του χρόνου του οποίου το ψάρι περνάει στον πυθμένα της δεξαμενής. Αντίθετα, αυξημένη συχνότητα εισόδου στο ανώτερο τμήμα ωθεί στην υπόθεση πως το ψάρι έχει μειωμένο άγχος. Οξεία χορήγηση καφεΐνης φάνηκε να εντείνει τη γεωτακτική συμπεριφορά των zebrafish, χωρίς όμως να έχει κάποια επίδραση στον χρόνο μέχρι την πρώτη είσοδο στο ανώτερο τμήμα της δεξαμενής (Cachat *et al.*, 2010). Αντιθέτως, οξεία χορήγηση αιθανόλης προκάλεσε αύξηση της συχνότητας στο ανώτερο τμήμα, επιβεβαιώνοντας την αγχολυτική της δράση (Egan *et al.*, 2009). Η ίδια παρατήρηση έγινε και μετά από μακροχρόνια χορήγηση φλουοξετίνης. Αυξημένη ταχύτητα κίνησης υποδηλώνει υπερδραστηριότητα ή αύξηση της εξερευνητικότητας, και έχει παρατηρηθεί ύστερα από χορήγηση

οξείας MK - 801 και ιμπογκαίνης (Neelkantan *et al.*, 2013). Διαφορετική απόκριση στη συγκεκριμένη δοκιμασία φαίνεται να έχουν και διάφορα στελέχη αγρίου τύπου zebrafish, τα οποία έδειξαν σημαντικές διαφορές σε παραμέτρους της δοκιμασίας, όπως η μέση ταχύτητα κίνησης, ο συνολικός χρόνος διαμονής στην ανώτερη ζώνη και η θιγμοτακτική συμπεριφορά (Egan *et al.*, 2009).

Οι τρεις γενετικές γραμμές που εκτέθηκαν στη συγκεκριμένη δοκιμασία δεν έδειξαν κάποια σημαντική διαφορά στη γεωτακτική συμπεριφορά τους. Η μόνη διαφορά που παρατηρήθηκε ήταν στην ταχύτητα κίνησης και στην απόσταση που διανύθηκε, με τα άτομα *mr^{-/-}* να εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα κινητικότητας από τα αγρίου τύπου και τα *gr^{-/-}*. Η αυξημένη αυτή κινητικότητα δεν μπορεί να ερμηνευθεί ως αυξημένη εξερευνητικότητα καθώς δεν αποτυπώνεται στη συχνότητα εναλλαγής ζωνών, ούτε στην άνεση εξερεύνησης της ανώτερης ζώνης. Ενδέχεται η αυξημένη ταχύτητα των *mr^{-/-}* να αποτελεί μία ένδειξη σπασμωδικών κινήσεων (erratic movements), η οποία αποτελεί ένα φαινότυπο χαρακτηριστικό της υπερδραστηριότητας λόγω στρες.

Η δοκιμασία ανοιχτού πεδίου αποτελεί ένα πρωτόκολλο ορόσημο στην εκτίμηση της αγχώδους συμπεριφοράς υπό νεοφανείς συνθήκες στα τρωκτικά και ως εκ τούτου έχει μεταφερθεί και στη συμπεριφορική έρευνα των zebrafish (Belzung, 1999). Ανήκει στην ίδια κατηγορία με τη δοκιμασία νεοφανούς δεξαμενής, καθώς επιτρέπει την εκτίμηση της εξερευνητικότητας, με τη διαφορά πως σε αυτή την περίπτωση εκτιμάται η οριζόντια εξερευνητικότητα. Αυξημένη συχνότητα εισόδου στο κέντρο της δεξαμενής υποδηλώνει χαμηλότερο άγχος, ενώ αυξημένη διάρκεια χρόνου στην περιφέρεια έναν αγχώδη συμπεριφορικό φαινότυπο. Συγκεκριμένα, ο αγχώδης φαινότυπος ισχυρής προτίμησης για τα τοιχώματα της δεξαμενής (wall – hugging) χαρακτηρίζεται ως θιγμοτακτική συμπεριφορά και έχει μελετηθεί εκτενώς τόσο στα τρωκτικά όσο και σε άλλα μοντέλα σπονδυλωτών (Simon *et al.*, 1994; Blaser *et al.*, 2010; Champagne *et al.*, 2010). Πειράματα με φαρμακολογικούς χειρισμούς σε ενήλικα zebrafish έχουν δείξει πως έκθεση σε ψυχοτρόπες ουσίες, όπως το LSD, μείωσαν τη συχνότητα εισόδου στο κέντρο της δεξαμενής, φαινότυπος ο οποίος υποδεικνύει μία αγχολυτική δράση της ουσίας στο zebrafish στα πλαίσια αυτής της ηθολογικής δοκιμασίας (Grossman *et al.*, 2010). Σε αντίθεση με το LSD, που δεν είχε κάποια επιπλέον επίδραση στη συμπεριφορά των zebrafish, η χορήγηση της αγχογενούς ουσίας FG-7142 είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της κίνησης στην περιφέρεια της δεξαμενής καθώς και της συνολικής απόστασης που τα άτομα διάνυσαν στη δεξαμενή (López Patiño *et al.*, 2008).

Τα αποτελέσματα από τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου έδωσαν ακριβώς την ίδια εικόνα με τη δοκιμασία νεοφανούς δεξαμενής, αυξημένα δηλαδή επίπεδα κινητικότητας στην ομάδα των *mr^{-/-}*. Ούτε εδώ όμως έχουμε ενδείξεις για μετάφραση της αυξημένης ενεργητικότητας σε εξερευνητικότητα, καθώς δεν παρατηρείται κάποια διαφορά στη θιγμοτακτική συμπεριφορά και στην εναλλαγή μεταξύ των ζωνών της δεξαμενής.

Αν και τα ενήλικα zebrafish, όπως και άλλα είδη τελεόστεων, δείχνουν μία ισχυρή προτίμηση για τα σκοτεινά περιβάλλοντα (Stewart *et al.*, 2011), υπάρχουν ενδείξεις και για προτίμηση τους στα φωτεινά περιβάλλοντα (Gerlai *et al.*, 2000; Champagne *et al.*, 2010). Οι αντικρουόμενες αυτές παρατηρήσεις πηγάζουν ενδεχομένως από διαφορές στις συνθήκες εκτροφής των zebrafish (Maximino *et al.*, 2010), στο φύλο, στην ηλικία, στη γενετική γραμμή, στην κοινωνική θέση και φυσικά στην ένταση του φωτός κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας (Stewart *et al.*, 2011). Ερμηνεία αυτής της συμπεριφοράς από μία εξελικτική σκοπιά συνδέει την ενστικτώδη προτίμηση των zebrafish για τα πιο σκοτεινά περιβάλλοντα με μειωμένο ρίσκο ανίχνευσής τους από θηρευτές, σε σύγκριση με παραμονή σε ένα φωτεινό και λευκό περιβάλλον (Shiozaki *et al.*, 2020). Χρόνια χορήγηση του αντικαταθλιπτικού φλουοξετίνη μειώνει την σκοτοτακτική συμπεριφορά των ενηλίκων zebrafish (Maximino *et al.*, 2011), ενώ χειρισμοί όπως οξεία χορήγηση καφεΐνης, έκθεση σε συνθήκες χρόνιας καταπόνησης και στρες μέσω περιορισμού αύξησαν τη σκοτόταξη (Champagne *et al.*, 2010; Maximino *et al.*, 2011; Chakravarty *et al.*, 2013). Επιπλέον, συμπεριφορικές παράμετροι που εκτιμώνται σε αυτή τη δοκιμασία αποτελούν ο χρόνος μέχρι την είσοδο στο σκοτεινό τμήμα της δεξαμενής και ο χρόνος παραμονής στο σκοτεινό τμήμα, με την αυξημένη τιμή του πρώτου να αποτελεί ένδειξη μειωμένου στρες, ενώ αντίθετα αυξημένη τιμή στο δεύτερο να υποδηλώνει αυξημένο στρες (Stewart *et al.*, 2011). Οξεία χορήγηση κεταμίνης αύξησε τον χρόνο πρώτης εισόδου στο σκοτεινό τμήμα, ενώ μείωσε το συνολικό χρόνο που πέρασαν τα άτομα στη σκοτεινή ζώνη (De Campos *et al.*, 2015). Την αντίστροφη επίδραση είχε η έκθεση σε πρωτόκολλο χρόνιας απρόβλεπτης καταπόνησης (Chakravarty *et al.*, 2013).

Τα δεδομένα από τη δοκιμασία προτίμησης φωτός/σκότους δεν έδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών γενετικών γραμμών στον χρόνο που αυτά πέρασαν στο λευκό τμήμα της δεξαμενής. Η συχνότητα εισόδου όμως στο μαύρο τμήμα της δεξαμενής ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στην ομάδα $mr^{-/-}$, τόσο σε σχέση με τα άτομα αγρίου τύπου όσο και με τα $gr^{-/-}$, συμπεριφορά η οποία υποδηλώνει αυξημένη σκοτοτακτική συμπεριφορά για τα $mr^{-/-}$. Η παρατήρηση αυτή έρχεται και ενισχύει την υπόθεση για έναν πιο αγχώδη φαινότυπο στα άτομα $mr^{-/-}$, και ενδεχομένως μία βραδεία ικανότητα προσαρμογής σε καινούρια περιβάλλοντα.

Η συμπεριφορά των ατόμων των τριών γενετικών γραμμών δεν παρουσίασε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στη δοκιμασία κοινωνικής προτίμησης. Η συγκεκριμένη δοκιμασία στοχεύει στην εκτίμηση της κοινωνικότητας, καθώς μελετά το κίνητρο των zebrafish να περνούν χρόνο κοντά σε μία ομάδα με άτομα του ίδιου είδους (Wright and Krause, 2006b). Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την εκτίμηση της επίδρασης τόσο φαρμακολογικών όσο και γενετικών χειρισμών στο zebrafish καθώς τα αποτελέσματά του χαρακτηρίζονται από μεγάλη επαναληψιμότητα. Χορήγηση υψηλής συγκέντρωσης πεπτιδίων που σχετίζονται με την οξυτοκίνη προκάλεσαν αύξηση της κοινωνικής

προτίμησης στα zebrafish, ενώ έκθεση σε ανταγωνιστές της οξυτοκίνης τη μείωσε σε βαθμό σχετιζόμενο με τη δόση (Braidā *et al.*, 2012). Παρόμοια μείωση της κοινωνικής προτίμησης παρατηρείται ύστερα από χορήγηση αιθανόλης (Gerlai, 2003; Fernandes and Gerlai, 2009) και ενός ανταγωνιστή της ντοπαμίνης (Scerbina *et al.*, 2012). Επιπλέον, αγχολυτικοί φαρμακολογικοί χειρισμοί, όπως ο αγωνιστής του καναβιδοειδούς υποδοχέα (WIN 55,212-2) και η βουσπιρόνη, έχει φανεί πως αυξάνουν την κοινωνική προτίμηση των zebrafish υποδεικνύοντας μία συσχέτιση μεταξύ της ενεργότητας του HPI άξονα και της κοινωνικής συμπεριφοράς των zebrafish. Η συσχέτιση αυτή ενδεχομένως εξηγείται από την ισχυρή επίδραση που έχουν κοινωνικοί στρεσογόνοι παράγοντες στην ενεργότητα του HPI άξονα στα zebrafish (Filby *et al.*, 2010), αλλά και του HPA στον άνθρωπο (Heinrichs *et al.*, 2003). Τα γλυκοκορτικοστεροειδή διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κοινωνικότητα των οργανισμών. Σε ποντίκια εκτεθειμένα σε πρωτόκολλα χρόνιου στρες παρατηρήθηκε κοινωνική αποστροφή η οποία φάνηκε πως πυροδοτήθηκε μέσω δράσης του γλυκοκορτικοστεροειδούς υποδοχέα σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες (Barik *et al.*, 2013). Η επίδραση που έχουν συνθήκες χρόνιας έκθεσης σε υψηλά επίπεδα κορτιζόλης στα σπονδυλωτά προσομοιάζουν την επίδραση που έχουν συνθήκες κοινωνικής απομόνωσης, παρατήρηση η οποία προτείνει μία σύνδεση μεταξύ στρες και κοινωνικής συμπεριφοράς (Kudielka and Kirschbaum, 2005). Το zebrafish αποτελεί ένα εξαιρετικό μοντέλο προκειμένου να μελετηθεί η αλληλεπίδραση της ενεργότητας του άξονα HPI με την κοινωνική συμπεριφορά, καθώς αποτελεί ένα είδος με σχετικά ευρύ κοινωνικό φαινότυπο (de Abreu *et al.*, 2021).

Έκθεση γενετικών γραμμών zebrafish στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο έχει αναδείξει τις γενετικές διαφορές που οδηγούν σε διαφορετικά μοτίβα κοινωνικής συμπεριφοράς. Μία μετάλλαξη στο γονίδιο *otpa*, που συμμετέχει στην ανάπτυξη του νευρωνικού δικτύου οξυτοκίνης και στην υποθαλαμική λειτουργία, φάνηκε πως μείωσε την κοινωνική προτίμηση των ψαριών (Wirceger *et al.*, 2017). Επιπλέον, zebrafish με σίγαση του γονιδίου *dyrk1aa*, γενετική γραμμή η οποία έχει προταθεί ως μοντέλο για τις διαταραχές του φάσματος του αυτισμού, διατάραξε τη συμπεριφορά κοινωνικής προτίμησης στα zebrafish (Aslanzadeh *et al.*, 2019). Μέχρι αυτή τη στιγμή, δεν έχει μελετηθεί η κοινωνική προτίμηση και η κοινωνική συνοχή των γενετικών γραμμών με κάποια μετάλλαξη στους υποδοχείς GR και MR. Μελλοντικά πειράματα περαιτέρω διερεύνησης της επίδρασης του άξονα HPI στην κοινωνικότητα των zebrafish θα ήταν χρήσιμο να περιλαμβάνουν εκτίμηση της συνοχής του κοπαδιού καθώς και την επίδραση που έχουν στην κοινωνική συμπεριφορά των συγκεκριμένων γενετικών γραμμών τόσο συνθήκες οξείας όσο και χρόνιας καταπόνησης.

Τα zebrafish των τριών γενετικών γραμμών δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές στην έκφραση της κυρίαρχης συμπεριφοράς τους εντός των κοινωνικών ιεραρχιών που σχημάτισαν. Σε ό,τι αφορά την υποτελή συμπεριφορά, τα *gr^{-/-}* εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό

ακινήτοποίησης σε σύγκριση με τα υποτελή της ομάδας αγρίου τύπου και $mr^{-/-}$. Αυτό το οποίο παρουσίασε ενδιαφέρον είναι η ταχύτητα με την οποία τα άτομα $mr^{-/-}$ σχημάτιζαν τις κοινωνικές τους ιεραρχίες.

Οι περισσότερες μελέτες κοινωνικού στρες σε τρωκτικά, πρωτεύοντα και άλλα θηλαστικά δείχνουν πως ένα αναδραστικό ηθολογικό πρότυπο, τυπικό στα υποτελή άτομα, σχετίζεται με υψηλότερη ενεργότητα του άξονα HPA και ευαισθησία του φλοιού των επινεφριδίων σε σχέση με τα προδραστικά κυρίαρχα άτομα (Korte *et al.*, 1992, 2005; de Kloet *et al.*, 2005). Σε αφρικανικές κιχλίδες, υποτελή άτομα είχαν μειωμένη έκφραση του CRF συστήματος (Chen and Fernald, 2008; Maruska, 2014). Κυρίαρχα και υποτελή zebrafish δεν είχαν κάποια διαφορά στην έκφραση του GR, ενώ τα κυρίαρχα εμφάνισαν μία αυξημένη γονιδιακή έκφραση για τον υποδοχέα Mr (Pavlidis *et al.*, 2011). Επιπλέον, ο λόγος MR/GR στα μέλη των ιεραρχιών ήταν αυξημένος σε σύγκριση με τα άτομα της ομάδας ελέγχου. Μελέτες σε μύες δεν εντόπισαν διαφορές στη γονιδιακή έκφραση των υποδοχέων MR και GR στον ιππόκαμπο επιθετικών και μη επιθετικών ατόμων υπό συνθήκες ηρεμίας (Veenema *et al.*, 2003; Korte *et al.*, 2005). Πειράματα με σίγαση στο *gr* γονίδιο γονιμοποιημένων αυγών zebrafish διαφώτισε τον σηματοδοτικό ρόλο του Gr στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης (Nesan and Vijayan, 2013). Οι έρευνες αυτές έδειξαν πως μείωση της μεταφραστικής δραστηριότητας του γονιδίου Gr στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια αύξησε τα επίπεδα μεταγράφων της αργινίνης βασοπρεσίνης (*avpl*), η οποία εκτός από ωσμορυθμιστική δράση (Nielsen *et al.*, 1995), εμπλέκεται και σε περίπλοκες κοινωνικές συμπεριφορές στα θηλαστικά, ενώ στα ψάρια φαίνεται πως κυρίως δρα ρυθμίζοντας τη κοινωνική συμπεριφορά των κυρίαρχων/υποτελών (Larson *et al.*, 2006). Η παρατήρηση αυτή προσφέρει μία ενδιαφέρουσα σύνδεση μεταξύ μείωσης της μετάφρασης του Gr και αύξησης της επιθετικότητας, μέσω αλλαγής στην έκφραση της βασοπρεσίνης στον εγκέφαλο. Τα υποτελή άτομα της ομάδας $gr^{-/-}$ εμφάνισαν έναν πιο έντονα αναδραστικό φαινότυπο μέσω της αυξημένης ακινήτοποιημένης τους συμπεριφοράς. Στην ιριδίζουσα πέστροφα, έχει φανεί πως άτομα χαμηλής απόκρισης του άξονα HPI αναγνωρίζονται πιο συχνά ως κυρίαρχα σε δυαδικές δοκιμασίες σε σύγκριση με άτομα υψηλής απόκρισης του HPI (Pottinger and Carrick, 2001).

Στη δοκιμασία καθρέπτη, τα υποτελή $gr^{-/-}$ είχαν τη χαμηλότερη μέση ταχύτητα και διάνυσαν τη λιγότερη απόσταση σε σχέση τόσο με την ομάδα αγρίου τύπου όσο και με τα υποτελή $mr^{-/-}$. Γενικά τα $gr^{-/-}$ εμφάνισαν χαμηλότερη κινητικότητα στη δοκιμασία καθρέπτη, ασχέτως του ηθολογικού τους προτύπου. Επιπλέον, τα υποτελή $gr^{-/-}$ εμφάνισαν το υψηλότερο ποσοστό ακινήτοποίησης σε σύγκριση με τα υποτελή αγρίου τύπου και τα $mr^{-/-}$, ενώ εμφανίστηκε και μεγάλη διαφορά μεταξύ του χρόνου ακινήτοποίησης των κυρίαρχων και υποτελών $gr^{-/-}$, διαφορά που δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των ηθολογικών προτύπων των υπολοίπων γενετικών γραμμών. Μία παρατήρηση η οποία έγινε και στη δοκιμασία αγωνιστικής συμπεριφοράς.

Η δοκιμασία καθρέπτη αποτελεί ένα από τα πλέον χρησιμοποιούμενα πρωτόκολλα πρόκλησης επιθετικής συμπεριφοράς στο zebrafish, καθώς επιτυγχάνει υψηλή διαδραστικότητα του zebrafish με το «απειλητικό» ερέθισμα/είδωλο ενώ διατηρεί μειωμένο το ρίσκο τραυματισμού του πειραματόζωου (Craft *et al.*, 2003; Verbeek *et al.*, 2007; Riebli *et al.*, 2011; Wilson *et al.*, 2011). Παρ' όλα αυτά δεν εκφράζεται το πλήρες ρεπερτόριο επιθετικής συμπεριφοράς που παρατηρείται στη δοκιμασία δυαδικής αγωνιστικής συμπεριφοράς, καθώς ο αντίπαλος - είδωλο δεν αποκρίνεται ποτέ με υποτελή συμπεριφορά και έτσι οι μάχες καθρέπτη αποτελούν ουσιαστικά ανεπίλυτες μάχες. Η διαφορά αυτή αποτυπώνεται και στη νευροχημεία του εγκεφάλου των zebrafish, καθώς ένας αληθινός αντίπαλος σε μία δυαδική αγωνιστική συνθήκη ασκεί διαφορετική επίδραση στη νευροχημεία του εγκεφάλου και τη γονιδιακή έκφραση σε σύγκριση με την αλληλεπίδραση με ένα είδωλο (Teles *et al.*, 2013). Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα από τη χρήση της γενετικής γραμμής *fgfr1a*, η οποία παρουσιάζει έναν τολμηρό και επιθετικό συμπεριφορικό φαινότυπο (Norton *et al.*, 2011), καθώς το αποτέλεσμα των δυαδικών αλληλεπιδράσεων δεν κατέστη δυνατό να προβλεφθεί από το επίπεδο επιθετικότητας που εκτιμήθηκε μέσω της δοκιμασίας καθρέπτη (Mustafa *et al.*, 2019). Πιο συγκεκριμένα, τα μεταλλαγμένα άτομα αν και είχαν πολύ υψηλά επίπεδα επιθετικότητας στο πλαίσιο αλληλεπίδρασης με τον καθρέπτη, δεν εμφάνισαν κάποιο πλεονέκτημα σε δυαδικές μάχες με άτομα αγρίου τύπου ούτε εμφάνισαν κάποια διαφορά στη συμπεριφορά τους όταν αντιμετώπιζαν έναν πραγματικό αντίπαλο και όχι το είδωλό τους.

Τα γλυκοκορτικοστεροειδή αναλαμβάνουν δυαδικό ρόλο ως προς την επιθετικότητα, καταστέλλοντας ή εμποδίζοντάς την, αναλόγως της κοινωνικής θέσης, της προσωπικότητας και της διάρκειας του στρεσογόνου ερεθίσματος (Summers *et al.*, 2005; Grace and Anderson, 2014). Τα προδραστικά ή τολμηρά άτομα τείνουν να έχουν χαμηλότερα επίπεδα γλυκοκορτικοστεροειδών ως απόκριση στο στρες, και επιπλέον τα γλυκοκορτικοστεροειδή παίζουν ανασταλτικό ρόλο στην προδραστική συμπεριφορά. Έρευνες σε πτηνά που είχαν επιλεγεί με γνώμονα την προδραστική τους προσωπικότητα, έδειξαν μειωμένα επίπεδα γλυκοκορτικοστεροειδών τόσο σε ηρεμία (Stöwe *et al.*, 2010) όσο και ως απόκριση στο στρες (Baugh *et al.*, 2012). Σε ένα είδος ορτυκιού, ύστερα από επιλογή ατόμων του πληθυσμού με χαμηλότερη ενεργότητα του HPA άξονα, προέκυψαν απόγονοι με προδραστική προσωπικότητα (Jones *et al.*, 1994). Παρόμοια δεδομένα που συσχετίζουν την υψηλή ενεργότητα του άξονα HPA και τη λιγότερο προδραστική προσωπικότητα εντοπίζονται και σε μελέτες με γενετικές γραμμές μυών τεχνητά επιλεγμένων για υψηλή επιθετικότητα (Veenema *et al.*, 2003), σε ένα είδος σπίνου επιλεγμένου για πιο εξερευνητική συμπεριφορά (Martins *et al.*, 2007), πρόβατα επιλεγμένα για υψηλή ενεργότητα του HPA άξονα (Lee *et al.*, 2014), και ιριδίζουσα πέστροφα επιλεγμένη για υψηλή ενεργότητα του άξονα HPI (Øverli *et al.*, 2002). Αν και τα επίπεδα κορτιζόλης δε διέφεραν μεταξύ προδραστικών – κυρίαρχων και αναδραστικών – υποτελών zebrafish,

εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές στη γενετική έκφραση των γλυκοκορτικοστεροειδών υποδοχέων και των γονιδίων που ρυθμίζουν τη σύνθεση ορμονών του στρες (Oswald *et al.*, 2013). Σε zebrafish που έχουν κατηγοριοποιηθεί με βάση τα επίπεδα κινητικότητάς τους σε προδραστικά και αναδραστικά άτομα, δεν εντοπίστηκε κάποια διαφορά στη γενετική έκφραση του Gr υποδοχέα, όμως το *crh1* γονίδιο φάνηκε πως είναι κρίσιμο στην αύξηση των γλυκοκορτικοστεροειδών ως απόκριση στο στρες (Wong *et al.*, 2019). Επιπλέον, τα *hsd11b2* και *hsd20b2*, γονίδια που απενεργοποιούν την κορτιζόλη, έδειξαν σημαντικά υψηλότερη γενετική έκφραση στον εγκέφαλο των χαρακτηρισμένων ως αναδραστικών ατόμων. Η συγκεκριμένη παρατήρηση ωθεί στην υπόθεση πως στα αναδραστικά άτομα παρατηρείται μία μοριακή τάση ταχύτερης επιστροφής στα επίπεδα ηρεμίας της κορτιζόλης. Τα υποτελή *gr*^{-/-} zebrafish εμφάνισαν έναν πιο έντονο αναδραστικό φαινότυπο, το οποίο συμβαδίζει με τις ενδείξεις πως τα αναδραστικά άτομα έχουν υψηλότερη κορύφωση κορτιζόλης ως απόκριση στο στρες συγκριτικά με τα προδραστικά άτομα σε ένα μεγάλο εύρος ειδών (Øverli *et al.*, 2007; Koolhaas *et al.*, 2010).

Η πρώτη γενετική γραμμή GR^{-/-} αναπτύχθηκε σε μύες και αν και τα άτομα αυτά επιβιώνουν λίγες μόνο ώρες μετά τη γέννησή τους, η εξέλιξη αυτή φώτισε τον κρίσιμο ρόλο των γλυκοκορτικοστεροειδών στην ανάπτυξη και στην οργανογένεση (Cole *et al.*, 1995). Περαιτέρω μελέτες με επιλεκτική σίγαση του GR στον εγκέφαλο μύων προκάλεσε μείωση στη συμπεριφορά αγχώδους τύπου, τονίζοντας τον ρόλο των γλυκοκορτικοστεροειδών ως ρυθμιστές της συμπεριφοράς (Tronche *et al.*, 1999). Από την άλλη, το μοντέλο της σίγασης του Gr στα zebrafish είναι βιώσιμο και επιτρέπει την παρατήρηση της συμπεριφοράς και της φυσιολογίας του μέχρι και το ενήλικο στάδιο ζωής. Ενήλικα zebrafish με μετάλλαξη στον υποδοχέα Gr (*gr*^{s357}) αντέδρασαν με μειωμένη εξερευνητική συμπεριφορά και εξασθενημένη εξοικείωση σε στρεσογόνες συνθήκες, με χαρακτηριστικό φαινότυπο τη συμπεριφορά ακινητοποίησης (Ziv *et al.*, 2013). Στα πλαίσια των πειραμάτων του κεφαλαίου αυτού, η παρατήρηση αυτή δεν έγινε, ενδεχομένως λόγω της διαφορετικής γενετικής γραμμής. Η μετάλλαξη στα *gr*^{s357} έχει ως αποτέλεσμα ένα γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που προσδέεται στα γλυκοκορτικοστεροειδή και μεταφέρεται στον πυρήνα, χωρίς όμως να μπορεί να προσδεθεί στα GREs (Griffiths 2013). Αντίθετα η *gr*^{ia30}, η οποία αφορά τη γενετική γραμμή *gr*^{-/-} που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα αυτής της εργασίας έχει ως αποτέλεσμα ένα μη λειτουργικό γονίδιο (Fachinello *et al.*, 2017). Εξάλλου οι δύο αυτές γενετικές γραμμές έχει φανεί πως διαφέρουν και στις ανοσοποιητικές τους αποκρίσεις, με τα άτομα *gr*^{ia30} να μην τροποποιούν την έκφραση των δεικτών φλεγμονής ύστερα από έκθεση σε δεξαμεθαζόνη και σε DSS (dextran sulfate sodium), ουσία που χρησιμοποιείται για πρόκληση εντερικής φλεγμονής (Fachinello *et al.*, 2017). Αντίθετα, τα άτομα *gr*^{s357}, ύστερα από έκθεση σε DSS, ενεργοποίησαν την έκφραση των σχετικών με φλεγμονή γονιδίων, με χαμηλότερη όμως ένταση απόκρισης σε σύγκριση

με τα αγρίου τύπου. Επιπλέον, η έκθεση στη δεξαμεθαζόνη κατάφερε να επαναφέρει σε επίπεδα ηρεμίας τα gr^{s357} δείχνοντας πως η συγκεκριμένη γενετική γραμμή αποκρίνεται στα εξωγενή κορτικοστεροειδή.

Σε ό,τι αφορά τον υποδοχέα MR και μελέτες της δράσης του μέσω απενεργοποιητικών μεταλλάξεων, οι έρευνες είναι αρκετά περιορισμένες. Ομοίως με την περίπτωση του GR, η θνησιμότητα των μυών με μετάλλαξη στον υποδοχέα MR έχει εμποδίσει την έρευνα σε αυτό το κομμάτι (Gass *et al.*, 2001). Επιλεκτική σίγαση του MR στον εγκέφαλο μυών προκαλεί εξασθένηση στη μνήμη και στον άξονα HPA (Douma *et al.*, 1998; Berger *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2014), ενώ διαγονιδιακή υπερέκφραση του MR στον πρόσθιο εγκέφαλο μείωσε την αγχώδους τύπου συμπεριφορά των μυών (Rozeboom *et al.*, 2007). Γενετική γραμμή σίγασης του Mr στο είδος τελεόστεου *Oryzias latipes* έδειξε πως τα μεταλλαγμένα άτομα αποκρίνονται σε οπτικά ερεθίσματα με διαταραγμένη κινητική συμπεριφορά και αυξημένη επιτάχυνση κίνησης (Sakamoto *et al.*, 2016). Παρατήρηση η οποία ενισχύει τη θεωρία πως ο Mr διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην οπτική επεξεργασία των ερεθισμάτων, η οποία επιτρέπει την προσαρμογή και απόκριση στις ταχείες περιβαλλοντικές αλλαγές. Εξάλλου, η γενετική έκφραση του Mr είναι μέγιστη σε ιστούς εγκεφάλου και οφθαλμού σε δείγματα από δύο είδη τελεόστεων (Sturm *et al.*, 2005; Sakamoto *et al.*, 2016). Επιπλέον, τα mr μετάγραφα αυξάνονται στο αναπτυξιακό στάδιο όπου παρατηρείται και η έναρξη της οπτοκινητικής δραστηριότητας (Alsop and Vijayan, 2008). Τα αποτελέσματα σε $mr^{-/-}$ zebrafish περιορίζονται στις προνύμφες, παρουσιάζοντας μείωση της απόκρισης σε φωτεινά ερεθίσματα και ελάττωση της θιγμοτακτικής συμπεριφοράς (Faught and Vijayan, 2018).

Η χρήση μίας αλληλουχίας συμπεριφορικών δοκιμασιών (battery of tests) αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τις έρευνες σε γενετικές γραμμές σίγασης γονιδίων, καθώς επιτρέπει την εκτίμηση της επίδρασης του γενετικού χειρισμού σε ένα ευρύ σύνολο από παραμέτρους της συμπεριφοράς και της γνωστικής λειτουργίας των οργανισμών μοντέλων (Choi *et al.*, 2018; Shiozaki *et al.*, 2020; Ikeda *et al.*, 2021). Με αυτό τον τρόπο εκτιμάται η απόκριση στην καταπόνηση και στο άγνωστο περιβάλλον, η εξερευνητικότητα, η κοινωνική προτίμηση και τυχόν γνωστικά προβλήματα. Η επιλογή μίας αλληλουχίας συμπεριφορικών δοκιμασιών προσφέρει έναν μεγάλο όγκο πληροφορίας μειώνοντας τον αριθμό των ζώων που χρησιμοποιείται συμβαδίζοντας με τους κανόνες των τριών R ('The Principles of Humane Experimental Technique', 1960). Συνδυάζοντας τις παρατηρήσεις από όλες τις δοκιμασίες, τα $mr^{-/-}$ άτομα έδειξαν μειωμένη εξερευνητικότητα και τολμηρότητα, μία υπερδραστηριότητα σε άγνωστα νεοφανή περιβάλλοντα καθώς και μία ισχυρά σκοτοτακτική (scototaxis) συμπεριφορά. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν έναν αγχώδη φαινότυπο καθώς και μία ενδεχόμενη βραδεία ικανότητα προσαρμογής σε καινούρια περιβάλλοντα. Το γεγονός πως τα άτομα $gr^{-/-}$ δε συμβάδισαν στην έκφραση του συγκεκριμένου φαινοτύπου, ενισχύει την υπόθεση της

συμπληρωματικής δράσης των δύο υποδοχέων και πιθανώς φωτίζει τη συμμετοχή του Mr στην τολμηρότητα και εξερευνητικότητα. Είναι σημαντικό σε μελλοντικά πειράματα να εκτιμηθούν η συμπεριφορά ακινητοποίησης καθώς και η εκτίμηση των σπασμωδικών (erratic) κινήσεων των ενηλίκων zebrafish ώστε να σχηματιστεί μία πιο ολοκληρωμένη εικόνα για το συμπεριφορικό τους φαινότυπο και το πώς αυτός συνδέεται με διαφορές στην ενεργότητα του άξονα HPI.

Η έκθεση των οργανισμών στο πρωτόκολλο χρόνιας καταπόνησης δεν επέφερε κάποια στατιστικά σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση της κορτιζόλης στα άτομα των τριών γενετικών γραμμών. Έκθεση ενηλίκων zebrafish σε πρωτόκολλα χρόνιου στρες προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης και αλλαγή στην έκφραση γονιδίων που ρυθμίζουν την ενεργότητα του άξονα HPI (Piato *et al.*, 2011; Marcon *et al.*, 2018; Demin *et al.*, 2020). Αν και το σύνολο αυτών των πειραματικών σχεδιασμών διαφέρει σε αρκετά σημεία, μία ομοιότητα τους είναι πως τα ερεθίσματα τα οποία εφαρμόζονται χαρακτηρίζονται από υψηλή ένταση καταπόνησης, όπως είναι ο περιορισμός του κάθε ενηλίκου zebrafish σε erpendorf των 2 ml για 90 λεπτά, έκθεση για 50 λεπτά σε θρευτή και αύξηση του pH του νερού. Το πρωτόκολλο το οποίο επιλέχθηκε για τα πειράματα αυτού του κεφαλαίου απαρτίζεται από ηπιότερα περιβαλλοντικά και διαχειριστικά ερεθίσματα, με τα οποία το ψάρι υπάρχει πιθανότητα να έρθει αντιμέτωπο είτε στη φύση είτε σε αιχμαλωσία. Η χρήση του σε προηγούμενα πειράματα προκάλεσε τη φυσιολογική απόκριση των οργανισμών σε χρόνια καταπόνηση, η οποία εκδηλώθηκε ως αύξηση στη συγκέντρωση της κορτιζόλης και αλλαγή στην έκφραση γονιδίων που ρυθμίζουν τον άξονα HPI (Pavlidis *et al.*, 2015). Παρ' όλα αυτά, η χρήση του ίδιου πρωτοκόλλου στο συγκεκριμένο πειραματικό σχεδιασμό απέτυχε να προκαλέσει μία φυσιολογική απόκριση χρόνιου στρες όχι μόνο στις γενετικές γραμμές των $gr^{-/-}$ και $mr^{-/-}$, αλλά και στα άτομα αγρίου τύπου. Αυτό ενδέχεται να οφείλεται στο ότι το πρωτόκολλο χρόνιου στρες υλοποιήθηκε αρχικά χρησιμοποιώντας zebrafish άγριας προέλευσης (Σιγκαπούρης), σε αντίθεση με το πείραμα στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας όπου τα αγρίου τύπου ψάρια είχαν εργαστηριακή προέλευση και ανήκουν στο στέλεχος Tu (Tübingen) (Haffter *et al.*, 1996). Ένας μεγάλος όγκος ερευνών ασχολείται με τις διαφορετικές συμπεριφορικές και φυσιολογικές αποκρίσεις των διαφόρων στελεχών αγρίου τύπου zebrafish που χρησιμοποιούνται (Vignet *et al.*, 2013; Gorissen *et al.*, 2015). Παρατηρείται λοιπόν πως συμπεριφορές αγχώδους φαινοτύπου και εξερευνητικότητας είναι σημαντικά διαφορετικές μεταξύ των διαφόρων στελεχών αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα οι Audira *et al.* (2020) έδειξαν πως άτομα zebrafish άγριας προέλευσης διέφεραν στην εξερευνητική τους συμπεριφορά και στην προσέγγιση ενός νεοφανούς περιβάλλοντος σε σύγκριση με άτομα της γραμμής AB.

Ασχέτως της επίδρασης που είχε η χρόνια καταπόνηση στα zebrafish, τα $gr^{-/-}$ είχαν υψηλότερη συγκέντρωση κορτιζόλης σε σύγκριση με τα WT και τα $mr^{-/-}$, τόσο στην ομάδα ελέγχου όσο και στην

ομάδα του χρόνιου στρες. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με δημοσιευμένες μελέτες που εκτιμούν τα επίπεδα κορτιζόλης τόσο σε προνύμφες όσο και σε ενήλικα zebrafish με κάποια μετάλλαξη στον GR (Griffiths *et al.*, 2012; Ziv *et al.*, 2012; Facchinello *et al.*, 2017; Faught and Vijayan, 2018). Η υπερκορτιζολαιμία που εντοπίζεται στα ενήλικα *gr^{-/-}* υποδεικνύει είτε έναν προβληματικό μηχανισμό αρνητικής ανάδρασης είτε μία μειωμένη αποδόμηση της κορτιζόλης. Σε ό,τι αφορά γενετικές γραμμές zebrafish με μετάλλαξη στο γονίδιο για τον MR, τα δεδομένα είναι πολύ περιορισμένα. Η συγκέντρωση της κορτιζόλης σε προνύμφες *mr^{-/-}* ύστερα από έκθεση σε οξύ στρες, έχει δείξει μία καθυστέρηση στην απόκριση της κορτιζόλης, χωρίς όμως να έχει επηρεαστεί η ένταση της απόκρισης (Faught and Vijayan, 2018), υπογραμμίζοντας τη συμμετοχή του MR στη ρύθμιση της απόκρισης του HPI άξονα στην καταπόνηση. Επιπλέον, οι Faught & Vijayan (2018) έδειξαν πως σε κατάσταση ηρεμίας οι προνύμφες *mr^{-/-}* δεν παρουσίασαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση της κορτιζόλης σε σύγκριση με τις προνύμφες αγρίου τύπου. Η διαφορά αυτή ανάμεσα στα *gr^{-/-}* και *mr^{-/-}* υποδηλώνει πως ο GR διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων της κορτιζόλης σε επίπεδα ηρεμίας. Τα αποτελέσματα της έρευνας μας σε συνδυασμό με δημοσιευμένα δεδομένα από γενετικές γραμμές με σίγαση του γονιδίου για τον MR, τόσο σε προνύμφες zebrafish όσο και σε ενήλικα του είδους *Oryzias latipes* (Sakamoto *et al.*, 2016) καθώς και σε θηλαστικά (Joëls and de Kloet, 2017), δείχνουν πως ο MR κατέχει ενεργό ρόλο στην εκτίμηση των στρεσογόνων ερεθισμάτων (appraisal). Οι διαφορές που παρατηρήσαμε στη συμπεριφορική και φυσιολογική απόκριση των *mr^{-/-}* και *gr^{-/-}* ενήλικων zebrafish υποδηλώνουν πως οι δύο υποδοχείς έχουν διακριτούς και συμπληρωματικούς ρόλους στους μηχανισμούς που διέπουν την απόκριση στο στρες.

Κεφάλαιο 6. Αγχώδους τύπου συμπεριφορά σε προνούμφες zebrafish και ο ρόλος των γλυκοκορτικοστεροειδών και αλατοκορτικοστεροειδών υποδοχέων.

6.1. Εισαγωγή

Αποτελεί πλέον κοινή γνώση πως οι προνούμφες zebrafish είναι ευαίσθητες σε διάφορους τύπους ερεθισμάτων, τα οποία μεταξύ άλλων μπορεί να είναι οσφρητικά, ακουστικά, οπτικά και θερμικά. Μία από τις πλέον χρησιμοποιημένες μεθόδους για την εκτίμηση της επίδρασης νευροδραστικών φαρμάκων ή γενετικών χειρισμών σε προνούμφες zebrafish είναι αυτό της έκθεσης σε συνθήκες εναλλασσόμενου φωτός και σκότους (Basnet *et al.*, 2019). Το πρωτόκολλο αυτό εμφανίζεται στη βιβλιογραφία σε αρκετές παραλλαγές, οι οποίες σχετίζονται κυρίως με το αναπτυξιακό στάδιο της προνούμφης, τον αριθμό των πηγαδιών στα πιάτα κυτταροκαλλιέργειας που χρησιμοποιούνται και φυσικά στη διάρκεια των εναλλασσόμενων φωτεινών και σκοτεινών περιόδων (Irons *et al.*, 2010; Fraser *et al.*, 2017). Παρά το πλήθος των παραλλαγών, είναι λίγες οι δημοσιεύσεις εκείνες οι οποίες δίνουν λεπτομερείς αναφορές στις πειραματικές συνθήκες, όπως είναι η ένταση του φωτός στο οποίο εκτέθηκαν οι προνούμφες.

Από τις πλέον μελετημένες συμπεριφορές στις προνούμφες zebrafish είναι η θιγμοτακτική (thigmotaxis), δηλαδή η προτίμηση παραμονής στους τείχους της δεξαμενής και η αποφυγή παραμονής στο κέντρο (Schhörr *et al.*, 2012). Αν και η συμπεριφορική της λειτουργία στο zebrafish δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητή, έχουν γίνει υποθέσεις για συσχέτισή της με την εξερευνητικότητα και την αποφυγή πιθανού θηρευτή σε σπηλαιόβια είδη τελεόστεων (cavefish) (Sharma *et al.*, 2009) καθώς και την αγχώδη συμπεριφορά στα θηλαστικά (Sousa *et al.*, 2006; Kallai *et al.*, 2007). Το νευρικό δίκτυο που υποκινεί τη θιγμόταξη δεν έχει χαρακτηριστεί πλήρως, έχει φανεί όμως η ευαισθησία του συστήματος σε φαρμακολογικούς χειρισμούς, καθώς σχετίζεται με τους νευροδιαβιβαστές GABA (Lockwood *et al.*, 2004), την ισταμίνη (Peitsaro *et al.*, 2003) και την ντοπαμίνη (Sim, 1994).

Μία άλλη συμπεριφορά που μελετάται σε προνούμφες zebrafish είναι η απόκριση αιφνιδιασμού (startle response), η οποία χαρακτηρίζεται από γρήγορη σύσπαση των σωματικών μυών που αποσκοπεί στην προστασία από βλαβερά ερεθίσματα ή θηρευτές (Koch, 1999). Η συγκεκριμένη απόκριση μπορεί να προκληθεί με ακουστικά (Best *et al.*, 2008), μηχανικά (Faria *et al.*, 2019a) ή οπτικά ερεθίσματα (Burgess and Granato, 2007) και αποτελείται από ένα ταχύ C - bend το οποίο ακολουθείται από υψηλής έντασης και χαμηλής συχνότητας γρήγορη κολυμβητική κίνηση (Fero *et al.*, 2011). Ελέγχεται από ένα δικτυονωτιαίο κύκλωμα που συνδέει αισθητηριακούς νευρώνες με κινητικούς νευρώνες της σπονδυλικής στήλης και ξεκινάει από τα κύτταρα Mauthner (Norton, 2012).

Η συγκεκριμένη απόκριση εκτιμάται με ακρίβεια ως η απόσταση που διανύθηκε ύστερα από το ερέθισμα που την προκάλεσε.

Η δραστηριότητα του άξονα HPI έχει φανεί πως επιδρά σημαντικά στη συμπεριφορά των προνυμφών zebrafish, καθώς έκθεση σε κορτιζόλη επιφέρει αύξηση της κινητικότητας (Best and Vijayan, 2018). Συμπεριφορικά πειράματα με προνύμφες των γενετικών γραμμών *gr*^{-/-} και *mr*^{-/-} έδειξαν διακριτή και συμπληρωματική λειτουργία των δύο υποδοχέων (Faught and Vijayan, 2018). Απώλεια οποιουδήποτε από τους δύο υποδοχείς εξαφάνισε την αυξημένη δραστηριότητα απόκρισης σε φωτεινό ερέθισμα, ύστερα από χορήγηση γλυκοκορτικοστεροειδών. Επιπλέον, προνύμφες χωρίς έκφραση του Gr είχαν αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης και απώλεια ικανότητας εκκίνησης μίας απόκρισης σε καταπόνηση. Αντίθετα, τα στελέχη *mr*^{-/-} έδειξαν καθυστέρηση στην απόκριση της κορτιζόλης ύστερα από έκθεση σε στρες.

Στόχος των συγκεκριμένων πειραμάτων ήταν να διερευνηθεί η επίδραση που έχουν οι μεταλλάξεις σε υποδοχείς του άξονα HPI στη συμπεριφορική και φυσιολογική απόκριση των προνυμφών σε συνθήκες στρες. Οι περισσότερες μελέτες λόγω της δυσκολίας που προκύπτει από το μικρό μέγεθος του οργανισμού εκτιμούν τη συγκέντρωση της κορτιζόλης σε pools από προνύμφες (Alsop and Vijayan, 2008; Faught *et al.*, 2016; Best and Vijayan, 2018). Στα συγκεκριμένα πειράματα, ακολουθώντας το πρωτόκολλο των Samaras and Pavlidis (2020), έγινε εκτίμηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης σε κάθε προνύμφη μεμονωμένα.

6.2. Υλικά και μέθοδοι

6.2.1 Χειρισμός και προέλευση πειραματόζων

Οι γενετικές γραμμές zebrafish οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στα συγκεκριμένα πειράματα, *gr*^{-/-}, *mr*^{-/-}, το διπλό μετάλλαγμα *gr*^{-/-} *mr*^{-/-}, καθώς και η γραμμή αγρίου τύπου (WT) αποτέλεσαν χορηγία της Καθηγήτριας Luisa Dalla Valle (Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πάντοβα, Ιταλία). Το γενετικό υπόβαθρο των γενετικών μεταλλάξεων και της γραμμής αγρίου τύπου ήταν κοινό (Tg(9xGCRE-HSV.U123:EGFP)ia20) (Facchinello *et al.*, 2017). Η εκτροφή, η αναπαραγωγή και τα σχετικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ιχθύων του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Τα ενήλικα άτομα των οποίων οι απόγονοι χρησιμοποιήθηκαν στα συγκεκριμένα πειράματα στεγάζονταν στο ειδικό κλειστό σύστημα ανακύκλωσης και αποστείρωσης του νερού ZebTEC Active Blue Stand Alone (Techniplast). Προκειμένου να ληφθούν οι προνύμφες κάθε γενετικής γραμμής, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία αναπαραγωγής που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 4.

6.2.2. Συμπεριφορικές δοκιμασίες

Οι συμπεριφορικές δοκιμασίες εφαρμόστηκαν σε τέσσερις πειραματικές ομάδες, $gr^{-/-}$, $mr^{-/-}$, $gr^{-/-}mr^{-/-}$ και WT, με την κάθε ομάδα να αποτελείται από 35 - 72 άτομα. Το σύνολο των συμπεριφορικών δοκιμασιών πραγματοποιήθηκε μεταξύ των ωρών 12:00 – 16:00.

6.2.2.1. Κινητική απόκριση στην εναλλαγή φωτός - σκότους [alternating light- and dark- induced locomotor response (LMR – L/D)]

Προνύμφες 5 dpf μεταφέρθηκαν σε μικροπλάκες κυτταροκαλλιέργειας 24 θέσεων (πηγαδιών), επίπεδης βάσης με 1.5 ml EW. Αφέθηκαν ανενόχλητες για 24 ώρες προκειμένου να συνέλθουν από το στρες της μεταφοράς και να εξοικειωθούν με το καινούριο περιβάλλον. Την επόμενη ημέρα (6 dpf) η κάθε μικροπλάκα εκτέθηκε σε ένα από τα δύο πρωτόκολλα δοκιμασίας εναλλαγής φωτός - σκότους μέσα στον πειραματικό θάλαμο του DanioVision. Και τα δύο πρωτόκολλα περιελάμβαναν τα εξής στάδια: 15 λεπτά εξοικείωσης στις συνθήκες του θαλάμου (απόλυτο σκοτάδι) και έπειτα 4 εναλλαγές 10 λεπτών φωτός και 10 λεπτών σκοταδιού. Η συνολική διάρκεια της κάθε δοκιμασίας ήταν 95 λεπτά. Η μόνη διαφορά μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων ήταν η ένταση φωτός στην οποία εκτέθηκαν οι προνύμφες, στην περίπτωση του πρωτοκόλλου A η ένταση του φωτισμού ήταν στο 5% (139 lx), ενώ στο B η ένταση του φωτισμού μεγιστοποιήθηκε στο 100% (10500 lx).

Οι καταγεγραμμένες δοκιμασίες αναλύθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Ethovision XT 14, το οποίο ανέλυσε την κίνηση κάθε μίας από τις 24 προνύμφες που υπήρχαν στην κάθε μικροπλάκα. Οι ηθολογικές παράμετροι που εκτιμήθηκαν ήταν η συνολική απόσταση που διένυσε η προνύμφη κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας (total distance moved, mm) καθώς και το ποσοστό του χρόνου που η κάθε προνύμφη πέρασε στο κέντρο του κάθε πηγαδιού (thigmotaxis, % of time spent in the center).

6.2.2.2. Δοκιμασία απόκρισης σε μηχανική καταπόνηση (δόννηση) (Vibrational startle response assay)

Στόχος της συγκεκριμένης δοκιμασίας ήταν να εντοπιστούν πιθανές διαφορές στην προσαρμοστική ικανότητα (habituation) που εμφανίζουν προνύμφες από διαφορετικές γενετικές γραμμές. Το πρωτόκολλο βασίστηκε στην παραδοχή πως η συνεχής έκθεση ενός οργανισμού σε ένα ερέθισμα το οποίο προκαλεί την ενεργοποίηση ενός αντανακλαστικού επιφέρει τελικά αποδυνάμωση της απόκρισης του αντανακλαστικού (Thompson and Spencer, 1966). Το γεγονός αυτό αποτελεί ένα παράδειγμα μη-συνειρμικής μνήμης και στόχος ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της σίγασης των γονιδίων έκφρασης των γλυκο - και αλατοκορτικοστεροειδών υποδοχέων, στην ικανότητα των ατόμων ως προς αυτό τον τύπο μνήμης. Το πρωτόκολλο σχεδιάστηκε με βάση δημοσιευμένες μελέτες (Best *et al.*, 2008; Faria *et al.*, 2019a) καθώς και δεδομένα από προκαταρκτικά πειράματα του εργαστηρίου. Στόχος αποτέλεσε η μελέτη της ταχύτητας με την οποία οι προνύμφες προσάρμοσαν την αντίδρασή τους (c-startle response) σε αλληλουχίες συνεχόμενων ερεθισμάτων. Η

επανεκθεση σε δεύτερη αλληλουχία ερεθισμάτων ύστερα από ένα διάλλειμα 15 λεπτών επιχείρησε να λειτουργήσει ως επιβεβαίωση της αυθόρμητης ανάκτησης (recovery) της απόκρισής τους.

Οι προνύμφες ξεκινούν να αποκρίνονται σε ακουστικά ερεθίσματα και δονήσεις από την ηλικία των 5 dpf (Best *et al.*, 2008), ενώ από την 8^η dpf και έπειτα έχει δειχθεί πως η συμπεριφορική απόκριση των προνυμφών στα ερεθίσματα του περιβάλλοντος παρουσιάζει υψηλή διακύμανση μεταξύ των ατόμων μίας ομάδας (Faria *et al.*, 2020). Επομένως για τον σκοπό των συγκεκριμένων πειραμάτων αποφασίστηκε η χρήση προνυμφών ηλικίας 6 dpf.

Προνύμφες ηλικίας 5 dpf μεταφέρθηκαν σε μικροπλάκες κυτταροκαλλιέργειας 24 θέσεων με 1.5 ml EW. Αφέθηκαν ανενόχλητες για 24 ώρες προκειμένου να συνέλθουν από το στρες της μεταφοράς και να εξοικειωθούν με το καινούριο περιβάλλον στο πιάτο. Την επόμενη μέρα (6 dpf) η κάθε μικροπλάκα εκτέθηκε στο πρωτόκολλο δοκιμασίας απόκρισης στην δόνηση εντός του θαλάμου DanioVision. Το ερέθισμα της δόνησης (tapping stimulus) ρυθμίστηκε στην υψηλότερη ένταση και η αλληλουχία των ερεθισμάτων δόθηκε με καθορισμένο χρονικό διάστημα μεταξύ τους (interstimulus interval, ISI), ορισμένο στο 1 s. Η ανάλυση της καταγεγραμμένης συμπεριφοράς εστίασε στον υπολογισμό της απόστασης που διένυσε η κάθε προνύμφη στο ένα δευτερόλεπτο μετά από το κάθε ερέθισμα. Οι προνύμφες αφέθηκαν για 15 λεπτά να εξοικειωθούν με τις συνθήκες του θαλάμου παρατήρησης και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε 50 δονήσεις με ISI 1 δευτερόλεπτο. Με το πέρας, 15 λεπτών εκτέθηκαν και πάλι σε μία αλληλουχία 20 δονήσεων της πλατφόρμας με ISI 1 sec.

6.2.3. Πείραμα απόκρισης προνυμφών σε οξύ στρες

Για τη μελέτη της απόκρισης των προνυμφών σε οξύ στρες χρησιμοποιήθηκαν προνύμφες ηλικίας 6 dpf από τις γενετικές γραμμές *gr*^{-/-}, *mr*^{-/-}, *gr*^{-/-}*mr*^{-/-} και WT. Οι προνύμφες της κάθε γενετικής γραμμής μεταφέρθηκαν σε δεξαμενή με 160 ml EW και 40 ml χλωριούχο νάτριο (NaCl) συγκέντρωσης 1.25 M (τελική συγκέντρωση 250 mM) και η δεξαμενή τους αναδεύτηκε ισχυρά για 3 λεπτά. Με το πέρας των 3 λεπτών, οι προνύμφες συλλέχθηκαν με ειδική απόχη και μεταφέρθηκαν σε δεξαμενή με καθαρό EW. Έγινε λήψη 10 προνυμφών σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία, στα 5, 10, 15, 30, 60 και 120 λεπτά. Οι προνύμφες που συλλέγονταν σε κάθε χρονικό σημείο θανατώνονταν με βύθιση σε νερό με πάγο και η συνολική διαδικασία της δειγματοληψίας και θανάτωσης δεν ξεπερνούσε το 1 λεπτό. Πριν την έναρξη της οξείας καταπόνησης, 10 προνύμφες από κάθε γενετική γραμμή συλλέχθηκαν προκειμένου να αποτελέσουν την ομάδα ελέγχου (0 min). Μετά τη θανάτωση, η κάθε προνύμφη μεταφέρθηκε σε πλαστικά erpendorfs και αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την ανάλυση προσδιορισμού της κορτιζόλης.

6.2.4. Προσδιορισμός Κορτιζόλης

Η διαδικασία εξαγωγής και προσδιορισμού της κορτιζόλης από τις προνύμφες έχει αναλυθεί στο κεφάλαιο 4 (σελ. 79).

6.2.5. Στατιστική ανάλυση

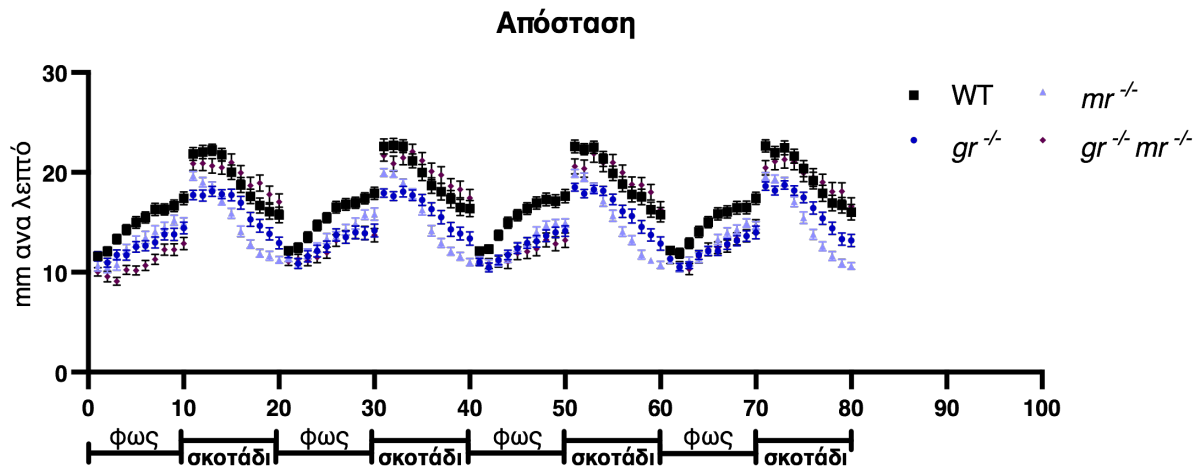
Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SigmaStat v3.1 (Jandel Scientific). Όλα τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου (S.E.M.). Αρχικά τα δεδομένα ελέγχθηκαν ως προς την κανονικότητα της κατανομής τους (normality) και την ισότητα των διασπορών τους (homogeneity), και σε περίπτωση που κρίθηκε αναγκαίο τροποποιήθηκαν λογαριθμικά. Σε περίπτωση πλήρωσης των δύο αυτών προϋποθέσεων, χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικά τεστ, ενώ σε περίπτωση μη πλήρωσης της κανονικότητας και ισότητας διασπορών οι αναλύσεις έγιναν με μη παραμετρικά τεστ. Τα συμπεριφορικά δεδομένα συνολικής απόστασης και θιγμοτακτικής συμπεριφοράς από τις φωτεινές και σκοτεινές περιόδους των δύο παραλλαγών του πειράματος 6.2.2.1. αναλύθηκαν με ανάλυση διασποράς για έναν παράγοντα (one – way ANOVA). Η απόκριση των προνυμφών σε κάθε μηχανική καταπόνηση στο πείραμα 6.2.2.2. μελετήθηκε στατιστικά με ανάλυση διασποράς για έναν παράγοντα. Ομοίως, και η ανάλυση των δεδομένων συγκέντρωσης κορτιζόλης από τις διαφορετικές χρονικές στιγμές της κάθε πειραματικής ομάδας έγινε με ανάλυση διασποράς για έναν παράγοντα. Στις περιπτώσεις των στατιστικά σημαντικών διαφορών ($P < 0.05$), η αναγνώριση των στατιστικά σημαντικών ομάδων έγινε με τους ελέγχους πολλαπλών συγκρίσεων Holm-Sidak's και Tukey's. Τα γραφήματα δημιουργήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Graph Pad Prism 6.03 (GraphPad Software, Inc, USA).

6.3. Αποτελέσματα

6.3.1. Κινητική απόκριση στην εναλλαγή φωτός - σκότους [alternating light- and dark- induced locomotor response (LMR – L/D)]

6.3.1.1. Πρωτόκολλο A (5% φωτεινότητα)

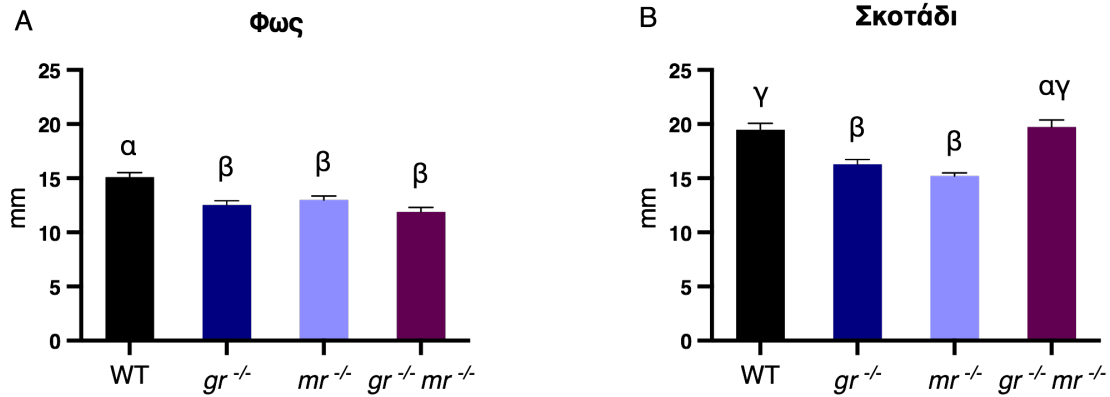
Η επίδραση του γενετικού χειρισμού στη συμπεριφορική απόκριση των προνυμφών στο στρες εκτιμήθηκε μέσω έκθεσής τους σε συνθήκες εναλλασσόμενου φωτισμού – σκοταδιού. Στο πρωτόκολλο A η ένταση του φωτισμού ήταν στο 5%, με την απόκριση των προνυμφών ανά λεπτό δοκιμασίας να απεικονίζεται στην **Εικόνα 6.1**.



Εικόνα 6.1 | Συμπεριφορικό προφίλ ανά λεπτό. Η μέση δραστηριότητα σε συνθήκες φωτός και σκοταδιού, με τη δραστηριότητα των 6 *drf* προνυμφών να εκφράζεται σε συνολική απόσταση (mm) ανά λεπτό. Οι τέσσερις πειραματικές ομάδες αντιστοιχούν στην ομάδα ελέγχου (αγρίου τύπου γραμμή – WT) και στις τρεις γενετικές γραμμές *gr*^{-/-}, *mr*^{-/-} και *gr*^{-/-}*mr*^{-/-}. Αποτυπώνονται 4 εναλλαγές φωτός (5%) – σκοταδιού των 10 λεπτών η κάθε μία. Το κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ± S.E.M. (*n* = 36 - 72 άτομα ανά ομάδα).

Οι προνύμφες των τριών γενετικών γραμμών παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στην απόκριση τους σε εναλλασσόμενες συνθήκες φωτισμού έντασης 5% (**Εικόνα 6.2**). Σε ό,τι αφορά τη συνολική απόσταση που διάνυσαν οι προνύμφες στις φωτεινές περιόδους της δοκιμασίας, οι προνύμφες αγρίου τύπου (15.11 ± 0.4 , *n* = 72) διάνυσαν σημαντικά μεγαλύτερη απόσταση σε σχέση και με τις τρεις γενετικές γραμμές που δοκιμάστηκαν (*gr*^{-/-}: 12.5 ± 0.4 , *n* = 36; *mr*^{-/-}: 13 ± 0.3 , *n* = 36; *gr*^{-/-}*mr*^{-/-}: 11.9 ± 0.4 , *n* = 48) ($H_{3,188} = 33.211$, *P* = < 0.001; **Εικόνα 6.2 A**). Επιπλέον, οι διαφορές που εντοπίστηκαν στη συνολική απόσταση που διάνυσαν οι προνύμφες στις σκοτεινές περιόδους του πρωτοκόλλου αποτυπώνονται στην **Εικόνα 6.2 B**, με τις προνύμφες *gr*^{-/-} (16.3 ± 0.4 , *n* = 36) και *mr*^{-/-} (15.2 ± 0.3 , *n* = 36) να διανύουν σημαντικά λιγότερη απόσταση σε σύγκριση με τις *gr*^{-/-}*mr*^{-/-} (19.7 ± 0.7 , *n* = 48) και αγρίου τύπου (19.5 ± 0.6 , *n* = 72) ($H_{3,188} = 45.332$, *P* = < 0.001).

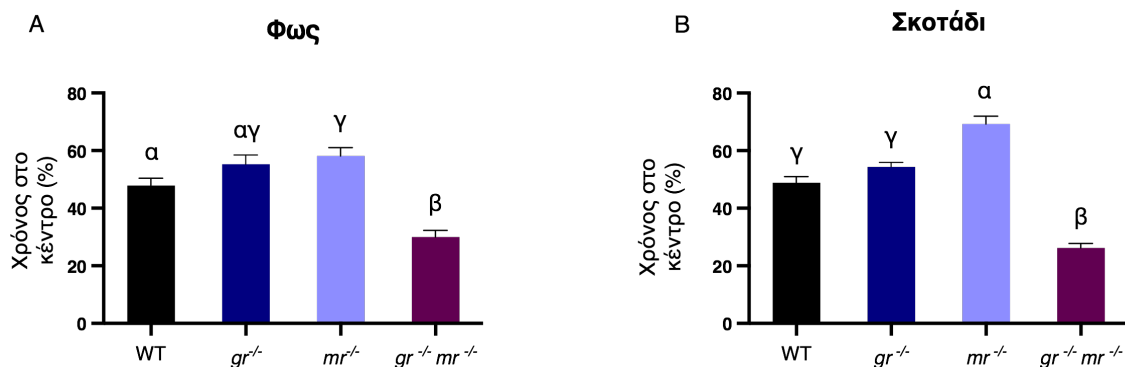
Απόσταση



Εικόνα 6.2 | Συνολική απόσταση στις συνθήκες φωτός (A) και σκοταδιού (B) (μέσος όρος \pm S.E.M. ($n = 36 - 72$ άτομα ανά ομάδα)). Οι τέσσερις πειραματικές ομάδες αντιστοιχούν στην ομάδα ελέγχου (αγρίου τύπου γραμμή - WT) και στις τρεις γενετικές γραμμές *gr*^{-/-}, *mr*^{-/-} και *gr*^{-/-}*mr*^{-/-}. Η κάθε ράβδος αντιπροσωπεύει την συνολική απόσταση που διάνυσαν οι πονύμφες της κάθε ομάδας στη συνολική διάρκεια φωτισμού (A) ή σκοταδιού (B). Η στατιστική ανάλυση έγινε με ανάλυση Kruskal - Wallis. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τεσσάρων γενετικών γραμμών.

Ο χρόνος που πέρασαν στο κέντρο της αρένας στο σύνολο των φωτεινών περιόδων ήταν σημαντικά χαμηλότερος για τις πονύμφες *gr*^{-/-}*mr*^{-/-} (30 ± 2.2 , $n = 48$) σε σύγκριση με τις πονύμφες αγρίου τύπου (47.8 ± 2.5 , $n = 48$), *gr*^{-/-} (55.3 ± 3.2 , $n = 36$) και *mr*^{-/-} (58.1 ± 2.9 , $n = 36$) ($F_{3,163} = 23.009$, $P < 0.001$; **Εικόνα 6.3 A**). Οι πονύμφες *mr*^{-/-} πέρασαν τον περισσότερο χρόνο στο κέντρο της αρένας, σημαντικά υψηλότερο από τις πονύμφες αγρίου τύπου ($P = 0.008$), αλλά όχι σημαντικά διαφορετικό από αυτόν των *gr*^{-/-}. Επιπλέον, οι πονύμφες *gr*^{-/-}*mr*^{-/-} (26.2 ± 1.6 , $n = 48$) πέρασαν τον σημαντικά χαμηλότερο χρόνο στο κέντρο της δεξαμενής στο σύνολο των σκοτεινών περιόδων ($F_{3,163} = 79.194$, $P < 0.001$; **Εικόνα 6.3 B**), τόσο σε σύγκριση με τις πονύμφες αγρίου τύπου (48.8 ± 2.1 , $n = 48$), όσο και με τις πονύμφες *gr*^{-/-} (54.3 ± 1.6 , $n = 36$) και *mr*^{-/-} (69.2 ± 2.7 , $n = 36$). Τέλος, οι πονύμφες *mr*^{-/-} πέρασαν σημαντικά υψηλότερο χρόνο στο κέντρο της δεξαμενής σε σύγκριση τόσο με τις πονύμφες αγρίου τύπου όσο και με τις πονύμφες *gr*^{-/-}.

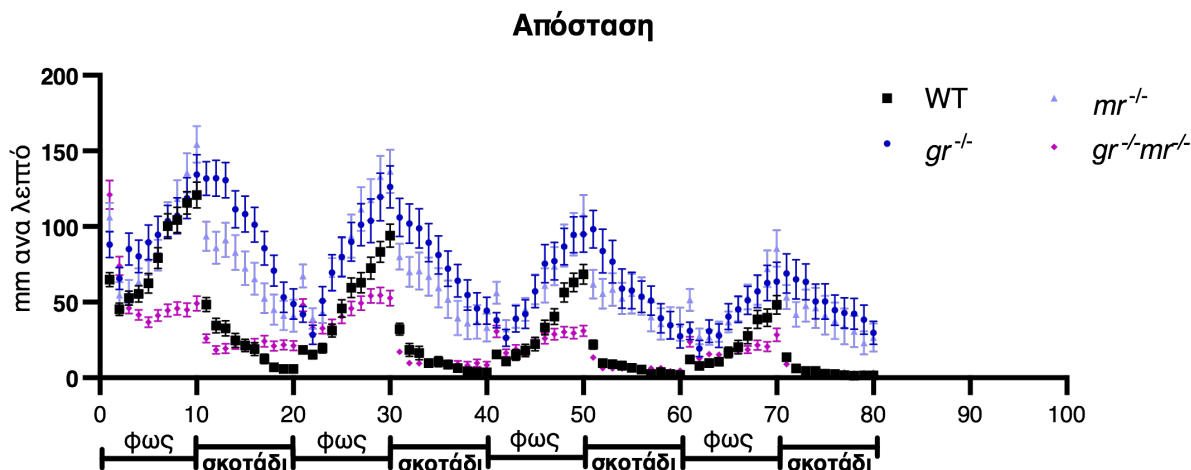
Θιγμοτακτική συμπεριφορά



Εικόνα 6.3 | Χρόνος που πέρασαν στο κέντρο της αρένας υπό συνθήκες φωτισμού (Α) και σκοταδιού (Β) (μέσος όρος ± S.E.M. ($n = 36 - 72$ άτομα ανά ομάδα). Οι τέσσερις πειραματικές ομάδες αντιστοιχούν στην ομάδα ελέγχου (αγρίου τύπου γραμμή – WT) και στις τρεις γενετικές γραμμές *gr*^{-/-}, *mr*^{-/-} και *gr*^{-/-}*mr*^{-/-}. Η κάθε ράβδος αντιπροσωπεύει τον σχετικό χρόνο (%) ως προς το σύνολο της δοκιμασίας που οι προυμφες της κάθε ομάδας πέρασαν στο κέντρο. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one – way ANOVA. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τεσσάρων γενετικών γραμμών.

6.3.1.2. Πρωτόκολλο Β (5% φωτεινότητα)

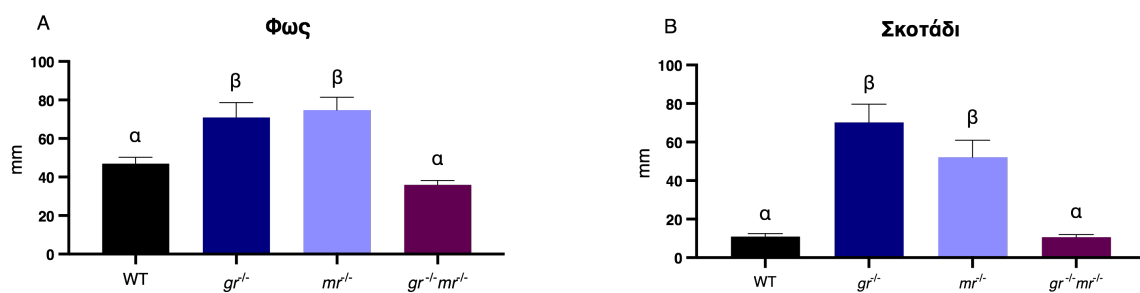
Η απόκριση των προυμφών των διαφορετικών γενετικών γραμμών στο πρωτόκολλο Β, με την ένταση του φωτισμού στο 100%, απεικονίζεται στην **Εικόνα 6.4**.



Εικόνα 6.4 | Συμπεριφορικό προφίλ ανά λεπτό. Η μέση δραστηριότητα σε συνθήκες φωτός και σκοταδιού, με τη δραστηριότητα των 6 drf προυμφών να εκφράζεται σε συνολική απόσταση (mm) ανά λεπτό. Οι τέσσερις πειραματικές ομάδες αντιστοιχούν στην ομάδα ελέγχου (αγρίου τύπου γραμμή – WT) και στις τρεις γενετικές γραμμές *gr*^{-/-}, *mr*^{-/-} και *gr*^{-/-}*mr*^{-/-}. Αποτυπώνονται 4 εναλλαγές φωτός (100%) – σκοταδιού των 10 λεπτών η κάθε μία. Το κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ± S.E.M. ($n = 30 - 72$ άτομα ανά ομάδα).

Η συνολική απόσταση που διάνυσαν οι προνούμφες $gr^{-/-}$ (71 ± 7.7 , $n = 30$) και $mr^{-/-}$ (74.7 ± 6.8 , $n = 48$) υπό συνθήκες φωτισμού ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με τις προνούμφες αγρίου τύπου (47 ± 3.3 , $n = 72$) και διπλού μεταλλάγματος (36 ± 2.3 , $n = 65$) ($H_{3,211} = 36.380$, $P = < 0.001$; **Εικόνα 6.5 A**). Ομοίως, η συνολική απόσταση που διάνυσαν οι προνούμφες $gr^{-/-}$ (70.3 ± 9.4 , $n = 30$) και $mr^{-/-}$ (52.1 ± 8.8 , $n = 48$) υπό συνθήκες σκοταδιού ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με τις προνούμφες αγρίου τύπου (11 ± 1.6 , $n = 72$) και διπλού μεταλλάγματος (10.7 ± 1.3 , $n = 65$) ($H_{3,211} = 73.652$, $P = < 0.001$; **Εικόνα 6.5 B**).

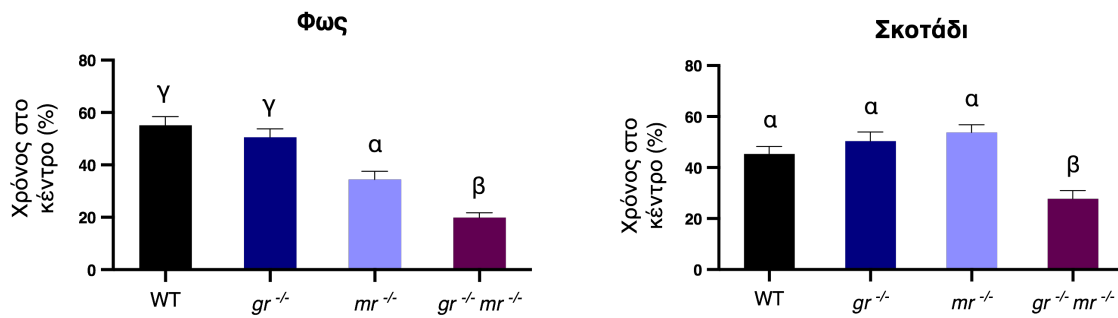
Απόσταση



Εικόνα 6.5 | Συνολική απόσταση στις συνθήκες φωτός (A) και σκοταδιού (B) (μέσος όρος \pm S.E.M. ($n = 30 - 72$ άτομα ανά ομάδα). Οι τέσσερις πειραματικές ομάδες αντιστοιχούν στην ομάδα ελέγχου (αγρίου τύπου γραμμή – WT) και στις τρεις γενετικές γραμμές $gr^{-/-}$, $mr^{-/-}$ και $gr^{-/-}mr^{-/-}$. Η κάθε ράβδος αντιπροσωπεύει τη συνολική απόσταση που διάνυσαν οι προνούμφες της κάθε ομάδας στη συνολική διάρκεια φωτισμού (A) ή σκοταδιού (B). Η στατιστική ανάλυση έγινε με την μη παραμετρική ανάλυση Kruskal - Wallis. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τεσσάρων γενετικών γραμμών.

Οι προνούμφες $gr^{-/-}mr^{-/-}$ (19.9 ± 1.8 , $n = 65$) πέρασαν το χαμηλότερο ποσοστό του χρόνου στο κέντρο της δεξαμενής όταν συνδυάστηκαν τα δεδομένα από όλες τις φωτεινές περιόδους ($H_{3,178} = 71.180$, $P = < 0.001$; **Εικόνα 6.6 A**). Δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των προνουμφών $gr^{-/-}$ (50.5 ± 3.2 , $n = 30$) και αγρίου τύπου (55.2 ± 3.2 , $n = 39$), ενώ οι προνούμφες $mr^{-/-}$ (34.4 ± 3.1 , $n = 48$) είχαν χαμηλότερο ποσοστό στο κέντρο συγκριτικά με τις προνούμφες WT και $gr^{-/-}$. Σε ό,τι αφορά το ποσοστό στο κέντρο της αρένας όταν συνδυάστηκαν τα δεδομένα από τις σκοτεινές περιόδους της δοκιμασίας, και πάλι οι προνούμφες $gr^{-/-}mr^{-/-}$ (27.8 ± 3.2 , $n = 65$) παρουσίασαν το χαμηλότερο ποσοστό ($H_{3,178} = 35.007$, $P = < 0.001$; **Εικόνα 6.6 B**).

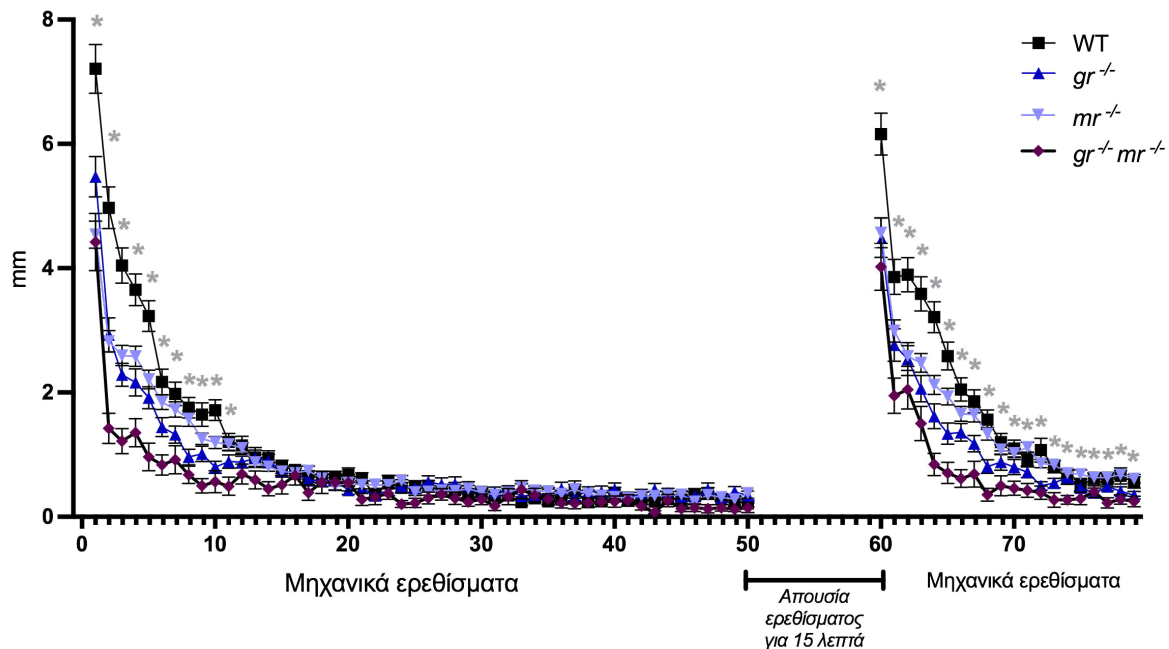
Θιγμοτακτική συμπεριφορά



Εικόνα 6.6| Χρόνος που πέρασαν στο κέντρο της αρένας υπό συνθήκες φωτισμού (Α) και σκοταδιού (Β) (μέσος όρος ± S.E.M. ($n = 30 - 72$ άτομα ανά ομάδα)). Οι τέσσερις πειραματικές ομάδες αντιστοιχούν στην ομάδα ελέγχου (αγρίου τύπου γραμμή – WT) και στις τρεις γενετικές γραμμές *gr*^{-/-}, *mr*^{-/-} και *gr*^{-/-}*mr*^{-/-}. Η κάθε ράβδος αντιπροσωπεύει τον σχετικό χρόνο (%) ως προς το σύνολο της δοκιμασίας που οι προνύμφες της κάθε ομάδας έμειναν στο κέντρο. Η στατιστική ανάλυση έγινε με την ανάλυση Kruskal – Wallis. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τεσσάρων γενετικών γραμμών.

6.3.2. Δοκιμασία απόκρισης σε μηχανική καταπόνηση (δόνηση) (Vibrational startle response assay (VSRA))

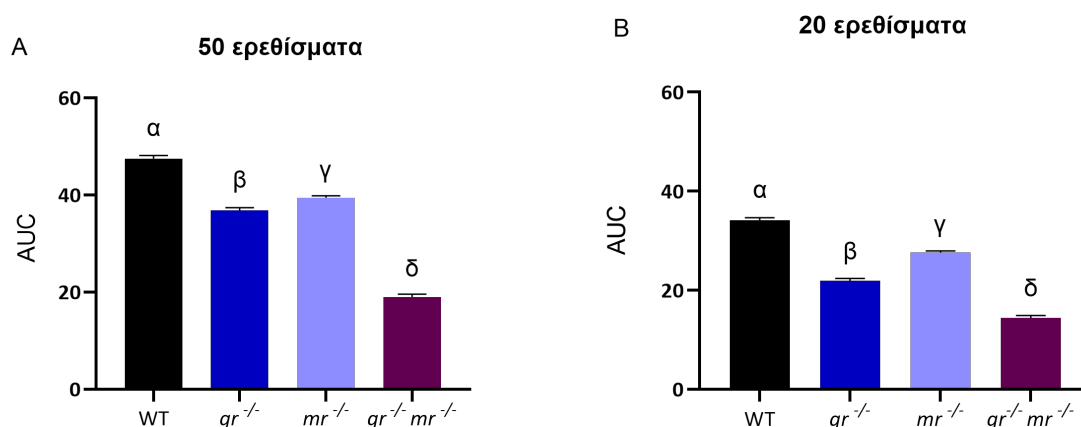
Η απόκριση των προνυμφών των τεσσάρων γενετικών γραμμών στη δοκιμασία απόκρισης σε μηχανική καταπόνηση, ως την απόσταση που διάνυσαν ύστερα από κάθε ερέθισμα δόνησης (Εικόνα 6.7).



Εικόνα 6.7| Συμπεριφορά αποφυγής των προνυμφών ως απόκριση στη δοκιμασία έκθεσης σε μηχανική καταπόνηση. Η απόσταση που διανύθηκε ύστερα από κάθε ερέθισμα δόνησης (tapping) στις προνύμφες αγρίου τύπου (WT), *gr*^{-/-}, *mr*^{-/-} και *gr*^{-/-}*mr*^{-/-}. Η κάθε ομάδα εκτέθηκε σε 50 δονήσεις με 1 s κενό μεταξύ τους, ενώ ύστερα από 15 λεπτά εκτέθηκαν σε δεύτερη αλληλουχία 20 δονήσεων. Η απόκριση των προνυμφών σε κάθε ερέθισμα αναλύθηκε με one – way ANOVA προκειμένου να εντοπιστούν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Το κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ± S.E.M. ($n = 48 - 144$ άτομα ανά ομάδα).

Στην **Εικόνα 6.8** αποτυπώνεται η area under the curve (AUC) για κάθε αλληλουχία μηχανικών καταπονήσεων διαφορετικών γενετικών γραμμών. Στην πρώτη αλληλουχία των 50 μηχανικών δονήσεων (tappings) οι προνύμφες $gr^{-/-}mr^{-/-}$ (19 ± 4.1 , $n = 35$) εμφάνισαν τη χαμηλότερη AUC σε σύγκριση με τις προνύμφες WT (47.5 ± 5.7 , $n = 72$), $gr^{-/-}$ (36.8 ± 5.1 , $n = 81$) και $mr^{-/-}$ (39.4 ± 5.1 , $n = 144$) ($F_{3,341} = 310.2$, $P < 0.001$; **Εικόνα 6.8 A**). Επιπλέον, οι προνύμφες WT είχαν την υψηλότερη AUC, ενώ οι προνύμφες $gr^{-/-}$ και $mr^{-/-}$ εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Στη δεύτερη αλληλουχία των 20 μηχανικών δονήσεων (tappings), οι προνύμφες $gr^{-/-}mr^{-/-}$ (54.3 ± 1.6 , $n = 36$) εμφάνισαν τη χαμηλότερη AUC σε σύγκριση με τις προνύμφες WT (47.5 ± 5.7 , $n = 72$), $gr^{-/-}$ (36.8 ± 5.1 , $n = 81$) και $mr^{-/-}$ (39.4 ± 5.1 , $n = 144$). Επιπλέον, οι προνύμφες WT είχαν την υψηλότερη AUC, ενώ οι προνύμφες $gr^{-/-}$ και $mr^{-/-}$ εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($F_{3,341} = 236.8$, $P < 0.001$; **Εικόνα 6.8 B**).

Εμβαδό κάτω από την καμπύλη (AUC)

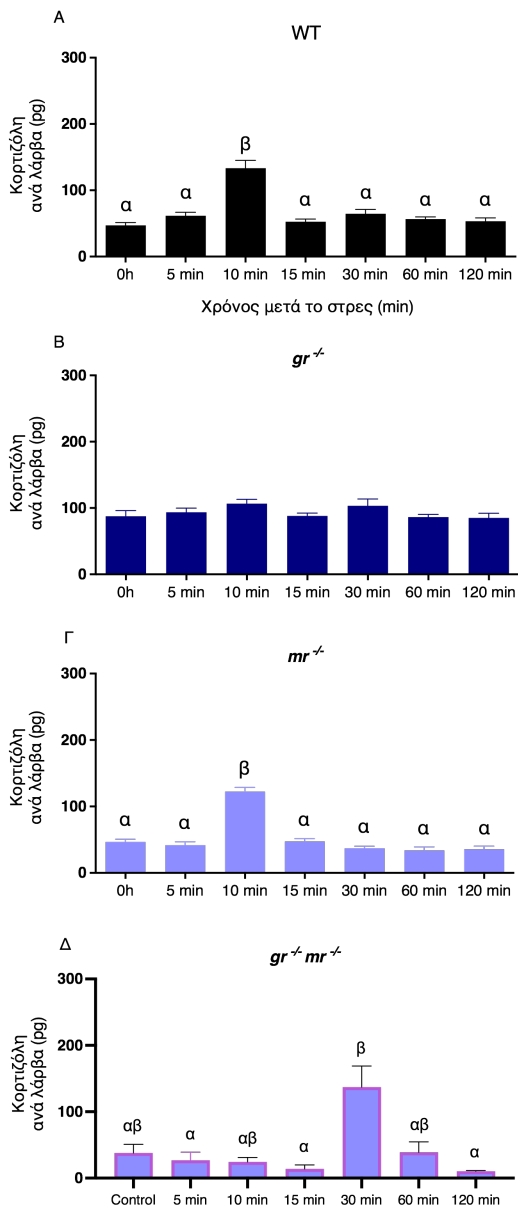


Εικόνα 6.8 | Area under the curve (AUC) που αντιστοιχούν στο γράφημα 6.11. Αποτυπώνεται η απόκριση κάθε γενετικής γραμμής στην αλληλουχία 50 (A) και 20 (B) ερεθισμάτων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών γενετικών γραμμών.

6.3.3. Κορτιζόλη

Το οξύ στρες είχε ως αποτέλεσμα μία σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση κορτιζόλης 10 λεπτά μετά την εφαρμογή του ερεθίσματος καταπόνησης στις προνύμφες αγρίου τύπου (133.4 ± 11.8 , $n = 10$) ($H_{6,63} = 30.949$, $P < 0.001$; **Εικόνα 6.9 A**). Στα 15 λεπτά, η συγκέντρωση της κορτιζόλης είχε επιστρέψει στα επίπεδα ηρεμίας (52.7 ± 3.9 , $n = 10$). Οι προνύμφες $gr^{-/-}$ δεν εμφάνισαν κάποια σημαντική αύξηση ως απόκριση στο οξύ στρες σε σχέση με τα επίπεδα ηρεμίας τους (87.7 ± 8.5 , $n = 10$; **Εικόνα 6.9 B**). Ομοίως με την ομάδα αγρίου τύπου, οι προνύμφες $mr^{-/-}$ αποκρίθηκαν με σημαντική αύξηση ($F_{6,63} = 43.671$, $P < 0.001$) στη συγκέντρωση κορτιζόλης τους στα 10 λεπτά μετά το στρες (122.5 ± 6.2 , $n = 10$), με άμεση επιστροφή στα επίπεδα ηρεμίας τους από τα 15 λεπτά ($47.4 \pm$

4.1, $n = 10$; **Εικόνα 6.9 Γ**). Οι προνύμφες $gr^{-/-} mr^{-/-}$ εμφάνισαν στατιστικά σημαντική αύξηση ($H_{6,60} = 15.71, P = 0.015$) της συγκέντρωσης κορτιζόλης τους στα 30 λεπτά μετά το στρες ($110 \pm 30.9, n = 10$) και επανήλθαν στα επίπεδα ηρεμίας τους στις 2 ώρες μετά το στρες ($10.2 \pm 1, n = 8$) (**Εικόνα 6.9 Δ**).



Εικόνα 6.9 | Μοτίβο συγκέντρωσης κορτιζόλης ύστερα από έκθεση σε οξύ στρες στις προνύμφες zebrafish αγρίου τύπου (A), $gr^{-/-}$ (B) και $mr^{-/-}$ (Γ) και $gr^{-/-} mr^{-/-}$ (Δ). Η κάθε ράβδος υποδηλώνει τον μέσο όρο \pm S.E.M. ($n = 6 - 10$). Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών χρονικών σημείων.

6.4. Συζήτηση

Η ένταση του φωτός φάνηκε πως ασκεί ισχυρή επίδραση στην κινητική απόκριση των προνυμφών στα πλαίσια της δοκιμασίας εναλλαγής φωτός σκότους. Στο πρωτόκολλο A, με την ένταση φωτός να είναι στο 5%, οι προνύμφες και των τεσσάρων γενετικών γραμμών εμφάνισαν έναν συμπεριφορικό φαινότυπο που συμφωνεί με τα μέχρι τώρα δημοσιευμένα δεδομένα. Στην κάθε φωτεινή περίοδο οι προνύμφες αύξαναν σταδιακά την κινητική τους δραστηριότητα, ενώ με την κάθε μετάβαση σε σκοτεινή περίοδο, η κινητικότητά τους εμφάνιζε μία ξαφνική, ταχεία αύξηση, η οποία μειωνόταν σταδιακά με το πέρασμα των λεπτών. Όντως, εναλλασσόμενες φωτεινές και σκοτεινές περιόδους προκαλούν ένα σταθερό μοτίβο κινητικής απόκρισης στις προνύμφες, όπως ακριβώς παρατηρήθηκε στο πρωτόκολλο A (Irons *et al.*, 2010).

Επιπλέον, στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο οι προνύμφες διατήρησαν μία σταθερότητα στην απόκρισή τους ανά περίοδο, δεν παρατηρήθηκε δηλαδή κάποια μείωση στην κινητική απόκριση στα εναλλασσόμενα ερεθίσματα με το πέρασμα του χρόνου. Οι προνύμφες $gr^{-/-}$, $mr^{-/-}$ και $gr^{-/-} mr^{-/-}$ είχαν σημαντικά χαμηλότερη απόκριση στο φως, δηλαδή στην ηρεμία, σε σύγκριση με τις προνύμφες αγρίου τύπου (WT). Σε ό,τι αφορά την απόκριση των προνυμφών στο σκοτάδι, οι WT και $gr^{-/-} mr^{-/-}$ προνύμφες εμφάνισαν σε κάθε σκοτεινή περίοδο υψηλότερη κινητικότητα σε σύγκριση με τα άτομα των ομάδων $gr^{-/-}$ και $mr^{-/-}$.

Τέλος, υπό σκοτεινές συνθήκες, η ομάδα των διπλών μεταλλαγμάτων εμφάνισε την εντονότερη θιγμοτακτική συμπεριφορά, καθώς πέρασε τον λιγότερο χρόνο στο κέντρο της αρένας. Η θιγμοτακτική συμπεριφορά φαίνεται πως αναπτύσσεται νωρίς στην ανάπτυξη των οργανισμών και πως εκφράζεται στις προνύμφες με τρόπο όμοιο των ενηλίκων (Buske and Gerlai, 2012). Χαρακτηρίζεται ως μία αγχώδους τύπου συμπεριφορά, καθώς η αγχογενής καφεΐνη την ενισχύει, ενώ το αγχολυτικό διαζεπάμη τη μειώνει. Το γεγονός πως η γραμμή των διπλών μεταλλαγμάτων είχε σημαντικά μεγαλύτερη θιγμοτακτική συμπεριφορά υπό σκοτεινές συνθήκες ενδεχομένως υπογραμμίζει έναν έντονα αγχώδη φαινότυπο σε αυτές τις προνύμφες και μία καθυστέρηση στην προσαρμογή σε νέα περιβάλλοντα.

Στη φύση, η ικανότητα ανίχνευσης μεταβολών στη φωτεινότητα αποτελεί ένα εξελικτικό πλεονέκτημα, το οποίο διευκολύνει τα άτομα στην εύρεση ενός φωτεινού και ασφαλούς περιβάλλοντος για την αναζήτηση τροφής και την αποφυγή θηρευτών (Burgess and Granato, 2007; Emran *et al.*, 2008). Η ικανότητα αυτή είναι ακόμα πιο σημαντική σε είδη με ημερήσια δραστηριότητα, όπως ακριβώς το zebrafish, όπου οι προνύμφες τους είναι πιο ευάλωτες σε θηρευτές. Σύμφωνα με αυτή τη θεώρηση, η παροδική συμπεριφορική υπερδραστηριότητα ύστερα από μία ξαφνική μετάβαση σε σκοτάδι θεωρείται πως διευκολύνει την ταχεία επιστροφή της προνύμφης σε ένα καλά φωτιζόμενο περιβάλλον (MacPhail *et al.*, 2009). Μία ξαφνική μετάβαση από

το φως στο σκοτάδι υπό εργαστηριακές συνθήκες μιμείται μία συνθήκη στη φύση όπου η προνύμφη κολυμπάει ξαφνικά κάτω από ένα βράχο ή σκιάζεται από έναν εναέριο θηρευτή. Η αύξηση τότε της κινητικής δραστηριότητας και της θιγμοτακτικής συμπεριφοράς, στοχεύει σε αποφυγή αυτών των συνθηκών. Συμπερασματικά, τα σκοτεινά περιβάλλοντα και η ξαφνική έκθεση στο σκοτάδι αντιπροσωπεύουν απεχθείς συνθήκες ή αγχογενή ερεθίσματα, τα οποία πυροδοτούν αγχώδεις συμπεριφορές στις προνύμφες σε εργαστηριακά ελεγχόμενες συνθήκες. Αντιθέτως, η κάθε φωτεινή περίοδος θεωρείται μία περίοδος ηρεμίας και ελεύθερης εξερεύνησης της αρένας (Schnörr *et al.*, 2012).

Με βάση μόνο την κινητικότητα των προνυμφών, οι ομάδες αγρίου τύπου και διπλών μεταλλαγμάτων εμφάνισαν την πιο έντονη κινητικότητα στην κάθε σκοτεινή περίοδο, μία συμπεριφορά η οποία μπορεί να ερμηνευτεί ενδεχομένως ως δείγμα αυξημένου στρες σε σύγκριση με τις προνύμφες *gr^{-/-}* και *mr^{-/-}*. Όταν όμως στην ανάλυση συμπεριλαμβάνεται και η θιγμοτακτική συμπεριφορά, οι δύο ομάδες διαφοροποιούνται σημαντικά, καθώς φαίνεται πως η ομάδα αγρίου τύπου, με τη μειωμένη θιγμοτακτική της συμπεριφορά, έχει σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα στρες από τα άτομα διπλού μεταλλάγματος.

Στο πρωτόκολλο Β οι προνύμφες εκτέθηκαν σε εναλλασσόμενες περιόδους φωτός και σκότους, με την ένταση του φωτός να είναι στο 100%. Το μοτίβο απόκρισης που παρατηρήθηκε είναι αντίθετο με τις παρατηρήσεις της βιβλιογραφίας, αλλά και με τα δεδομένα από την έκθεση στο πρωτόκολλο Α. Στο σύνολο της δοκιμασίας, όλες οι γενετικές γραμμές είχαν μικρότερα επίπεδα κινητικότητας σε σύγκριση με την απόκρισή τους στη χαμηλότερη ένταση φωτός. Επιπλέον, μία διακριτή διαφορά ήταν πως όλες οι ομάδες εκδήλωσαν χαμηλότερη κινητικότητα στο σκοτάδι από ό,τι στο φως. Με τη μετάβαση από το φως στο σκοτάδι, οι προνύμφες εμφάνιζαν σημαντική μείωση της κινητικότητάς τους, μέχρι το σημείο επαναφοράς του φωτός όπου και η κινητικότητα ξεκινούσε και πάλι να αυξάνεται. Πιο συγκεκριμένα, οι προνύμφες αγρίου τύπου μείωναν σημαντικά την κινητικότητά τους σε κάθε σκοτεινή περίοδο, ενώ οι προνύμφες *gr^{-/-} mr^{-/-}* είχαν γενικότερη μειωμένη απόκριση στις εναλλαγές φωτός σκοταδιού. Αντίθετα, οι προνύμφες *gr^{-/-}* και *mr^{-/-}* εμφάνισαν μία απόκριση με μεγάλη ομοιότητα, με σημαντικά υψηλότερη κινητικότητα στις σκοτεινές περιόδους σε σύγκριση τόσο με τα WT όσο και με τα *gr^{-/-} mr^{-/-}*. Τέλος, η κινητική απόκριση φάνηκε να μειώνεται συνολικά με το πέρασμα του χρόνου, δεν παρατηρήθηκε δηλαδή η ίδια σταθερότητα στο επίπεδο απόκρισης που εκδηλώθηκε στο πρωτόκολλο Α.

Σε ό,τι αφορά τη θιγμοτακτική συμπεριφορά των προνυμφών, οι προνύμφες των διπλών μεταλλαγμάτων είχαν και εδώ τη μεγαλύτερη θιγμόταξη στο σύνολο των σκοτεινών περιόδων, καθώς περνούσαν το μικρότερο μέρος του χρόνου τους στο κέντρο της κάθε αρένας. Στις υπόλοιπες γενετικές γραμμές δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά στη θιγμοτακτική συμπεριφορά

κατά τη διάρκεια των σκοτεινών περιόδων. Σε ό,τι αφορά τις φωτεινές περιόδους της δοκιμασίας, κι εδώ οι προνύμφες *gr^{-/-}* *mr^{-/-}* είχαν τη μεγαλύτερη θιγμότητα, ενώ η μικρότερη θιγμοτακτική συμπεριφορά παρατηρήθηκε στα άτομα αγρίου τύπου και στα *gr^{-/-}*.

Αύξηση στη δραστηριότητα ως αποτέλεσμα της ξαφνικής σκοτεινής συνθήκης μπορεί να σχετίζεται έμμεσα με την ενεργότητα του άξονα HPI (Fernandes *et al.*, 2012), καθώς η υπερδραστηριότητα που παρατηρείται κατά τη μετάβαση από φως σε σκοτάδι αποδίδεται σε αυξημένο στρες και επίπεδα άγχους (MacPhail *et al.*, 2009; Irons *et al.*, 2010). Η σημαντικά μεγαλύτερη κινητικότητα των προνυμφών *gr^{-/-}* και *mr^{-/-}* σε σύγκριση με τις άλλες δύο ομάδες, αποτελεί ενδεχομένως παράγωγο της αυξημένης ενεργότητας του HPI άξονα υπό συνθήκες πολύ έντονου φωτισμού.

Οι Vijayan *et al.* (2018) έδειξαν πως οι προνύμφες με απώλεια των Gr και Mr είχαν διαφορετική συμπεριφορά στις εναλλαγές φωτός σκότους σε σύγκριση με τις προνύμφες αγρίου τύπου. Παρατήρησαν χαμηλότερη θιγμότητα στις προνύμφες *mr^{-/-}*, οδηγώντας στην υπόθεση πως ο κύριος ρυθμιστής της συγκεκριμένης συμπεριφοράς είναι ο Gr. Παρ' όλα αυτά το μοτίβο κίνησης που εμφάνισαν οι προνύμφες όλων των γενετικών γραμμών δε συμφωνεί με κανένα από τα δικά μας πειράματα. Στο πείραμά τους, οι προνύμφες αύξαναν σταδιακά την κινητικότητά τους στην κάθε σκοτεινή περίοδο και όχι απότομα όπως σε όλες τις υπόλοιπες δημοσιεύσεις που έχουμε αναφέρει, αλλά και στο δικό μας πρωτόκολλο A. Οι προνύμφες *gr^{s357/s357}* επιδεικνύουν χαμηλότερη ενεργητικότητα και κινητικότητα σε σύγκριση με τις προνύμφες αγρίου τύπου στην ηλικία των 6 dpf (Griffiths *et al.*, 2012). Οι Sireeni *et al.* (2020) εκτίμησαν το ρόλο του Gr στις αγχώδους τύπου συμπεριφορές των προνυμφών zebrafish χρησιμοποιώντας τη *gr^{s357}* γενετική γραμμή. Παρατηρήθηκε μειωμένη κινητικότητα υπό συνθήκες ηρεμίας σε σύγκριση με τις προνύμφες αγρίου τύπου, χωρίς όμως να εντοπιστεί κάποια διαφορά ύστερα από έκθεση σε σκοτάδι ή μηχανικό ερέθισμα (Sireeni *et al.*, 2020).

Γενικά είναι περιορισμένες οι μελέτες οι οποίες παρατηρούν διαφορετικό μοτίβο απόκρισης σε δοκιμασία εναλλαγής φωτός σκοταδιού, όσοι διαφορετικοί πειραματικοί σχεδιασμοί κι αν εφαρμόζονται. Προνύμφες που εκτέθηκαν σε έναν ανταγωνιστή των υποδοχέων GABA (PTZ) εμφάνισαν ένα αντεστραμμένο μοτίβο απόκρισης σε εναλλασσόμενα φωτεινά ερεθίσματα (Peng *et al.*, 2016), όπως επίσης έκθεση σε μυκοτοξίνες είχε ως αποτέλεσμα ένα συμπεριφορικό φαινότυπο αντεστραμμένο στη συγκεκριμένη δοκιμασία (Juan-García *et al.*, 2021). Είναι πολλοί οι παράγοντες εκείνοι που ασκούν σημαντική επιρροή στη συμπεριφορική απόκριση των προνυμφών zebrafish υπό τέτοιες εργαστηριακές συνθήκες, μεταξύ αυτών η ηλικία των προνυμφών, πιθανές δυσμορφίες, η ώρα στην οποία γίνεται η δοκιμασία, το πιάτο ή δεξαμενή η οποία χρησιμοποιείται και φυσικά οι συνθήκες φωτισμού που επιλέγονται (Padilla *et al.*, 2011). Δυστυχώς, είναι περιορισμένες οι

λεπτομέρειες που δίνονται για τις συνθήκες του κάθε πειράματος, και συγκεκριμένα της έντασης της φωτεινότητας σε αυτού του είδους τη δοκιμασία. Αν και οπτικά καθοδηγούμενες συμπεριφορές, συμπεριλαμβανομένης και της οπτοκινητικής απόκρισης και θήρευσης, έχουν εξεταστεί εκτενώς στο zebrafish (Neuhass, 2003), ξέρουμε πολύ λίγα για το πώς ισχυρές αλλαγές στις συνθήκες φωτεινότητας μπορεί να επιδράσουν στην προνυμφική συμπεριφορά.

Η αντίθεση μεταξύ σκοταδιού και φωτός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε αυτού του είδους τις αγχώδεις συμπεριφορές του zebrafish, καθώς πειραματικός σχεδιασμός που μείωσε την αντίθεση και την ένταση του σκοταδιού άσκησε μία δράση παρόμοια με αυτή των αγχολυτικών ουσιών (Steenbergen *et al.*, 2011a; Schnörr *et al.*, 2012). Επιπλέον, έχει φανεί πως η συμπεριφορική απόκριση των προνυμφών επηρεάζεται σημαντικά από τη διάρκεια των φωτεινών και σκοτεινών περιόδων (MacPhail *et al.*, 2009). Εκτός των άλλων, η διάρκεια της φωτεινής περιόδου επηρέασε σημαντικά την ένταση της αύξησης της δραστηριότητας που παρατηρείται με την επάνοδο του σκότους. Αποτελεί επομένως ασφαλή υπόθεση το να θεωρήσουμε την ένταση φωτός που χρησιμοποιήθηκε στο πρωτόκολλο B ένα πολύ ισχυρό ερέθισμα καταπόνησης. Με βάση αυτό, η απόκριση των προνυμφών στο πρωτόκολλο B αντικατοπτρίζει την έκθεση σε ένα πρωτόκολλο ισχυρού και επαναλαμβανόμενου οξέος στρες. Οι Griffiths *et al.* (2012) παρατήρησαν πως η αυθόρμητη κινητικότητα προνυμφών $gr^{-/-}$ είναι χαμηλότερη από αυτή των προνυμφών αγρίου τύπου, ενώ η απόκρισή τους σε ένα ξαφνικό στρεσογόνο ερέθισμα είναι υψηλότερη. Οι προνύμφες $gr^{-/-}$ και $mr^{-/-}$ είχαν όντως σημαντικά υψηλότερη κινητικότητα στο πρωτόκολλο B σε σύγκριση με τις προνύμφες αγρίου τύπου και διπλών μεταλλαγμάτων. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να σχετίζεται με αυξημένη ενεργότητα του άξονα HPI, καθώς χορήγηση κορτιζόλης για 24 ώρες σε προνύμφες ηλικίας 3 dpf είχε ως αποτέλεσμα αύξηση της κινητικότητάς τους σε δοκιμασία εναλλαγής φωτός σκότους (Best and Vijayan, 2018). Το γεγονός όμως πως οι προνύμφες $gr^{-/-}$ και $mr^{-/-}$ δεν εμφάνισαν αυτή τη συμπεριφορά και στο πρωτόκολλο A, εξηγείται ενδεχομένως τόσο από τον χαρακτήρα ήπιας καταπόνησης του πειραματικού σχεδιασμού όσο και από πιθανά προβλήματα στην οπτική επεξεργασία των ερεθισμάτων. Οι Muto *et al.* (2013) εντόπισαν στον αμφιβληστροειδή των gr^{s357} προνυμφών προβλήματα στην προσαρμογή στο φως καθώς παρουσιάζουν συμπεριφορική καθυστέρηση όταν ξαφνικά επανεκτίθενται στο φως ύστερα από μία σκοτεινή περίοδο. Επίσης εντοπίστηκαν και αλλαγές στη γενετική έκφραση του ντοπαμινεργικού σηματοδοτικού άξονα, ένα νευρορυθμιστή κλειδί για το δίκτυο του αμφιβληστροειδούς. Επιπλέον, μετάλλαξη στο γονίδιο για τον Mr στο ιαπωνικό ρυζόψαρο προκάλεσε αλλοίωση της κινητικής απόκρισης σε οπτικά ερεθίσματα (Sakamoto *et al.*, 2016).

Στη δοκιμασία απόκρισης σε μηχανική καταπόνηση, οι προνύμφες των τριών γενετικών γραμμών αποκρίθηκαν με σημαντικά χαμηλότερη κινητικότητα σε σύγκριση με την ομάδα αγρίου τύπου. Το

πρωτόκολλο δεν προκάλεσε εξουθένωση σε καμία από τις τέσσερις πειραματικές ομάδες στις οποίες εφαρμόστηκε, καθώς στη δεύτερη αλληλουχία ερεθισμάτων όλες οι προνύμφες διατήρησαν παρόμοιο μοτίβο αντίδρασης με την πρώτη τους απόκριση. Η συμπεριφορική απόκριση των προνυμφών WT ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με την απόκριση των προνυμφών των τριών μεταλλαγμάτων από το πρώτο μηχανικό ερέθισμα της πειραματικής διάταξης, διαφοροποίηση η οποία επαναλήφθηκε και στο πρώτο ερέθισμα της δεύτερης αλληλουχίας. Επιπλέον, τα άτομα των ομάδων $gr^{-/}$, $mr^{-/}$ και $gr^{-/}mr^{-/}$ εμφάνισαν μεγαλύτερη προσαρμοστική ικανότητα ή αλλιώς εξοικείωση (habituation) όπως φαίνεται από τις χαμηλότερες τιμές AUC και για τις δύο αλληλουχίες μηχανικών ερεθισμάτων στις οποίες εκτέθηκαν. Συγκεκριμένα, οι προνύμφες $gr^{-/}mr^{-/}$ εμφάνισαν τη μεγαλύτερη προσαρμοστική ικανότητα, ενώ τη μικρότερη εμφάνισαν οι προνύμφες αγρίου τύπου.

Ένα ερέθισμα του περιβάλλοντος το οποίο επαναλαμβάνεται περιοδικά, αλλά δεν ακολουθείται από κάποιο δυσάρεστο γεγονός ή ερέθισμα, θα αρχίσει σταδιακά να λαμβάνει ασθενέστερη απόκριση από τους οργανισμούς που υποβάλλονται σε αυτή τη δοκιμασία (Kandel, 1991). Αυτό το φαινόμενο αποτελεί τη διαδικασία που ονομάζεται εξοικείωση ή προσαρμογή (habituation) και η οποία αποτελεί ένα είδος μη συνειρμικής άδηλης μάθησης. Το γεγονός πως και οι τρεις γενετικές γραμμές εμφάνισαν μία πιο ταχεία εξοικείωση στην αλληλουχία των ερεθισμάτων μπορεί να αντανakλά μία κατάσταση οξυμένης εγρήγορσης και ετοιμότητας αλλά και πιθανά προβλήματα μνήμης (Best *et al.*, 2008). Η συμπεριφορά η οποία ποσοτικοποιείται στη συγκεκριμένη δοκιμασία αποτελεί μία απόκριση αιφνιδιασμού και χαρακτηρίζεται από μεγάλη πλαστικότητα. Η συγκεκριμένη συμπεριφορική απόκριση μπορεί να ενισχυθεί υπό συνθήκες φόβου, άγχους και στρες, ενώ η συνεχής έκθεση σε ένα ερέθισμα αιφνιδιασμού μπορεί τελικά να φέρει εξοικείωση (Grillon, 2008; Dreissen *et al.*, 2012). Αδυναμία προσαρμογής της έντασης της απόκρισης αιφνιδιασμού έχει συνδεθεί με πολλές αγχώδεις διαταραχές. Παρ' όλα αυτά πρέπει να διαχωριστεί η εκδήλωση φόβου απέναντι σε μία πιθανή απειλή και το διαρκές άγχος από τον προσωρινό αβέβαιο κίνδυνο (Grillon, 2008).

Ένας μεγάλος αριθμός νευροδραστικών ουσιών έχει χρησιμοποιηθεί προκειμένου να δοκιμαστεί η επίδραση τους στη συμπεριφορά απόκρισης προνυμφών τελεόστεων σε ερεθίσματα είτε ακουστικά (Carlson *et al.*, 1998) είτε μηχανικά (Faucher *et al.*, 2006; Painter *et al.*, 2009; Rice *et al.*, 2011). Τα αποτελέσματα από το σύνολο αυτών των μελετών δείχνουν πως κάποιες ουσίες έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση της έντασης απόκρισης στα ερεθίσματα, ενώ κάποιες άλλες την αύξηση. Φαρμακολογικοί χειρισμοί με χειριστές του χολινεργικού συστήματος, όπως έκθεση των προνυμφών σε donepezil (donepezil), ουσία που αποτελεί αναστολέα της ακετυλοχολινεστεράσης, αυξάνει την κινητικότητα των προνυμφών σε αυτή τη δοκιμασία καθώς και την προσαρμοστική τους ικανότητα (Faria *et al.*, 2019b). Παρόμοια δράση παρατηρήθηκε να έχει και ένας ρυθμιστής του σεροτονεργικού

συστήματος, ο PCPA, ο οποίος αποτελεί αναστολέα της υδροξυλάσης της τρυπτοφάνης, ένζυμο απαραίτητο για τη σύνθεση της σεροτονίνης. Αντίθετα, προνύμφες οι οποίες εκτέθηκαν σε φλουοξετίνη και δεπρενύλη, έναν αναστολέα της μονοαμινοοξειδάσης τύπου Β (MAO – Β) που χρησιμοποιείται και ως αντικαταθλιπτικό, παρουσίασαν μειωμένη κινητική απόκριση και αυξημένη εξοικείωση στα επαναλαμβανόμενα μηχανικά ερεθίσματα.

Η παρατήρηση πως και οι τρεις γενετικές γραμμές με μετάλλαξη στους υποδοχείς των γλυκοκορτικοστεροειδών εμφάνισαν μία διαταραγμένη ένταση απόκρισης στα μηχανικά ερεθίσματα αλλά και στο επίπεδο εξοικείωσής τους, υποδηλώνει πως οι υποδοχείς των γλυκοκορτικοστεροειδών διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενεργότητας των νευρώνων Mauthner (Medan and Preuss, 2014). Εξάλλου, η κορτιζόλη φαίνεται πως παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διεγερσιμότητα των συγκεκριμένων νευρώνων, όπως φάνηκε από τη μελέτη του νευρωνικού δικτύου της συμπεριφοράς αιφνιδιασμού στο χρυσόψαρο (Bronson and Preuss, 2017).

Τα πειράματά μας έδειξαν αυξημένη συγκέντρωση κορτιζόλης στις προνύμφες $gr^{-/-}$ και αδυναμία ενεργοποίησης του άξονα HPI ως απόκριση σε στρεσογόνο χειρισμό. Αυτή η απουσία απόκρισης στο στρες δεν παρατηρήθηκε στις προνύμφες των υπόλοιπων γενετικών γραμμών που μελετήθηκαν. Αντιθέτως, οι προνύμφες WT εμφάνισαν μία αύξηση της συγκέντρωσης κορτιζόλης ως απόκριση στο στρες στα 10 λεπτά, όπως ακριβώς και οι προνύμφες $mr^{-/-}$. Οι προνύμφες $gr^{-/-}mr^{-/-}$ εμφάνισαν μία αύξηση στη συγκέντρωση της κορτιζόλης στα 30 λεπτά ύστερα από την έκθεση στη καταπόνηση. Σε ό,τι αφορά στα επίπεδα ηρεμίας, δεν εντοπίστηκε κάποια διαφορά στη συγκέντρωση κορτιζόλης μεταξύ των προνυμφών αγρίου τύπου, $mr^{-/-}$ και $gr^{-/-}mr^{-/-}$.

Η κορτιζόλη αποτελεί το κυρίαρχο γλυκοκορτικοστεροειδές στους τελεόστεους και παράγεται ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης – μεσενέφρου (HPI), ο οποίος είναι ανάλογος του άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης – επινεφριδίων (HPA) των ανώτερων σπονδυλωτών (Wendelaar Bonga, 1997). Τα επινεφρίδια δεν υπάρχουν ως ξεχωριστοί αδένες στους τελεόστεους, και τα μεσονεφρικά κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή γλυκοκορτικοστεροειδών στους τελεόστεους βρίσκονται διάσπαρτα πάνω στην περιοχή του νεφρού. Η CRH αποτελεί την πρώτη ορμόνη στο μονοπάτι του άξονα HPI, η οποία εκκρίνεται από τον υποθάλαμο, και ενεργοποιεί την έκκριση της POMC από την υπόφυση. Η POMC αποτελεί ένα πρόδρομο μόριο το οποίο τελικά μετατρέπεται σε ACTH και προσδέεται στον υποδοχέα μελανοκορτίνης στα μεσονεφρικά κύτταρα, προκαλώντας τη στεροειδογένεση και την ανάλογη αύξηση στην παραγωγή της κορτιζόλης (Moon, 2001).

Η σίγαση του γονιδίου για τον υποδοχέα Gr έχει ως αποτέλεσμα υπερκορτιζολαιμία σε προνύμφες και ενήλικα zebrafish (Griffiths *et al.*, 2012; Ziv *et al.*, 2012; Sireeni *et al.*, 2020), αλλά και αύξηση της κορτικοστερόνης σε μοντέλα επιλεκτικής σίγασης σε μύες (Schmidt *et al.*, 2009). Τα αποτελέσματα

από την απόκριση των προνυμφών $gr^{-/-}$ σε οξεία καταπόνηση συμφωνούν τόσο με τη βιβλιογραφία όσο και με τα δεδομένα από τη συγκέντρωση της κορτιζόλης στο κεφάλαιο 4. Επιβεβαιώνεται η αδυναμία εκκίνησης μίας απόκρισης των γλυκοκορτικοστεροειδών στην καταπόνηση, ενώ η διαρκώς αυξημένη συγκέντρωση κορτιζόλης φωτίζει τον σημαντικό ρόλο του Gr στον μηχανισμό αρνητικής ανάδρασης του άξονα HPI.

Από την άλλη, σε συνθήκες ηρεμίας η συγκέντρωση της κορτιζόλης σε προνύμφες $mr^{-/-}$ δεν παρουσίασε κάποια διαφορά από τις προνύμφες αγρίου τύπου. Σύμφωνα με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, η μετάλλαξη προκαλεί μία καθυστέρηση στην απόκριση της κορτιζόλης, χωρίς όμως να επηρεάζει την ένταση της απόκρισης (Faught and Vijayan, 2018), υπογραμμίζοντας τη συμμετοχή του υποδοχέα Mr στη ρύθμιση της απόκρισης του HPI άξονα στην καταπόνηση. Στα αποτελέσματά μας δεν εντοπίστηκε κάποια καθυστέρηση στην απόκριση των $mr^{-/-}$ στην καταπόνηση, καθώς η μέγιστη συγκέντρωση κορτιζόλης ήταν στα 10 λεπτά όπως και στις προνύμφες αγρίου τύπου. Παρ' όλα αυτά, η καθυστέρηση στην απόκριση εντοπίστηκε στα διπλά μεταλλάγματα, όπου η μέγιστη συγκέντρωση της κορτιζόλης ήταν στα 30 λεπτά ύστερα από έκθεση σε οξύ στρες. Το γεγονός πως προνύμφες με μετάλλαξη και στους δύο υποδοχείς γλυκοκορτικοστεροειδών δεν παρουσιάζουν αυξημένη συγκέντρωση κορτιζόλης αλλά εμφανίζουν καθυστέρηση στην ενεργοποίηση του άξονα HPI, υποδηλώνει πως κάποια στοιχεία της δράσης των υποδοχέων Gr και Mr παραμένουν ακόμα άγνωστα. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα είναι σημαντικό να επιβεβαιωθούν με την επανάληψη του πειράματος σε προνύμφες μεγαλύτερης ηλικίας, ενώ η γονιδιακή έκφραση των προνυμφών $gr^{-/-}$ $mr^{-/-}$ τόσο σε συνθήκες ηρεμίας όσο και ύστερα από έκθεση σε στρες θα προσφέρει μία πιο ολοκληρωμένη εικόνα της ενεργότητας του άξονα HPI απουσία των δύο γλυκοκορτικοστεροειδών υποδοχέων.

7. Συμπεράσματα

- Δεν εντοπίστηκε κάποια συνέπεια στην απόκριση των δύο ηθολογικών προτύπων, με τις συμπεριφορικές αποκρίσεις των ατόμων να μην ακολουθούν τα πρότυπα που έχουν οριστεί στη βιβλιογραφία. Τα χαρακτηρισμένα ως εξερευνητικά άτομα εμφάνισαν έναν πιο αγχώδη φαινότυπο σε σχέση με τα μη εξερευνητικά. Τα υποτελή εμφάνισαν μεγαλύτερη άνεση εξερεύνησης της κάθετης στήλης του νερού σε ένα άγνωστο περιβάλλον σε σύγκριση με τα κυρίαρχα.
- Οι νικητές ή οι χαμένοι μίας δυαδικής αγωνιστικής αλληλεπίδρασης δεν αντικατοπτρίζουν ένα προδραστικό και αναδραστικό ηθολογικό πρότυπο αντίστοιχα. Η έκβαση μίας δυαδικής αγωνιστικής αλληλεπίδρασης και η θέση που θα καταλάβει το κάθε άτομο στην κοινωνική αυτή η ιεραρχία εξαρτώνται και από άλλους παράγοντες πέρα από το ηθολογικό πρότυπο.
- Το σεροτονεργικό σύστημα συμμετέχει στο κοινωνικό στρες και στην αγωνιστική συμπεριφορά των ενθλικών zebrafish, αφού οξεία χορήγηση φλουοξετίνης μείωσε σημαντικά την επιθετική συμπεριφορά των κυρίαρχων ατόμων, ενώ παράλληλα αύξησε την τολμηρότητα των υποτελών.
- Η σεροτονίνη ασκεί σημαντική επίδραση και σε μοριακούς ρυθμιστές της νευρωνικής λειτουργίας, του στρες και του άγχους, όπως φάνηκε από την έκφραση γονιδίων σχετικών με το σεροτονεργικό σύστημα και τον άξονα HPI σε ενθλικά zebrafish με οξεία έκθεση σε φλουοξετίνη.
- Σε αντίθεση με τον αγχολυτικό χαρακτήρα της φλουοξετίνης, οξεία χορήγηση υψηλής δόσης φλουοξετίνης προκάλεσε σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση της κορτιζόλης τόσο σε ενθλικά zebrafish όσο και σε προνύμφες του είδους. Το σεροτονεργικό σύστημα φαίνεται λοιπόν πως αλληλεπιδρά με τον άξονα HPI.
- Η φλουοξετίνη επιβεβαιώνεται πως έχει μη μονοτονική δράση και στις προνύμφες zebrafish.
- Τα άτομα $mr^{-/-}$ εμφάνισαν έναν πιο αγχώδη φαινότυπο σε σύγκριση με τα άτομα $gr^{-/-}$. Η διαφορετική συμπεριφορική απόκριση των ατόμων $gr^{-/-}$ και $mr^{-/-}$ υποδηλώνει μία συμπληρωματική δράση των δύο υποδοχέων. Επιπλέον, η απουσία κάποιας στατιστικά σημαντικής διαφοράς μεταξύ της κοινωνικής προτίμησης των $gr^{-/-}$ και $mr^{-/-}$, δείχνει πως οι δύο γλυκοκορτικοστεροειδείς υποδοχείς δεν επηρεάζουν την κοινωνική προτίμηση των ενθλικών zebrafish.
- Ο Gr συμμετέχει ενεργά στο σύστημα αρνητικής ανάδρασης της κορτιζόλης, καθώς zebrafish σε ενθλικο και προνυμφικό στάδιο εμφάνισαν υπερκορτιζολαιμία σε συνθήκες ηρεμίας και καταπόνησης.

- Τα υποτελή άτομα της ομάδας $gr^{-/-}$ εμφάνισαν έναν έντονα αναδραστικό φαινότυπο μέσω της αυξημένης ακινητοποιημένης τους συμπεριφοράς. Επιβεβαιώνεται και στο zebrafish πως υψηλή ενεργότητα του άξονα HPI σχετίζεται με αναδραστικό ηθολογικό πρότυπο.
- Η ένταση του φωτισμού στον οποίο εκτίθενται οι προνύμφες σε δοκιμασίες εναλλαγής φωτός – σκότους αποτελεί έναν παράγοντα με καθοριστικό ρόλο τόσο στην ένταση όσο και στο μοτίβο της συμπεριφορικής απόκρισης. Οι προνύμφες αποκρίθηκαν με σημαντικές διαφορές στα δύο πρωτόκολλα με διαφορετική ένταση φωτισμού. Υπό συνθήκες πολύ έντονου φωτισμού, οι προνύμφες $gr^{-/-}$ και $mr^{-/-}$ εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερη κινητικότητα σε σύγκριση με τις άλλες δύο ομάδες, το οποίο αποτελεί ενδεχομένως παράγωγο της αυξημένης ενεργότητας του HPI άξονα υπό συνθήκες έντονης καταπόνησης. Οι συνθήκες ήπιου φωτισμού από την άλλη αποτέλεσαν ενδεχομένως ένα παράδειγμα ήπιας καταπόνησης, στην οποία οι προνύμφες $gr^{-/-}$ και $mr^{-/-}$ αντέδρασαν με μειωμένη ένταση απόκρισης.
- Οι διαφορές στην απόκριση των προνυμφών με σίγαση στα γονίδια των υποδοχέων των γλυκοκορτικοστεροειδών σε συνθήκες χαμηλής φωτεινότητας ενδεχομένως να οφείλεται σε προβλήματα στην οπτική επεξεργασία των ερεθισμάτων και στην προσαρμογή στο φως.
- Οι τρεις γενετικές γραμμές με μετάλλαξη στους υποδοχείς των γλυκοκορτικοστεροειδών εμφάνισαν μία διαταραγμένη ένταση απόκρισης στα μηχανικά ερεθίσματα αλλά και στο επίπεδο εξοικείωσής τους, γεγονός το οποίο υποδηλώνει πως οι υποδοχείς των γλυκοκορτικοστεροειδών διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενεργότητας των νευρώνων Mauthner.
- Οι προνύμφες $gr^{-/-}$ και $mr^{-/-}$ παρουσίασαν αγχώδη φαινότυπο με υψηλή θιγμοτακτική συμπεριφορά και στις δύο δοκιμασίες εναλλαγής φωτός – σκότους, το οποίο υποδηλώνει πως απουσία και των δύο γλυκοκορτικοστεροειδών υποδοχέων προκαλεί καθυστέρηση στη συμπεριφορική προσαρμογή σε συνθήκες επαναλαμβανόμενης καταπόνησης. Η καθυστέρηση στην φυσιολογική απόκριση στην καταπόνηση όπως φάνηκε από τη συγκέντρωση κορτιζόλης των συγκεκριμένων προνυμφών δείχνει πως η αλληλεπίδραση των δύο υποδοχέων διέπεται από μηχανισμούς ακόμα άγνωστους.

Βιβλιογραφία

de Abreu, M.S. *et al.* (2021) 'Understanding how stress responses and stress-related behaviors have evolved in zebrafish and mammals', *Neurobiology of Stress*, 15, p. 100405. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100405>.

De Abreu, M.S. *et al.* (2014) 'Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in zebrafish', *PLoS ONE*, 9(7), pp. 1–5. doi:[10.1371/journal.pone.0103232](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103232).

Acerete, L. *et al.* (2007) 'Cloning of the glucocorticoid receptor (GR) in gilthead seabream (*Sparus aurata*). Differential expression of GR and immune genes in gilthead seabream after an immune challenge.', *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 148(1), pp. 32–43. doi:[10.1016/j.cbpb.2007.04.015](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.04.015).

Adriaenssens, B. and Johnsson, J.I. (2013) 'Natural selection, plasticity and the emergence of a behavioural syndrome in the wild', *Ecology Letters*, 16(1), pp. 47–55. doi:<https://doi.org/10.1111/ele.12011>.

Ahmad, F. and Richardson, M.K. (2013) 'Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: Impact of environmental complexity', *Behavioural Processes*, 92, pp. 88–98. doi:<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2012.10.014>.

Aihara, M. *et al.* (2007) 'HPA axis dysfunction in unmedicated major depressive disorder and its normalization by pharmacotherapy correlates with alteration of neural activity in prefrontal cortex and limbic/paralimbic regions', *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 155(3), pp. 245–256. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2006.11.002>.

Airhart, M.J. *et al.* (2007) 'Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath exposure to fluoxetine (PROZAC).', *Neurotoxicology and Teratology*, 29(6), pp. 652–664. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17761399>.

Al-Imari, L. and Gerlai, R. (2008) 'Sight of conspecifics as reward in associative learning in zebrafish (*Danio rerio*)', *Behavioural Brain Research*, 189(1), pp. 216–219. doi:[10.1016/j.bbr.2007.12.007](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.12.007).

Albert, P.R. and Benkelfat, C. (2013) 'The neurobiology of depression--revisiting the serotonin hypothesis. II. Genetic, epigenetic and clinical studies', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1615), pp. 20120535–20120535. doi:[10.1098/rstb.2012.0535](https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0535).

Alderman, S.L. *et al.* (2012) 'Central and peripheral glucocorticoid receptors are involved in the plasma cortisol response to an acute stressor in rainbow trout', *General and Comparative Endocrinology*, 176(1), pp. 79–85. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.12.031>.

Alderman, S.L. and Vijayan, M.M. (2012) '11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in zebrafish brain: a functional role in hypothalamus-pituitary-interrenal axis regulation', *Journal of Endocrinology*, 215(3), pp. 393–402. doi:[10.1530/JOE-12-0379](https://doi.org/10.1530/JOE-12-0379).

Alsop, D. and Vijayan, M. (2009) 'The zebrafish stress axis: molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event.', *General and comparative endocrinology*, 161(1), pp. 62–6. doi:[10.1016/j.ygcen.2008.09.011](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.09.011).

Alsop, D. and Vijayan, M.M. (2008) 'Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish.', *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 294(3), pp. R711-9. doi:[10.1152/ajpregu.00671.2007](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00671.2007).

Ambroggi, F. *et al.* (2009) 'Stress and addiction: glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons facilitates cocaine seeking', *Nature Neuroscience*, 12(3), pp. 247–249. doi:[10.1038/nn.2282](https://doi.org/10.1038/nn.2282).

Angiulli, E. *et al.* (2020) 'Increase in environmental temperature affects exploratory behaviour, anxiety and social preference in *Danio rerio*', *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1–12. doi:[10.1038/s41598-020-62331-1](https://doi.org/10.1038/s41598-020-62331-1).

Ariyomo, T.O. and Watt, P.J. (2012) 'The effect of variation in boldness and aggressiveness on the reproductive success of zebrafish', *Animal Behaviour*, 83(1), pp. 41–46. doi:[10.1016/j.anbehav.2011.10.004](https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.10.004).

Aruna, A., Nagarajan, G. and Chang, C.-F. (2012) 'Involvement of Corticotrophin-Releasing Hormone and Corticosteroid Receptors in the Brain–Pituitary–Gill of *Tilapia* During the Course of

- Seawater Acclimation', *Journal of Neuroendocrinology*, 24(5), pp. 818–830. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2012.02282.x>.
- Arunachalam, M. *et al.* (2013) 'Natural History of Zebrafish (*Danio rerio*) in India', *Zebrafish*, 10(1), pp. 1–14. doi:[10.1089/zeb.2012.0803](https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0803).
- Aslanzadeh, M. *et al.* (2019) 'The Body Size of Stimulus Conspecifics Affects Social Preference in a Binary Choice Task in Wild-Type, But Not in *dyrk1aa* Mutant, Zebrafish', *Zebrafish*, 16(3), pp. 262–267. doi:[10.1089/zeb.2018.1717](https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1717).
- van Ast, V.A. *et al.* (2013) 'Modulatory mechanisms of cortisol effects on emotional learning and memory: novel perspectives', *Psychoneuroendocrinology*. 2013/07/08, 38(9), pp. 1874–1882. doi:[10.1016/j.psyneuen.2013.06.012](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.06.012).
- Audira, G. *et al.* (2020) 'Which zebrafish strains are more suitable to perform behavioral studies? A comprehensive comparison by phenomic approach', *Biology*, 9(8), pp. 1–22. doi:[10.3390/biology9080200](https://doi.org/10.3390/biology9080200).
- Bagdy, G. *et al.* (2001) 'Anxiety-like effects induced by acute fluoxetine, sertraline or m-CPP treatment are reversed by pretreatment with the 5-HT_{2C} receptor antagonist SB-242084 but not the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635', *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 4(4), pp. 399–408. doi:[10.1017/S1461145701002632](https://doi.org/10.1017/S1461145701002632).
- Baker, M.R. *et al.* (2018) 'Repeatability and reliability of exploratory behavior in proactive and reactive zebrafish, *Danio rerio*', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–9. doi:[10.1038/s41598-018-30630-3](https://doi.org/10.1038/s41598-018-30630-3).
- Baker, M.R., Hofmann, H.A. and Wong, R.Y. (2017) 'Neurogenomics of Behavioural Plasticity in Socioecological Contexts', *eLS*, pp. 1–11. doi:[10.1002/9780470015902.a0026839](https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0026839).
- Bamberger, C.M., Schulte, H.M. and Chrousos, G.P. (1996) 'Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids', *Endocrine Reviews*, 17(3), pp. 245–261. doi:[10.1210/edrv-17-3-245](https://doi.org/10.1210/edrv-17-3-245).
- Barbosa, A. *et al.* (2012) 'Behavioral characterization of the alarm reaction and anxiolytic-like effect of acute treatment with fluoxetine in piauçu fish', *Physiology & Behavior*, 105(3), pp. 784–790. doi:[10.1016/j.physbeh.2011.10.007](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.10.007).
- Barik, J. *et al.* (2013) 'Chronic Stress Triggers Social Aversion via Glucocorticoid Receptor in Dopaminergic Neurons', *Science*, 339(6117), pp. 332–335. doi:[10.1126/science.1226767](https://doi.org/10.1126/science.1226767).
- Barman, R.P. (1991) 'A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio* Hamilton-Buchanan (Pisces: Cyprinidae).', *Records of the Zoological Survey of India Occasional Paper*, 137, pp. 1–91.
- Barrangou, R. *et al.* (2007) 'CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes', *Science*, 315(5819), pp. 1709 LP – 1712. doi:[10.1126/science.1138140](https://doi.org/10.1126/science.1138140).
- Barros, M. and Tomaz, C. (2002) 'Non-human primate models for investigating fear and anxiety', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26(2), pp. 187–201. doi:[10.1016/S0149-7634\(01\)00064-1](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00064-1).
- Barros, T.P. *et al.* (2008) 'Zebrafish: An emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery', *British Journal of Pharmacology*, 154(7), pp. 1400–1413. doi:[10.1038/bjp.2008.249](https://doi.org/10.1038/bjp.2008.249).
- Barton, B.A. (2002) 'Stress in Fishes : A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in', *Integrative and Comparative Biology*, 42, pp. 517–525.
- Basnet, R.M. *et al.* (2019) 'Zebrafish larvae as a behavioral model in neuropharmacology', *Biomedicine*, 7(1). doi:[10.3390/biomedicine7010023](https://doi.org/10.3390/biomedicine7010023).
- Baugh, A.T. *et al.* (2012) 'Corticosterone responses differ between lines of great tits (*Parus major*) selected for divergent personalities', *General and Comparative Endocrinology*, 175(3), pp. 488–494.
- Beck, C.H. and Fibiger, H.C. (1995) 'Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene *c-fos*: with and without diazepam pretreatment', *J Neurosci*, 15(1 Pt 2), pp. 709–720. Available at: <http://www.jneurosci.org/content/15/1/709.long>.
- Bell, A.M. (2007) 'Future directions in behavioural syndromes research', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1611), pp. 755–761. doi:[10.1098/rspb.2006.0199](https://doi.org/10.1098/rspb.2006.0199).
- Belzung, C. (1999) 'Chapter 4.11 Measuring rodent exploratory behavior', in Crusio, W.E. and

Gerlai, R.T.B.T.-T. in the B. and N.S. (eds) *Handbook of Molecular-Genetic Techniques for Brain and Behavior Research*. Elsevier, pp. 738–749. doi:[https://doi.org/10.1016/S0921-0709\(99\)80057-1](https://doi.org/10.1016/S0921-0709(99)80057-1).

Belzung, C. *et al.* (2001) 'An investigation of the mechanisms responsible for acute fluoxetine-induced anxiogenic-like effects in mice', *Behavioural Pharmacology*, 12(3). Available at: https://journals.lww.com/behaviouralpharm/Fulltext/2001/05000/An_investigation_of_the_mechanisms_responsible_for.1.aspx.

Benato, F. *et al.* (2014) 'A living biosensor model to dynamically trace glucocorticoid transcriptional activity during development and adult life in zebrafish', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 392(1–2), pp. 60–72. doi:10.1016/j.mce.2014.04.015.

Bennett, P. *et al.* (2001) 'Predicting post-traumatic symptoms in cardiac patients', *Heart & Lung: The Journal of Cardiopulmonary and Acute Care*, 30(6), pp. 458–465. doi:10.1067/mhl.2001.118296.

Benus, R.F. *et al.* (1991) 'Heritable variation for aggression as a reflection of individual coping strategies', *Experientia*, 47(10), pp. 1008–1019. doi:10.1007/BF01923336.

Berger, S. *et al.* (2006) 'Loss of the limbic mineralocorticoid receptor impairs behavioral plasticity', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(1), pp. 195–200.

Berghmans, S. *et al.* (2007) 'Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants', *Epilepsy Research*, 75(1), pp. 18–28. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2007.03.015>.

Bernard, C. (1859) *Leçons sur les propriétés physiologiques et les altérations pathologiques des liquides de l'organisme*. Paris: Baillière.

Best, C. and Vijayan, Mathilakath M. (2018) 'Cortisol elevation post-hatch affects behavioural performance in zebrafish larvae', *General and Comparative Endocrinology*, 257, pp. 220–226. doi:10.1016/j.ygcen.2017.07.009.

Best, C. and Vijayan, Mathilakath M. (2018) 'Cortisol elevation post-hatch affects behavioural performance in zebrafish larvae', *General and Comparative Endocrinology*, 257, pp. 220–226. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.07.009>.

Best, J.D. *et al.* (2008) 'Non-associative learning in larval zebrafish', *Neuropsychopharmacology*, 33(5), pp. 1206–1215. doi:10.1038/sj.npp.1301489.

Bhagwagar, Z., Hafizi, S. and Cowen, P.J. (2005) 'Increased salivary cortisol after waking in depression', *Psychopharmacology*, 182(1), pp. 54–57. doi:10.1007/s00213-005-0062-z.

Bikard, D. *et al.* (2014) 'Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials', *Nature Biotechnology*, 32(11), pp. 1146–1150. doi:10.1038/nbt.3043.

Bjartmar, L. *et al.* (2000) 'Selective effects on NGFI-A, MR, GR and NGFI-B hippocampal mRNA expression after chronic treatment with different subclasses of antidepressants in the rat', *Psychopharmacology*, 151(1), pp. 7–12. doi:10.1007/s002130000468.

Blanchard, R.J. *et al.* (1997) 'Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21(6), pp. 783–789. doi:10.1016/S0149-7634(96)00062-0.

Blaser, R. and Gerlai, R. (2006) 'Behavioral phenotyping in zebrafish: comparison of three behavioral quantification methods.', *Behavior research methods*, 38(3), pp. 456–69. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17186756>.

Blaser, R.E., Chadwick, L. and McGinnis, G.C. (2010) 'Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*).', *Behavioural brain research*, 208(1), pp. 56–62. doi:10.1016/j.bbr.2009.11.009.

Blier, P. and El Mansari, M. (2013) 'Serotonin and beyond: therapeutics for major depression.', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 368(1615), p. 20120536. doi:10.1098/rstb.2012.0536.

Bohus, B. *et al.* (1987) 'Chapter 6 Neuroendocrine states and behavioral and physiological stress responses', in de Kloet, E.R., Wiegant, V.M., and de Wied, D.B.T.-P. in B.R. (eds) *Neuropeptides and Brain Function*. Elsevier, pp. 57–70. doi:[https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)60196-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)60196-X).

Bolhuis, J.E. *et al.* (2004) 'Individual coping characteristics, rearing conditions and behavioural flexibility in pigs', 152, pp. 351–360. doi:10.1016/j.bbr.2003.10.024.

- Bolotin, A. *et al.* (2005) 'Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin', *Microbiology*, 151(8), pp. 2551–2561. doi:10.1099/mic.0.28048-0.
- Van Der Boon, J., Van Den Thillart, G.E.E.J.M. and Addink, A.D.F. (1991) 'The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish', *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 100(1), pp. 47–53. doi:10.1016/0300-9629(91)90182-C.
- Borski, R.J. *et al.* (1991) 'Cortisol rapidly reduces prolactin release and cAMP and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ accumulation in the cichlid fish pituitary in vitro.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(April), pp. 2758–2762. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC51318/pdf/pnas01057-0155.pdf>.
- Borski, R.J., Hyde, G.N. and Fruchtman, S. (2002) 'Signal transduction mechanisms mediating rapid, nongenomic effects of cortisol on prolactin release', *Steroids*, 67(6), pp. 539–548. doi:10.1016/S0039-128X(01)00197-0.
- Bouchard, T.J. and Loehlin, J.C. (2001) 'Genes, Evolution, and Personality', *Behavior Genetics*, 31(3), pp. 243–273. doi:10.1023/A:1012294324713.
- Braida, D. *et al.* (2007) 'Hallucinatory and rewarding effect of salvinorin A in zebrafish: κ -opioid and CB1-cannabinoid receptor involvement', *Psychopharmacology*, 190(4), pp. 441–448. doi:10.1007/s00213-006-0639-1.
- Braida, D. *et al.* (2012) 'Neurohypophyseal hormones manipulation modulate social and anxiety-related behavior in zebrafish', *Psychopharmacology*, 220(2), pp. 319–330.
- Breder, C.M. and Rosen, D.E. (1966) *Modes of reproduction in fishes*. New York: Natural History Press.
- Brelin, D. *et al.* (2008) 'Frequency distribution of coping strategies in four populations of brown trout (*Salmo trutta*)', *Hormones and Behavior*, 53(4), pp. 546–556. doi:<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.12.011>.
- Brett, J.R. (1958) *Implications and assessments of environmental stress, The Investigation of Fish-Power Problems*. Vancouver: H.R. MacMillan Lectures in Fisheries, University of British Columbia.
- Briggs, J.P. (2002) 'The zebrafish: a new model organism for integrative physiology.', *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 282(1), pp. R3-9. doi:10.1152/ajpregu.00589.2001.
- Brockhoff, S.E. (2006) 'Measuring the optokinetic response of zebrafish larvae', *Nature Protocols*, 1(5), pp. 2448–2451. doi:10.1038/nprot.2006.255.
- Bronson, D.R. and Preuss, T. (2017) 'Cellular Mechanisms of Cortisol-Induced Changes in Mauthner-Cell Excitability in the Startle Circuit of Goldfish', *Frontiers in Neural Circuits*, 11, p. 68. doi:10.3389/fncir.2017.00068.
- Burgess, H.A. and Granato, M. (2007) 'Modulation of locomotor activity in larval zebrafish during light adaptation', *Journal of Experimental Biology*, 210(14), pp. 2526–2539. doi:10.1242/jeb.003939.
- Burgess, H.A., Schoch, H. and Granato, M. (2010) 'Distinct retinal pathways drive spatial orientation behaviors in zebrafish navigation', *Current biology : CB*. 2010/02/11, 20(4), pp. 381–386. doi:10.1016/j.cub.2010.01.022.
- Burns, J.G. (2008) 'The validity of three tests of temperament in guppies (*Poecilia reticulata*).', *Journal of Comparative Psychology*. Burns, James G.: Laboratoire Evolution, Genomes et Speciation, Centre National de la Recherche Scientifique, Bat 13, Avenue de la Terrasse, Gif sur Yvette, France, F-91198, james.burns@legs.cnrs-gif.fr: American Psychological Association, pp. 344–356. doi:10.1037/0735-7036.122.4.344.
- Burstein, D. *et al.* (2017) 'New CRISPR–Cas systems from uncultivated microbes', *Nature*, 542(7640), pp. 237–241. doi:10.1038/nature21059.
- Bury, N.R. *et al.* (2003) 'Evidence for two distinct functional glucocorticoid receptors in teleost fish', *Journal of Molecular Endocrinology*, 31(1), pp. 141–156. doi:10.1677/jme.0.0310141.
- Bury, N.R. and Sturm, A. (2007) 'Evolution of the corticosteroid receptor signalling pathway in fish.', *General and comparative endocrinology*, 153(1–3), pp. 47–56.

doi:10.1016/j.ygcen.2007.03.009.

Buske, C. and Gerlai, R. (2012) 'Maturation of shoaling behavior is accompanied by changes in the dopaminergic and serotonergic systems in zebrafish', *Developmental psychobiology*, 2011/06/08, 54(1), pp. 28–35. doi:10.1002/dev.20571.

Cachat, J. *et al.* (2010) 'Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish.', *Nature protocols*, 5(11), pp. 1786–1799. doi:10.1038/nprot.2010.140.

De Campos, E.G., Bruni, A.T. and De Martinis, B.S. (2015) 'Ketamine induces anxiolytic effects in adult zebrafish: A multivariate statistics approach', *Behavioural Brain Research*, 292, pp. 537–546. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.07.017.

Cannon, W.B. (1935) 'Stresses and Strains of Homeostasis', *The American Journal of the Medical Sciences*, 189(1), pp. 13–14. doi:10.1097/00000441-193501000-00001.

Canzian, J. *et al.* (2017) 'Conspecific alarm substance differently alters group behavior of zebrafish populations: Putative involvement of cholinergic and purinergic signaling in anxiety- and fear-like responses', *Behavioural Brain Research*, 320, pp. 255–263. doi:10.1016/j.bbr.2016.12.018.

Carlson, R.W. *et al.* (1998) 'Neurological effects on startle response and escape from predation by medaka exposed to organic chemicals', *Aquatic Toxicology*, 43(1), pp. 51–68. doi:https://doi.org/10.1016/S0166-445X(97)00097-0.

Carrasco, G.A. and Van De Kar, L.D. (2003) 'Neuroendocrine pharmacology of stress', *European Journal of Pharmacology*, 463(1–3), pp. 235–272. doi:10.1016/S0014-2999(03)01285-8.

Ceol, C.J. and Houvras, Y. (2016) 'Uncharted Waters: Zebrafish Cancer Models Navigate a Course for Oncogene Discovery BT - Cancer and Zebrafish: Mechanisms, Techniques, and Models', in Langenau, D.M. (ed.). Cham: Springer International Publishing, pp. 3–19. doi:10.1007/978-3-319-30654-4_1.

Chakravarty, S. *et al.* (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(5), p. e63302. doi:10.1371/journal.pone.0063302.

Champagne, D.L. *et al.* (2010) 'Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): relevance for stress research.', *Behavioural brain research*, 214(2), pp. 332–42. doi:10.1016/j.bbr.2010.06.001.

Chatzopoulou, A. *et al.* (2015) 'Transcriptional and metabolic effects of glucocorticoid receptor α and β signaling in zebrafish', *Endocrinology*, 156(5), pp. 1757–1769. doi:10.1210/en.2014-1941.

Chen, C.-C. and Fernald, R.D. (2008) 'Sequences, expression patterns and regulation of the corticotropin-releasing factor system in a teleost', *General and comparative endocrinology*, 157(2), pp. 148–155.

Choi, J.-H. *et al.* (2018) 'Targeted knockout of a chemokine-like gene increases anxiety and fear responses', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(5), pp. E1041–E1050. doi:10.1073/pnas.1707663115.

Chrousos, G.P. (1998) 'Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response.', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851, pp. 593–595.

Chrousos, G.P. and Kino, T. (2007) 'Glucocorticoid action networks and complex psychiatric and/or somatic disorders', *Stress*, 10(2), pp. 213–219. doi:10.1080/10253890701292119.

Citorik, R.J., Mimee, M. and Lu, T.K. (2014) 'Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases', *Nature biotechnology*, 2014/09/21, 32(11), pp. 1141–1145. doi:10.1038/nbt.3011.

Clements, S. and Schreck, C.B. (2007) 'Chronic administration of fluoxetine alters locomotor behavior, but does not potentiate the locomotor stimulating effects of CRH in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)', *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 147(1), pp. 43–49. doi:https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.11.011.

Cole, T.J. *et al.* (1995) 'Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation', *Genes and Development*, 9(13), pp. 1608–1621. doi:10.1101/gad.9.13.1608.

- Colombe, L. *et al.* (2000) 'A mineralocorticoid-like receptor in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: cloning and characterization of its steroid binding domain', *Steroids*, 65(6), pp. 319–328. doi:[https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(00\)00090-8](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(00)00090-8).
- Colombo, L. *et al.* (2006) 'Aldosterone and the conquest of land', *Journal of Endocrinological Investigation*, 29(4), pp. 373–379. doi:10.1007/BF03344112.
- Colwill, R.M. *et al.* (2005) 'Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*)', *Behavioural Processes*, 70(1), pp. 19–31. doi:10.1016/j.beproc.2005.03.001.
- Cong, L. *et al.* (2013) 'Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... Zhang, F. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science (New York, N.Y.)*, *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), pp. 819–823. doi:10.1126/science.1231143.Multiplex.
- Conley, R.K. and Hutson, P.H. (2007) 'Effects of acute and chronic treatment with fluoxetine on stress-induced hyperthermia in telemetered rats and mice', *European Journal of Pharmacology*, 564(1–3), pp. 138–145. doi:10.1016/j.ejphar.2007.02.063.
- Conrad, J.L. *et al.* (2011) 'Behavioural syndromes in fishes : a review with implications for ecology and fisheries management.', *Journal of Fish Biology*, 78, pp. 395–435. doi:10.1111/j.1095-8649.2010.02874.x.
- Cortemeglia, C. and Beitingger, T.L. (2005) 'Temperature Tolerances of Wild-Type and Red Transgenic Zebra Danios', *Transactions of the American Fisheries Society*, 134(6), pp. 1431–1437. doi:<https://doi.org/10.1577/T04-197.1>.
- Cote, J. *et al.* (2010) 'Personality traits and dispersal tendency in the invasive mosquitofish (*Gambusia affinis*)', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1687), pp. 1571–1579.
- Craft, B.B., Velkey II, A.J. and Szalda-Petree, A. (2003) 'Instrumental conditioning of choice behavior in male Siamese fighting fish (*Betta splendens*)', *Behavioural processes*, 63(3), pp. 171–175.
- Creaser, C.W. (1934) 'The Technic of Handling the Zebra Fish (*Brachydanio rerio*) for the Production of Eggs Which Are Favorable for Embryological Research and Are Available at Any Specified Time Throughout the Year', *Copeia*, 1934(4), pp. 159–161. Available at: <http://www.jstor.org/stable/1435845>.
- Cristóbal-Azkarate, J. *et al.* (2007) 'Glucocorticoid levels in free ranging resident mantled howlers: a study of coping strategies', *American Journal of Primatology*, 69(8), pp. 866–876. doi:<https://doi.org/10.1002/ajp.20383>.
- Cruz, S.A. *et al.* (2013) 'Glucocorticoid Receptor, but Not Mineralocorticoid Receptor, Mediates Cortisol Regulation of Epidermal Ionocyte Development and Ion Transport in Zebrafish (*Danio Rerio*)', *PLOS ONE*, 8(10), p. e77997. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077997>.
- Cunha, V. *et al.* (2016) 'Danio rerio embryos on Prozac – Effects on the detoxification mechanism and embryo development', *Aquatic Toxicology*, 178, pp. 182–189. doi:10.1016/j.aquatox.2016.08.003.
- Cunha, V. *et al.* (2018) 'Fluoxetine modulates the transcription of genes involved in serotonin, dopamine and adrenergic signalling in zebrafish embryos', *Chemosphere*, 191, pp. 954–961. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.100>.
- Cunha, V. *et al.* (2018) 'Fluoxetine modulates the transcription of genes involved in serotonin, dopamine and adrenergic signalling in zebrafish embryos', *Chemosphere*, 191, pp. 954–961. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.10.100.
- Dadda, M., Koolhaas, W.H. and Domenici, P. (2010) 'Behavioural asymmetry affects escape performance in a teleost fish', *Biology Letters*, 6(3), pp. 414–417. doi:10.1098/rsbl.2009.0904.
- Dahlbom, S.J. *et al.* (2011) 'Boldness predicts social status in zebrafish (*Danio rerio*).', *PloS one*, 6(8), p. e23565. doi:10.1371/journal.pone.0023565.
- Dai, J. *et al.* (2010) 'Non-homologous end joining plays a key role in transgene concatemer formation in transgenic zebrafish embryos', *International Journal of Biological Sciences*, 6(7), pp. 756–768. doi:10.7150/ijbs.6.756.
- Darrow, K.O. and Harris, W.A. (2004) 'Characterization and Development of Courtship in Zebrafish, *Danio rerio*', *Zebrafish*, 1(1), pp. 40–45. doi:10.1089/154585404774101662.

- Das, D.N. (2002) 'Fish farming in rice environments of North Eastern India', *Aquaculture Asia*, 12(2), pp. 43–47.
- Deckel, A.W. (1996) 'Behavioral changes in *Anolis carolinensis* following injection with fluoxetine', *Behavioural Brain Research*, 78(2), pp. 175–182. doi:10.1016/0166-4328(95)00246-4.
- Demin, K.A. *et al.* (2020) 'Understanding neurobehavioral effects of acute and chronic stress in zebrafish', *Stress*, 0(0), p. 000. doi:10.1080/10253890.2020.1724948.
- Denham, J. *et al.* (2014) 'Exercise: Putting action into our epigenome', *Sports Medicine*, 44(2), pp. 189–209. doi:10.1007/s40279-013-0114-1.
- Dereje, S. *et al.* (2012) 'Comparing behavioral responses across multiple assays of stress and anxiety in zebrafish (*Danio rerio*)', *Behaviour*, 149(10–12), pp. 1205–1240. doi:https://doi.org/10.1163/1568539X-00003018.
- Detrich, H.W. 3rd, Westerfield, M. and Zon, L.I. (1999) 'Overview of the Zebrafish system.', *Methods in Cell Biology*, 59, pp. 3–10. doi:10.1016/s0091-679x(08)61816-6. PMID: 9891351.
- Deveau, A.P., Bentley, V.L. and Berman, J.N. (2017) 'Using zebrafish models of leukemia to streamline drug screening and discovery', *Experimental Hematology*, 45, pp. 1–9. doi:10.1016/j.exphem.2016.09.012.
- Dhabhar, F.S. (2001) 'Bidirectional effects of stress and glucocorticoid hormones on immune function : possible explanations for paradoxical observations', in.
- Dienes, K.A. *et al.* (2006) 'The stress sensitization hypothesis: Understanding the course of bipolar disorder', *Journal of Affective Disorders*, 95(1–3), pp. 43–49. doi:10.1016/j.jad.2006.04.009.
- Dinan, T.G. (1996) 'Serotonin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function', *Life Sciences*, 58(20), pp. 1683–1694. doi:https://doi.org/10.1016/0024-3205(96)00066-5.
- Dingemans, N.J. *et al.* (2007) 'Behavioural syndromes differ predictably between 12 populations of three-spined stickleback', *Journal of Animal Ecology*, 76(6), pp. 1128–1138. doi:10.1111/j.1365-2656.2007.01284.x.
- Douma, B.R.K. *et al.* (1998) 'Repeated blockade of mineralocorticoid receptors, but not of glucocorticoid receptors impairs food rewarded spatial learning', *Psychoneuroendocrinology*, 23(1), pp. 33–44.
- Drapeau, P. *et al.* (2002) 'Development of the locomotor network in zebrafish', *Progress in Neurobiology*, 68(2), pp. 85–111. doi:https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00075-8.
- Drapier, D. *et al.* (2007) 'Effects of acute fluoxetine, paroxetine and desipramine on rats tested on the elevated plus-maze', *Behavioural Brain Research*, 176(2), pp. 202–209. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.10.002.
- Dreissen, Y.E.M. *et al.* (2012) 'Exaggerated startle reactions', *Clinical neurophysiology*, 123(1), pp. 34–44.
- Dreosti, E. *et al.* (2015) 'Development of social behavior in young zebrafish', *Frontiers in Neural Circuits*, 9(AUGUST), pp. 1–9. doi:10.3389/fncir.2015.00039.
- Drews, C. (1993) 'The Concept and Definition of Dominance in Animal Behaviour.', *Behaviour*, 125(3), pp. 283–313. Available at: <http://www.jstor.org/stable/10.2307/4535117>.
- Drossopoulou, G. *et al.* (2004) 'Sex differences in behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects induced by the forced swim test in rats', *Neuroscience*, 126(4), pp. 849–857. doi:https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.04.044.
- Ducouret, B. *et al.* (1995) 'Cloning of a teleost fish glucocorticoid receptor shows that it contains a deoxyribonucleic acid-binding domain different from that of mammals', *Endocrinology*, 136(9), pp. 3774–3783. doi:10.1210/endo.136.9.7649084.
- Duffy, E. (1962) *Activation and behavior.*, *Activation and behavior*. Oxford, England: Wiley.
- Dulawa, S.C. *et al.* (2004) 'Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression.', *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 29(7), pp. 1321–1330. doi:10.1038/sj.npp.1300433.
- Duma, D., Jewell, C.M. and Cidlowski, J.A. (2006) 'Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular*

Biology, 102(1-5 SPEC. ISS.), pp. 11–21. doi:10.1016/j.jsbmb.2006.09.009.

Duncan, G.E. *et al.* (1998) 'Differential effects of chronic antidepressant treatment on swim stress- and fluoxetine-induced secretion of corticosterone and progesterone.', *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 285(2), pp. 579–587. doi:10.1111/j.1360-0443.2009.02814.x.

Dzieweczynski, T.L. and Hebert, O.L. (2012) 'Fluoxetine alters behavioral consistency of aggression and courtship in male Siamese fighting fish, *Betta splendens*', *Physiology and Behavior*, 107(1), pp. 92–97. doi:10.1016/j.physbeh.2012.06.007.

Eaton, R.C. and Farley, R.D. (1974) 'Spawning Cycle and Egg Production of Zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the Laboratory', *Copeia*, 1974(1), pp. 195–204. doi:10.2307/1443023.

Ebner, K. *et al.* (2005) 'Neuroendocrine and behavioral response to social confrontation: Residents versus intruders, active versus passive coping styles', *Hormones and Behavior*, 47(1), pp. 14–21. doi:10.1016/j.yhbeh.2004.08.002.

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., *et al.* (2009) 'Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish.', *Behavioural brain research*, 205(1), pp. 38–44. doi:10.1016/j.bbr.2009.06.022.

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. and Tien, D.H. (2009) 'Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish', *Behavioural brain research*, 205(1), pp. 38–44.

Emerson, A.J. *et al.* (2000) 'Stress induces rapid changes in serotonergic activity : restraint and exertion', 111, pp. 83–92.

Emran, F., Rihel, J. and Dowling, J.E. (2008) 'A behavioral assay to measure responsiveness of zebrafish to changes in light intensities', *Journal of visualized experiments : JoVE*, (20), p. 923. doi:10.3791/923.

Engeszer, R E *et al.* (2007) 'Timing and plasticity of shoaling behaviour in the zebrafish, *Danio rerio*.' , *Animal behaviour*, 74(5), pp. 1269–1275. doi:10.1111/j.1360-0443.2009.02814.x.

Engeszer, R E. *et al.* (2007) 'Zebrafish in the wild: A review of natural history and new notes from the field', *Zebrafish*, 4(1), pp. 21–40. doi:10.1089/zeb.2006.9997.

English, S., Nakagawa, S. and Clutton-Brock, T.H. (2010) 'Consistent individual differences in cooperative behaviour in meerkats (*Suricata suricatta*)', *Journal of evolutionary biology*, 23(8), pp. 1597–1604.

Fabbri, E., Capuzzo, A. and Moon, T.W. (1998) 'The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: An overview', *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 120(2), pp. 177–192. doi:https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)10017-8.

Facchinello, N. *et al.* (2017) 'nr3c1 null mutant zebrafish are viable and reveal DNA-binding-independent activities of the glucocorticoid receptor', (February), pp. 1–13. doi:10.1038/s41598-017-04535-6.

Fang, F. (2003) 'Phylogenetic Analysis of the Asian Cyprinid Genus *Danio* (Teleostei, Cyprinidae)', *Copeia*, 2003(4), pp. 714–728. doi:10.1643/IA03-131.1.

Fanouraki, E. *et al.* (2011) 'Species specificity in the magnitude and duration of the acute stress response in Mediterranean marine fish in culture.', *General and comparative endocrinology*, 173(2), pp. 313–22. doi:10.1016/j.ygcen.2011.06.004.

Faria, M. *et al.* (2019a) 'Development of a vibrational startle response assay for screening environmental pollutants and drugs impairing predator avoidance', *Science of the Total Environment*, 650, pp. 87–96. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.08.421.

Faria, M. *et al.* (2019b) 'Development of a vibrational startle response assay for screening environmental pollutants and drugs impairing predator avoidance', *Science of The Total Environment*, 650, pp. 87–96. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.421.

Faria, M. *et al.* (2020) 'Screening anti-predator behaviour in fish larvae exposed to environmental pollutants', *Science of the Total Environment*, 714, p. 136759. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.136759.

- Faria, M. *et al.* (2021) 'Pharmacological modulation of serotonin levels in zebrafish larvae: Lessons for identifying environmental neurotoxicants targeting the serotonergic system', *Toxics*, 9(6). doi:10.3390/toxics9060118.
- de Farias, N.O. *et al.* (2019) 'Exposure to low concentration of fluoxetine affects development, behaviour and acetylcholinesterase activity of zebrafish embryos', *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 215(May 2018), pp. 1–8. doi:10.1016/j.cbpc.2018.08.009.
- Faucher, K. *et al.* (2006) 'Impact of acute cadmium exposure on the trunk lateral line neuromasts and consequences on the "C-start" response behaviour of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.; Teleostei, Moronidae)', *Aquatic Toxicology*, 76(3), pp. 278–294. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.10.004.
- Faught, E., Best, C. and Vijayan, M.M. (2016) 'Maternal stress-associated cortisol stimulation may protect embryos from cortisol excess in zebrafish', *Royal Society Open Science*, 3(2). doi:10.1098/rsos.160032.
- Faught, E. and Vijayan, M.M. (2016) 'Mechanisms of cortisol action in fish hepatocytes', *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, 199, pp. 136–145. doi:10.1016/j.cbpb.2016.06.012.
- Faught, E. and Vijayan, M.M. (2018) 'The mineralocorticoid receptor is essential for stress axis regulation in zebrafish larvae', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–11. doi:10.1038/s41598-018-36681-w.
- Federenko, I.S. *et al.* (2004) 'The heritability of hypothalamus pituitary adrenal axis responses to psychosocial stress is context dependent', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(12), pp. 6244–6250. doi:10.1210/jc.2004-0981.
- Fernandes, A.M. *et al.* (2012) 'Deep brain photoreceptors control light-seeking behavior in zebrafish larvae', *Current Biology*, 22(21), pp. 2042–2047.
- Fernandes, Y. and Gerlai, R. (2009) 'Long-term behavioral changes in response to early developmental exposure to ethanol in zebrafish', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 33(4), pp. 601–609.
- Fero, K., Yokogawa, T. and Burgess, H.A. (2011) 'The Behavioral Repertoire of Larval Zebrafish', in Kalueff, A. V and Cachat, J.M. (eds) *Zebrafish Models in Neurobehavioral Research*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 249–291. doi:10.1007/978-1-60761-922-2_12.
- Ferris, C.F. *et al.* (1997) 'Vasopressin/serotonin interactions in the anterior hypothalamus control aggressive behavior in golden hamsters.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(11), pp. 4331–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9151749>.
- Filby, A.L., Paull, G.C., Bartlett, E.J., *et al.* (2010) 'Physiological and health consequences of social status in zebrafish (*Danio rerio*)', *Physiology & Behavior*, 101(5), pp. 576–587.
- Filby, A.L., Paull, G.C., Hickmore, T.F., *et al.* (2010) 'Unravelling the neurophysiological basis of aggression in a fish model.', *BMC genomics*, 11, p. 498. doi:10.1186/1471-2164-11-498.
- Fink, G. (2009) 'Stress: Definition and History', in Squire, L.R. (ed.) *Encyclopedia of Neuroscience*. Oxford: Academic Press, pp. 549–555. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-08045046-9.00076-0.
- Fink, G. (2016) 'Chapter 1 - Stress, Definitions, Mechanisms, and Effects Outlined: Lessons from Anxiety', in Fink, George (ed.) *Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior*. San Diego: Academic Press, pp. 3–11. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800951-2.00001-7.
- Foley, P. and Kirschbaum, C. (2010) 'Human hypothalamus-pituitary-adrenal axis responses to acute psychosocial stress in laboratory settings', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35(1), pp. 91–96. doi:10.1016/j.neubiorev.2010.01.010.
- Fong, P.P. and Molnar, N. (2013) 'Antidepressants cause foot detachment from substrate in five species of marine snail', *Marine Environmental Research*, 84, pp. 24–30. doi:10.1016/j.marenvres.2012.11.004.
- Fontana, B.D. *et al.* (2018) 'Taurine modulates acute ethanol-induced social behavioral deficits and fear responses in adult zebrafish', *Journal of Psychiatric Research*, 104(March), pp. 176–182.

doi:10.1016/j.jpsychires.2018.08.008.

Force, A. *et al.* (1999) 'Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations', *Genetics*, 151(4), pp. 1531–1545. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10101175>.

Fox, N.A. and Pine, D.S. (2012) 'Temperament and the emergence of anxiety disorders.', *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*. Fox, Nathan A.: Human Development, University of Maryland, 3304 Benjamin, College Park, MD, US, 20742, fox@umd.edu: Elsevier Science, pp. 125–128. doi:10.1016/j.jaac.2011.10.006.

Fraga, I.C. *et al.* (2005) 'Acute fluoxetine administration differentially affects brain C-Fos expression in fasted and refed rats', *Neuroscience*, 134(1), pp. 327–334. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.03.010.

Francis, R.C. (1990) 'Temperament in a Fish: A Longitudinal Study of the Development of Individual Differences in Aggression and Social Rank in the Midas Cichlid', *Ethology*, 86(4), pp. 311–325. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1990.tb00439.x>.

Franzellitti, S. *et al.* (2013) 'The mode of action (MOA) approach reveals interactive effects of environmental pharmaceuticals on *Mytilus galloprovincialis*', *Aquatic Toxicology*, 140–141, pp. 249–256. doi:10.1016/j.aquatox.2013.06.005.

Fraser, T.W.K. *et al.* (2017) 'Toxicant induced behavioural aberrations in larval zebrafish are dependent on minor methodological alterations', *Toxicology Letters*, 276, pp. 62–68. doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.05.021>.

Fuller, P.J. and Young, M.J. (2009) '43 - Molecular Genomics of Mineralocorticoid Action', in Pfaff, D.W. *et al.* (eds) *Hormones, Brain and Behavior (Second Edition)*. Second Edi. San Diego: Academic Press, pp. 1421–1439. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-008088783-8.00043-7>.

Fuller, R.W. and Snoddy, H.D. (1990) 'Serotonin receptor subtypes involved in the elevation of serum corticosterone concentration in rats by direct- and indirect-aging serotonin agonists.', *Neuroendocrinology*, 52, pp. 206–211.

Funder John W., M.D. (1997) 'GLUCOCORTICOID AND MINERALOCORTICOID RECEPTORS: Biology and Clinical Relevance', *Annual Review of Medicine*, 48(1), pp. 231–240. doi:10.1146/annurev.med.48.1.231.

Fuzzen, M.L.M., Van Der Kraak, G. and Bernier, N.J. (2010) 'Stirring up new ideas about the regulation of the hypothalamic-pituitary-interrenal axis in zebrafish (*Danio rerio*).', *Zebrafish*, 7(4), pp. 349–58. doi:10.1089/zeb.2010.0662.

Galon, J. *et al.* (2002) 'Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells', *The FASEB Journal*, 16(1), pp. 61–71. doi:10.1096/fj.01-0245com.

Gass, P. *et al.* (2001) 'Mice with targeted mutations of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: Models for depression and anxiety?', *Physiology & Behavior*, 73(5), pp. 811–825. doi:[https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00518-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00518-2).

Gaworecki, K.M. and Klaine, S.J. (2008) 'Behavioral and biochemical responses of hybrid striped bass during and after fluoxetine exposure', *Aquatic Toxicology*, 88(4), pp. 207–213.

Gebauer, D.L. *et al.* (2011) 'Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 99(3), pp. 480–486. doi:10.1016/j.pbb.2011.04.021.

Gerlai, R. *et al.* (2000) 'Drinks like a fish: Zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 67(4), pp. 773–782. doi:10.1016/S0091-3057(00)00422-6.

Gerlai, R. (2003) 'Zebra fish: an uncharted behavior genetic model.', *Behavior genetics*, 33(5), pp. 461–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14574124>.

Gerlai, R. (2010) 'Zebrafish antipredatory responses: a future for translational research?', *Behavioural brain research*. 2009/10/15, 207(2), pp. 223–231. doi:10.1016/j.bbr.2009.10.008.

Gerlai, R. (2013) 'Antipredatory Behavior of Zebrafish: Adaptive Function and a Tool for Translational Research', *Evolutionary Psychology*, 11(3), p. 147470491301100320.

doi:10.1177/147470491301100308.

Germain, P. *et al.* (2006) 'Overview of nomenclature of nuclear receptors', *Pharmacological Reviews*, 58(4), pp. 685–704. doi:10.1124/pr.58.4.2.

Gershman, S.J. (2019) 'Uncertainty and Exploration', *Decision (Washington, D.C.)*. 2018/10/01, 6(3), pp. 277–286. doi:10.1037/dec0000101.

Ginevra, C. *et al.* (2012) 'Legionella pneumophila sequence type 1/Paris pulsotype subtyping by spoligotyping', *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), pp. 696–701. doi:10.1128/JCM.06180-11.

Glaser, R. and Kiecolt-Glaser, J.K. (2005) 'Stress-induced immune dysfunction: implications for health', *Nature Reviews Immunology*, 5(3), pp. 243–251. doi:10.1038/nri1571.

Goldshmit, Y. *et al.* (2012) 'Fgf-dependent glial cell bridges facilitate spinal cord regeneration in zebrafish.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(22), pp. 7477–92. doi:10.1523/JNEUROSCI.0758-12.2012.

Gomez-Sanchez, E.P. and Gomez-Sanchez, C.E. (2012) 'Central regulation of blood pressure by the mineralocorticoid receptor', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 350(2), pp. 289–298. doi:10.1016/j.mce.2011.05.005.

Gorissen, M. *et al.* (2015) 'Differences in inhibitory avoidance, cortisol and brain gene expression in TL and AB zebrafish', *Genes, Brain and Behavior*, 14(5), pp. 428–438.

Grace, J.K. and Anderson, D.J. (2014) 'Corticosterone stress response shows long-term repeatability and links to personality in free-living Nazca boobies', *General and Comparative Endocrinology*, 208, pp. 39–48.

Griffiths, B.B. *et al.* (2012) 'A zebrafish model of glucocorticoid resistance shows serotonergic modulation of the stress response.', *Frontiers in behavioral neuroscience*, 6(October), p. 68. doi:10.3389/fnbeh.2012.00068.

Grillon, C. (2008) 'Models and mechanisms of anxiety: evidence from startle studies', *Psychopharmacology*, 199(3), pp. 421–437.

Grillon, C., Levenson, J. and Pine, D.S. (2007) 'A single dose of the selective serotonin reuptake inhibitor citalopram exacerbates anxiety in humans: A fear-potentiated startle study', *Neuropsychopharmacology*, 32(1), pp. 225–231. doi:10.1038/sj.npp.1301204.

Groneberg, A.H. *et al.* (2020) 'Early-life social experience shapes social avoidance reactions in larval zebrafish', *Current Biology*, 30(20), pp. 4009–4021.

Grossman, L. *et al.* (2010) 'Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish', *Behavioural Brain Research*, 214(2), pp. 277–284. doi:10.1016/j.bbr.2010.05.039.

Guayasamin, O. (2013) 'Personality matters: a quantitative comparison of asocial and social behaviors in the zebrafish (*Danio rerio*)'.

Gustafsson, J.A. (2016) 'Historical overview of nuclear receptors', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 157, pp. 3–6. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.03.004.

Gustavsson, A. *et al.* (2011) 'Cost of disorders of the brain in Europe 2010', *European Neuropsychopharmacology*, 21(10), pp. 718–779. doi:10.1016/j.euroneuro.2011.08.008.

Haffter, P. *et al.* (1996) 'The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*', *Development*, 123(1), pp. 1–36. doi:10.1242/dev.123.1.1.

Hammen, C. (2005) 'Stress and Depression', *Annual Review of Clinical Psychology*, 1(1), pp. 293–319. doi:10.1146/annurev.clinpsy.1.102803.143938.

Handley, S.L. *et al.* (1993) 'Multiple serotonin mechanisms in animal models of anxiety: Environmental, emotional and cognitive factors', *Behavioural Brain Research*, 58(1), pp. 203–210. doi:https://doi.org/10.1016/0166-4328(93)90104-X.

Harcourt, J.L. *et al.* (2009) 'Personality counts: the effect of boldness on shoal choice in three-spined sticklebacks', *Animal Behaviour*, 77(6), pp. 1501–1505. doi:https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2009.03.004.

Hascoët, M., Bourin, M. and Nic Dhonnchadha, B.A. (2001) 'The mouse light-dark paradigm: A review', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 25(1), pp. 141–166. doi:10.1016/S0278-5846(00)00151-2.

- Hassard, J. *et al.* (2014) *Calculating the cost of work-related stress and psychosocial risks*. Luxembourg.
- Hawken, E.R. *et al.* (2006) 'Effects of oral racemic citalopram on neuroendocrine responses.', *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 30(4), pp. 694–700. doi:10.1016/j.pnpbp.2006.01.017.
- Heinrichs, M. *et al.* (2003) 'Social support and oxytocin interact to suppress cortisol and subjective responses to psychosocial stress', *Biological psychiatry*, 54(12), pp. 1389–1398.
- Henckens, M.J.A.G. *et al.* (2011) 'Time-dependent corticosteroid modulation of prefrontal working memory processing', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011/03/21, 108(14), pp. 5801–5806. doi:10.1073/pnas.1019128108.
- Henry, T.B. *et al.* (2004) 'Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*', *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(9), pp. 2229–2233. doi:https://doi.org/10.1897/03-278.
- Herman, J.P. *et al.* (2005) 'Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 29(8), pp. 1201–1213. doi:10.1016/j.pnpbp.2005.08.006.
- Hessing, M. (1994) *Individual behavioural characteristics in pigs and their consequences for pig industry*. Wageningen Agricultural University.
- Hinkle, L.E. (1974) 'The concept of "stress" in the biological and social sciences', *Psychiatry in Medicine*, 5(4), pp. 335–357. doi:10.2190/91dk-nkad-1xp0-y4rg.
- Höglund, E., Balm, P.H.M. and Winberg, S. (2002) 'Stimulatory and inhibitory effects of 5-HT_{1A} receptors on adrenocorticotrophic hormone and cortisol secretion in a teleost fish, the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*)', *Neuroscience letters*, 324(3), pp. 193–196.
- Holsboer, F. and Barden, N. (1996) 'Antidepressants and Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Regulation', *Endocrine Reviews*, 17(2), pp. 187–205. doi:10.1210/edrv-17-2-187.
- Howe, K. *et al.* (2013) 'The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome', *Nature*, 496(7446), pp. 498–503. doi:10.1038/nature12111.The.
- Hsu, P.D. *et al.* (2013) 'DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases', *Nature biotechnology*. 2013/07/21, 31(9), pp. 827–832. doi:10.1038/nbt.2647.
- Huang, I.J., Sirotkin, H.I. and McElroy, A.E. (2019) 'Varying the exposure period and duration of neuroactive pharmaceuticals and their metabolites modulates effects on the visual motor response in zebrafish (*Danio rerio*) larvae', *Neurotoxicology and Teratology*, 72(November 2018), pp. 39–48. doi:10.1016/j.ntt.2019.01.006.
- Huber, R. *et al.* (1997) 'Serotonin and aggressive motivation in crustaceans: altering the decision to retreat.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(May), pp. 5939–5942. doi:10.1073/pnas.94.11.5939.
- Hughes, S. *et al.* (2016) 'Inhibitory effects of fluoxetine on photosensitive retinal ganglion cells', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57(12), p. 4660.
- Huntingford, F.A. (1976) 'The relationship between anti-predator behaviour and aggression among conspecifics in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*.', *Animal Behaviour*, 24, pp. 245–260.
- Huntingford, F.A. and Turner, A.K. (1987) *Animal conflict*. Chapman an. London.
- Ikeda, A. *et al.* (2021) 'Neu1 deficiency induces abnormal emotional behavior in zebrafish', *Scientific Reports*, 11(1), pp. 1–15. doi:10.1038/s41598-021-92778-9.
- Irons, T D *et al.* (2010) 'Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish', *Neurotoxicology and Teratology*, 32(1), pp. 84–90. doi:https://doi.org/10.1016/j.ntt.2009.04.066.
- Irons, T. D. *et al.* (2010) 'Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish', *Neurotoxicology and Teratology*, 32(1), pp. 84–90. doi:10.1016/j.ntt.2009.04.066.
- Ishino, Y. *et al.* (1987) 'Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product', *Journal of*

Bacteriology, 169(12), pp. 5429–5433. doi:10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.

Ishino, Y., Krupovic, M. and Forterre, P. (2018) 'History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious', *Journal of Bacteriology*, 200(7), pp. e00580-17.

Ito, W. *et al.* (2011) 'BDNF restricted knockout mice as an animal model for aggression.', *Genes, Brain and Behavior*, 10(3), pp. 365–374. doi:10.1038/jid.2014.371.

Jackson, D.A., Peres-Neto, P.R. and Olden, J.D. (2001) 'What controls who is where in freshwater fish communities – the roles of biotic, abiotic, and spatial factors', *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58(1), pp. 157–170. doi:10.1139/f00-239.

Jensen, J.B. *et al.* (1999) 'Acute and long-term treatments with the selective serotonin reuptake inhibitor citalopram modulate the HPA axis activity at different levels in male rats.', *Journal of neuroendocrinology*, 11, pp. 465–471. doi:10.1046/j.1365-2826.1999.00362.x.

Jesus, E.G. de, Hirano, T. and Inui, Y. (1991) 'Changes in cortisol and thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*', *General and Comparative Endocrinology*, 82(3), pp. 369–376. doi:10.1016/0016-6480(91)90312-T.

Jick, H., Kaye, J.A. and Jick, S.S. (2004) 'Antidepressants and the Risk of Suicidal Behaviors', *JAMA*, 292(3), pp. 338–343. doi:10.1001/jama.292.3.338.

Jinek, M. *et al.* (2012) 'A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity', *Science*, 337(6096), pp. 816–821. doi:10.1126/science.1225829.

Jinek, M. *et al.* (2014) 'Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation', *Science*, 343(6176), p. 1247997. doi:10.1126/science.1247997.

Joëls, M. and de Kloet, E.R. (2017) '30 years of the mineralocorticoid receptor: the brain mineralocorticoid receptor: a saga in three episodes', *Journal of Endocrinology*, 234(1), pp. T49–T66.

Joëls, M., Sarabdjitsingh, R.A. and Karst, H. (2012) 'Unraveling the Time Domains of Corticosteroid Hormone Influences on Brain Activity: Rapid, Slow, and Chronic Modes', *Pharmacological Reviews*. Edited by G.E. Gillies, 64(4), pp. 901 LP – 938. doi:10.1124/pr.112.005892.

Johnson, E.O. *et al.* (1992) 'Mechanisms of stress: A dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis', *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 16(2), pp. 115–130. doi:https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80175-7.

Johnson, S.L. and Roberts, J.E. (1995) 'Life events and bipolar disorder: Implications from biological theories', *Psychological Bulletin*, 117(3), pp. 434–449.

Jones, R.B., Satterlee, D.G. and Ryder, F.H. (1994) 'Fear of humans in Japanese quail selected for low or high adrenocortical response', *Physiology & behavior*, 56(2), pp. 379–383.

Juan-García, A. *et al.* (2021) 'Study of locomotion response and development in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae exposed to enniatin A, enniatin B, and beauvericin', *Science of The Total Environment*, 777, p. 146075. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146075.

Kallai, J. *et al.* (2007) 'Cognitive and affective aspects of thigmotaxis strategy in humans.', *Behavioral Neuroscience*. Kallai, Janos: Institute of Behavioral Sciences, University of Pecs, 12 Szigeti Street, Pecs, Hungary, H-7624, janos.kallai@aok.pte.hu: American Psychological Association, pp. 21–30. doi:10.1037/0735-7044.121.1.21.

Kalueff, A. V. *et al.* (2013) 'Towards a Comprehensive Catalog of Zebrafish Behavior 1.0 and Beyond', *Zebrafish*, 10(1), pp. 70–86. doi:10.1089/zeb.2012.0861.

Kalueff, A. V. *et al.* (2014) 'Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders', *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(2), pp. 63–75. doi:10.1016/j.tips.2013.12.002.Zebrafish.

Kalueff, A. V. *et al.* (2016) 'Zebrafish neurobehavioral phenomics for aquatic neuropharmacology and toxicology research', *Aquatic Toxicology*, 170, pp. 297–309. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.08.007.

Kalueff, A. V., Echevarria, D.J. and Stewart, A.M. (2014) 'Gaining translational momentum: More zebrafish models for neuroscience research', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 55, pp. 1–6. doi:https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.01.022.

Kamerbeek, J. *et al.* (1997) 'Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium*

tuberculosis for diagnosis and epidemiology', *Journal of Clinical Microbiology*, 35(4), pp. 907–914. doi:10.1128/jcm.35.4.907-914.1997.

Kandel, E.R. (1991) 'Cellular mechanisms of learning and the biological basis of individuality', *Principles of neural science*, 3, pp. 1009–1031.

Kazlauckas, V. *et al.* (2005) 'Behavioral and cognitive profile of mice with high and low exploratory phenotypes', *Behavioural Brain Research*, 162(2), pp. 272–278. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.03.021.

Kelly, S.P. and Chasiotis, H. (2011) 'Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors regulate paracellular permeability in a primary cultured gill epithelium', *Journal of Experimental Biology*, 214(14), pp. 2308–2318. doi:10.1242/jeb.055962.

Kiilerich, P. *et al.* (2015) 'Interaction between the trout mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in vitro', *Journal of Molecular Endocrinology*, 55(1), pp. 55–68. doi:10.1530/JME-15-0002.

Kiilerich, P., Kristiansen, K. and Madsen, S.S. (2007) 'Cortisol regulation of ion transporter mRNA in Atlantic salmon gill and the effect of salinity on the signaling pathway', *Journal of Endocrinology*, 194(2), pp. 417–427. doi:10.1677/JOE-07-0185.

Kimmel, C.B., Patterson, J. and Kimmel, R.O. (1974) 'The development and behavioral characteristics of the startle response in the zebra fish', *Developmental Psychobiology*, 7(1), pp. 47–60. doi:https://doi.org/10.1002/dev.420070109.

Kino, T. and Chrousos, G.P. (2002) 'Tissue-specific glucocorticoid resistance-hypersensitivity syndromes: Multifactorial states of clinical importance', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 109(4), pp. 609–613. doi:10.1067/mai.2002.123708.

Kirschbaum, C. *et al.* (1995) 'Persistent High Cortisol Responses to Repeated Psychological Stress in a Subpopulation of Healthy Men', *Psychosomatic Medicine*, 57(5). Available at: https://journals.lww.com/psychosomaticmedicine/Fulltext/1995/09000/Persistent_High_Cortisol_R_responses_to_Repeated.9.aspx.

Kiryanova, V., McAllister, B.B. and Dyck, R.H. (2013) 'Long-term outcomes of developmental exposure to fluoxetine: a review of the animal literature', *Developmental neuroscience*, 35(6), pp. 437–449.

de Kloet, E.R. (1991) 'Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control', *Frontiers in Neuroendocrinology*, 12, pp. 95–164.

de Kloet, E.R. *et al.* (1998) 'Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease*', *Endocrine Reviews*, 19(3), pp. 269–301. doi:10.1210/edrv.19.3.0331.

de Kloet, E.R. (2014) 'From Receptor Balance to Rational Glucocorticoid Therapy', *Endocrinology*, 155(8), pp. 2754–2769. doi:10.1210/en.2014-1048.

de Kloet, E.R. (2016) 'Chapter 3 - Corticosteroid Receptor Balance Hypothesis: Implications for Stress-Adaptation', in Fink Cognition, Emotion, and Behavior, G.B.T.-S.C. (ed.). San Diego: Academic Press, pp. 21–31. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800951-2.00003-0.

de Kloet, E.R., Joëls, M. and Holsboer, F. (2005) 'Stress and the brain: from adaptation to disease', *Nature Reviews Neuroscience*, 6(6), pp. 463–475. doi:10.1038/nrn1683.

Koch, M. (1999) 'The neurobiology of startle', *Progress in Neurobiology*, 59(2), pp. 107–128. doi:https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00098-7.

Kohlert, J.G., Mangan, B.P., *et al.* (2012) 'Decreased Aggressive and Locomotor Behaviors in Betta Splendens after Exposure to Fluoxetine', *Psychological Reports*, 110(1), pp. 51–62. doi:10.2466/02.13.PRO.110.1.51-62.

Kohlert, J.G., Mangan, *et al.* (2012) 'DECREASED AGGRESSIVE AND LOCOMOTOR BEHAVIORS IN BETTA SPLENDENS AFTER EXPOSURE TO FLUOXETINE', *Psychological Reports*, 110(1), pp. 51–62. doi:10.2466/02.13.PRO.110.1.51-62.

Kolpin, D.W. *et al.* (2002) 'Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999– 2000: A national reconnaissance', *Environmental science & technology*, 36(6), pp. 1202–1211.

Koolhaas, J.M. *et al.* (1999) 'Coping styles in animals: Current status in behavior and stress-

physiology', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23(7), pp. 925–935. doi:10.1016/S0149-7634(99)00026-3.

Koolhaas, J.M. *et al.* (2010) 'Neuroendocrinology of coping styles: Towards understanding the biology of individual variation', *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(3), pp. 307–321. doi:https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.04.001.

Koolhaas, J.M. *et al.* (2011) 'Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35(5), pp. 1291–1301. doi:10.1016/j.neubiorev.2011.02.003.

Korte, S.M. *et al.* (1992) 'Conditioned neuroendocrine and cardiovascular stress responsiveness accompanying behavioral passivity and activity in aged and in young rats', *Physiology & Behavior*, 51(4), pp. 815–822. doi:https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90120-Q.

Korte, S.M. *et al.* (1997) 'Plasma catecholamine and corticosterone levels during manual restraint in chicks from a high and low feather pecking line of laying hens', *Physiology and Behavior*, 62(3), pp. 437–441. doi:10.1016/S0031-9384(97)00149-2.

Korte, S.M. *et al.* (2005) 'The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease', *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(1), pp. 3–38. doi:https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.08.009.

Kravitz, E. a (2000) 'Serotonin and aggression: insights gained from a lobster model system and speculations on the role of amine neurons in a complex behavior.', *Journal of comparative physiology. A, Sensory, neural, and behavioral physiology*, 186(3), pp. 221–238. doi:10.1007/s003590050423.

Krukoff, T.L. (1999) 'c-fos Expression as a Marker of Functional Activity in the Brain', in *Cell Neurobiology Techniques*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 213–230. doi:10.1385/0-89603-510-7:213.

Kudielka, B.M. *et al.* (2006) 'Exhaustion is associated with reduced habituation of free cortisol responses to repeated acute psychosocial stress', *Biological Psychology*, 72(2), pp. 147–153. doi:10.1016/j.biopsycho.2005.09.001.

Kudielka, B.M. and Kirschbaum, C. (2005) 'Sex differences in HPA axis responses to stress: a review', *Biological Psychology*, 69(1), pp. 113–132. doi:https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2004.11.009.

Kumar, B., Manuja, A. and Aich, P. (2012) 'Stress and its impact on farm animals.', *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 4, pp. 1759–67.

Kurt M., Arik A.C. and Çelik S. (2000) 'The Effects of Sertraline and Fluoxetine on Anxiety in the Elevated Plus-Maze Test', *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 11(2), pp. 173–180. doi:doi:10.1515/JBCPP.2000.11.2.173.

Kwan, W. *et al.* (2016) 'The Central Nervous System Regulates Embryonic HSPC Production via Stress-Responsive Glucocorticoid Receptor Signaling', *Cell stem cell*. 2016/07/14, 19(3), pp. 370–382. doi:10.1016/j.stem.2016.06.004.

Kwong, R.W.M., Kumai, Y. and Perry, S.F. (2014) 'The physiology of fish at low pH: the zebrafish as a model system', *Journal of Experimental Biology*, 217(5), pp. 651–662. doi:10.1242/jeb.091603.

Kyrou, I. and Tsigos, C. (2009) 'Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism', *Current Opinion in Pharmacology*, 9(6), pp. 787–793. doi:10.1016/j.coph.2009.08.007.

Lam, D.D. *et al.* (2011) 'Leptin does not directly affect CNS serotonin neurons to influence appetite.', 13(5), pp. 584–591. doi:10.1016/j.cmet.2011.03.016.Leptin.

De Lange, H.J. *et al.* (2006) 'Behavioural responses of Gammarus pulex (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals', *Aquatic Toxicology*, 78(3), pp. 209–216. doi:10.1016/j.aquatox.2006.03.002.

Lansing, J.S. and Kremer, J.N. (2011) 'Rice, fish, and the planet', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(50), pp. 19841–19842. doi:10.1073/pnas.1117707109.

Larson, E.T., O'Malley, D.M. and Melloni, R.H. (2006) 'Aggression and vasotocin are associated with dominant-subordinate relationships in zebrafish.', *Behavioural brain research*, 167(1), pp. 94–102. doi:10.1016/j.bbr.2005.08.020.

Lawrence, C. (2007) 'The husbandry of zebrafish (Danio rerio): A review', *Aquaculture*, 269(1–4),

pp. 1–20. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.077.

Lazarus, R.S. and Folkman, S. (1984) *Stress, appraisal, and coping*. New York: NY: Springer Publishing Company.

Lee, C.J., Tyler, C.R. and Paull, G.C. (2020) 'Chapter 4 - Geographic Range and Natural Distribution', in Cartner, S.C. et al. (eds) *American College of Laboratory Animal Medicine*. Academic Press, pp. 41–56. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00004-X.

Lee, T.K. et al. (2014) 'Stress-induced behavioral and metabolic adaptations lead to an obesity-prone phenotype in ewes with elevated cortisol responses', *Psychoneuroendocrinology*, 47, pp. 166–177.

Levin, E.D., Bencan, Z. and Cerutti, D.T. (2007) 'Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish', *Physiology and Behavior*, 90(1), pp. 54–58. doi:10.1016/j.physbeh.2006.08.026.

Li, M., Christie, H.L. and Leatherland, J.F. (2012) 'The in vitro metabolism of cortisol by ovarian follicles of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): comparison with ovulated oocytes and pre-hatch embryos', *REPRODUCTION*, 144(6), pp. 713–722. doi:10.1530/REP-12-0354.

Li, Q. et al. (1994) 'Attenuation of hormone responses to the 5-HT_{1A} agonist ipsapirone by long-term treatment with fluoxetine, but not desipramine, in male rats', *Biological psychiatry*, 36(5), pp. 300–308.

Lieschke, G.J. and Currie, P.D. (2007) 'Animal models of human disease: zebrafish swim into view.', *Nature reviews. Genetics*, 8(5), pp. 353–367. doi:10.1038/nrg2091.

Lim, J.E., Porteus, C.S. and Bernier, N.J. (2013) 'Serotonin directly stimulates cortisol secretion from the interrenals in goldfish', *General and Comparative Endocrinology*, 192, pp. 246–255. doi:https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.08.008.

Lindsay, S.M. and Vogt, R.G. (2004) 'Behavioral Responses of Newly Hatched Zebrafish (*Danio rerio*) to Amino Acid Chemostimulants', *Chemical Senses*, 29(2), pp. 93–100. doi:10.1093/chemse/bjh009.

Lister, A. et al. (2009) 'Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: a mechanistic evaluation', *Aquatic toxicology*, 95(4), pp. 320–329.

Liu, H. et al. (2016) 'A High-Content Larval Zebrafish Brain Imaging Method for Small Molecule Drug Discovery', *PLOS ONE*, 11(10), p. e0164645. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164645.

Liu, J. et al. (2010) 'Acute administration of leptin produces anxiolytic-like effects: a comparison with fluoxetine', *Psychopharmacology*. 2009/10/13, 207(4), pp. 535–545. doi:10.1007/s00213-009-1684-3.

Liu, J. et al. (2012) 'Development of Novel Visual-Plus Quantitative Analysis Systems for Studying DNA Double-Strand Break Repairs in Zebrafish', *Journal of Genetics and Genomics*, 39(9), pp. 489–502. doi:https://doi.org/10.1016/j.jgg.2012.07.009.

Lockwood, B. et al. (2004) 'Acute effects of alcohol on larval zebrafish: a genetic system for large-scale screening', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 77(3), pp. 647–654.

López-Patiño, M.A. et al. (2008) 'Anxiogenic effects of cocaine withdrawal in zebrafish', *Physiology & Behavior*, 93(1), pp. 160–171. doi:https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.08.013.

López Patiño, M.A. et al. (2008) 'Gender differences in zebrafish responses to cocaine withdrawal', *Physiology & Behavior*, 95(1), pp. 36–47. doi:https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.03.021.

Lösel, R. and Wehling, M. (2003) 'Nongenomic actions of steroid hormones', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(1), pp. 46–55. doi:10.1038/nrm1009.

MacPhail, R.C. et al. (2009) 'Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol', *NeuroToxicology*, 30(1), pp. 52–58. doi:https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.09.011.

Makarova, K.S. et al. (2006) 'A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: Computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action', *Biology Direct*, 1, pp. 1–26. doi:10.1186/1745-6150-1-7.

Mali, P., Aach, J., et al. (2013) 'CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and

paired nickases for cooperative genome engineering', *Nature Biotechnology*, 31(9), pp. 833–838. doi:10.1038/nbt.2675.

Mali, P., Yang, L., *et al.* (2013) 'RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9', *Science*, 339(6121), pp. 823 LP – 826. doi:10.1126/science.1232033.

Manthey, L. *et al.* (2011) 'Antidepressant use and salivary cortisol in depressive and anxiety disorders', *European Neuropsychopharmacology*, 21(9), pp. 691–699. doi:10.1016/j.euroneuro.2011.03.002.

Manuel, R. *et al.* (2014) 'Unpredictable chronic stress decreases inhibitory avoidance learning in Tuebingen long-fin zebrafish: Stronger effects in the resting phase than in the active phase', *Journal of Experimental Biology*, 217(21), pp. 3919–3928. doi:10.1242/jeb.109736.

Manuel, R. *et al.* (2015) 'Providing a food reward reduces inhibitory avoidance learning in zebrafish', *Behavioural Processes*, 120, pp. 69–72. doi:https://doi.org/10.1016/j.beproc.2015.08.013.

Marcon, M. *et al.* (2018) 'Environmental enrichment modulates the response to chronic stress in zebrafish', *Journal of Experimental Biology*, 221(4). doi:10.1242/jeb.176735.

Martin, J.M. *et al.* (2020) 'Antidepressant exposure causes a nonmonotonic reduction in anxiety-related behaviour in female mosquitofish', *Journal of Hazardous Materials Letters*, 1(September), p. 100004. doi:10.1016/j.hazl.2020.100004.

Martinez, R. *et al.* (2019) 'Developmental fluoxetine exposure in zebrafish reduces offspring basal cortisol concentration via life stage-dependent maternal transmission', *PLOS ONE*, 14(2), p. e0212577. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212577>.

Martinowich, K. and Lu, B. (2008) 'Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders.', *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(1), pp. 73–83. doi:10.1038/sj.npp.1301571.

Martins, T.L.F. *et al.* (2007) 'Speed of exploration and risk-taking behavior are linked to corticosterone titres in zebra finches', *Hormones and Behavior*, 52(4), pp. 445–453.

Maruska, K.P. (2014) 'Social regulation of reproduction in male cichlid fishes', *General and comparative endocrinology*, 207, pp. 2–12.

Masepohl, B., Görlitz, K. and Böhme, H. (1996) 'Long tandemly repeated repetitive (LTRR) sequences in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120', *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1307(1), pp. 26–30. doi:10.1016/0167-4781(96)00040-1.

Matsui, J.I. *et al.* (2006) 'Effects of ethanol on photoreceptors and visual function in developing zebrafish', *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(10), pp. 4589–4597. doi:10.1167/iovs.05-0971.

Matthews, M. and Varga, Z.M. (2012) 'Anesthesia and euthanasia in zebrafish', *ILAR Journal*, 53(2), pp. 192–204. doi:10.1093/ilar.53.2.192.

Matz, C.J. and Krone, P.H. (2007) 'Cell Death, Stress-Responsive Transgene Activation, and Deficits in the Olfactory System of Larval Zebrafish Following Cadmium Exposure', *Environmental Science & Technology*, 41(14), pp. 5143–5148. doi:10.1021/es070452c.

Maximino, C., de Brito, T.M., *et al.* (2010) 'Measuring anxiety in zebrafish: A critical review', *Behavioural Brain Research*, 214(2), pp. 157–171. doi:10.1016/j.bbr.2010.05.031.

Maximino, C., Marques De Brito, T., *et al.* (2010) 'Scototaxis as anxiety-like behavior in fish', *Nature Protocols*, 5(2), pp. 221–228. doi:10.1038/nprot.2009.225.

Maximino, C. *et al.* (2011) 'Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(2), pp. 624–631. doi:https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.01.006.

Maximino, C. *et al.* (2013) 'The serotonergic system of zebrafish: Genomics, neuroanatomy and neuropharmacology', *Serotonin: Biosynthesis, regulation and health implications*, pp. 53–67.

Maximino, C. *et al.* (2014) 'Fluoxetine and WAY 100,635 dissociate increases in scototaxis and analgesia induced by conspecific alarm substance in zebrafish (*Danio rerio* Hamilton 1822)', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 124, pp. 425–433. doi:10.1016/j.pbb.2014.07.003.

McCann, L.I., Koehn, D.J. and Kline, N.J. (1971) 'The effects of body size and body markings on

nonpolarized schooling behavior of zebrafish (*Brachydanio rerio*).', *Journal of Psychology*, 79, pp. 71–5. doi:doi: 10.1080/00223980.1971.9923769. PMID: 5116724.

McCarty, R. (2016) 'Chapter 2 - The Alarm Phase and the General Adaptation Syndrome: Two Aspects of Selye's Inconsistent Legacy', in Fink Cognition, Emotion, and Behavior, G.B.T.-S.C. (ed.). San Diego: Academic Press, pp. 13–19. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800951-2.00002-9.

McCormick, S.D. *et al.* (2008) 'Are we missing a mineralocorticoid in teleost fish? Effects of cortisol, deoxycorticosterone and aldosterone on osmoregulation, gill Na⁺,K⁺ -ATPase activity and isoform mRNA levels in Atlantic salmon.', *General and comparative endocrinology*, 157(1), pp. 35–40. doi:10.1016/j.ygcen.2008.03.024.

McEwen, B.S. (1998) 'Stress, adaptation, and disease: Allostasis and allostatic load.', in *Molecular aspects, integrative systems, and clinical advances*. New York, NY, US: New York Academy of Sciences (Annals of the New York Academy of Sciences.), pp. 33–44.

McEwen, B.S. and Wingfield, J.C. (2003) 'The concept of allostasis in biology and biomedicine.', *Hormones and Behavior*. McEwen, Bruce S.: Lab of Neuroendocrinology, Rockefeller U, Box 165, 1230 York Avenue, New York, NY, US, 10021, mcewen@rockvax.rockefeller.edu: Elsevier Science, pp. 2–15. doi:10.1016/S0018-506X(02)00024-7.

McKittrick, C.R. *et al.* (1995) 'Serotonin receptor binding in a colony model of chronic social stress', *Biological Psychiatry*, 37(6), pp. 383–393. doi:10.1016/0006-3223(94)00152-S.

McLean, D.L. and Fetcho, J.R. (2011) 'Movement, technology and discovery in the zebrafish', *Current opinion in neurobiology*. 2010/10/20, 21(1), pp. 110–115. doi:10.1016/j.conb.2010.09.011.

McWilliams, L.A., Cox, B.J. and Enns, M.W. (2003) 'Mood and anxiety disorders associated with chronic pain: an examination in a nationally representative sample', *PAIN*, 106(1). Available at: https://journals.lww.com/pain/Fulltext/2003/11000/Mood_and_anxiety_disorders_associated_with_chronic.17.aspx.

McWilliams, L.A., Goodwin, R.D. and Cox, B.J. (2004) 'Depression and anxiety associated with three pain conditions: Results from a nationally representative sample', *Pain*, 111(1–2), pp. 77–83. doi:10.1016/j.pain.2004.06.002.

Medan, V. and Preuss, T. (2014) 'The Mauthner-cell circuit of fish as a model system for startle plasticity', *Journal of Physiology-Paris*, 108(2), pp. 129–140. doi:https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.07.006.

Medeiros, L.R. *et al.* (2010) 'The serotonin subtype 1A receptor regulates cortisol secretion in the Gulf toadfish, *Opsanus beta*', *General and comparative endocrinology*, 168(3), pp. 377–387.

Meneses, A. and Liy-Salmeron, G. (2012) 'Serotonin and emotion, learning and memory', *Reviews in the Neurosciences*, 23(5–6), pp. 543–553. doi:10.1515/revneuro-2012-0060.

Meyer, A. and 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', *Current Opinion in Cell Biology*, 11(6), pp. 699–704. doi:https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)00039-3.

Milla, S. *et al.* (2008) 'Plasma 11-deoxycorticosterone (DOC) and mineralocorticoid receptor testicular expression during rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermiation: implication with 17alpha, 20beta-dihydroxyprogesterone on the milt fluidity?', *Reproductive Biology and Endocrinology*, 6(1), p. 19. doi:10.1186/1477-7827-6-19.

Miller, N. and Gerlai, R. (2007) 'Quantification of shoaling behaviour in zebrafish (*Danio rerio*)', *Behavioural Brain Research*, 184(2), pp. 157–166. doi:10.1016/j.bbr.2007.07.007.

Miranda, L.E. (2011) 'Depth as an organizer of fish assemblages in floodplain lakes', *Aquatic Sciences*, 73(2), pp. 211–221. doi:10.1007/s00027-010-0170-7.

Mishra, P., Gong, Z. and Kelly, B.C. (2017) 'Assessing biological effects of fluoxetine in developing zebrafish embryos using gas chromatography-mass spectrometry based metabolomics', *Chemosphere*, 188(1), pp. 157–167. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.08.149.

Mitchell, J.B., Iny, L.J. and Meaney, M.J. (1990) 'The role of serotonin in the development and environmental regulation of type II corticosteroid receptor binding in rat hippocampus', *Developmental Brain Research*, 55(2), pp. 231–235.

- Mojica, F.J.M. *et al.* (2000) 'Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria', *Molecular Microbiology*, 36(1), pp. 244–246. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>.
- Mojica, F.J.M. *et al.* (2005) 'Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements', *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), pp. 174–182. doi:[10.1007/s00239-004-0046-3](https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3).
- Mojica, F.J.M., Juez, G. and Rodriguez-Valera, F. (1993) 'Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites', *Molecular Microbiology*, 9(3), pp. 613–621. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x>.
- Mokrousov, I. *et al.* (2007) 'Corynebacterium diphtheriae spoligotyping based on combined use of two CRISPR loci', *Biotechnology Journal*, 2(7), pp. 901–906. doi:<https://doi.org/10.1002/biot.200700035>.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M. and Moon, T.W. (1999) 'Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation', pp. 211–268.
- Moon, T.W. (2001) 'Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction?', *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129(2), pp. 243–249. doi:[https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00316-5](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00316-5).
- Morando, M.B., Medeiros, L.R. and McDonald, M.D. (2009) 'Fluoxetine treatment affects nitrogen waste excretion and osmoregulation in a marine teleost fish', *Aquatic toxicology*, 95(2), pp. 164–171.
- Munck, A. and Brinck-Johnsen, T. (1968) 'Specific and nonspecific physicochemical interactions of glucocorticoids and related steroids with rat thymus cells in vitro.', *Journal of Biological Chemistry*, 243(21), pp. 5556–5565. doi:[10.1016/s0021-9258\(18\)91904-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)91904-6).
- Mustafa, A. *et al.* (2019) 'The aggressive spiegelanio, carrying a mutation in the fgfr1a gene, has no advantage in dyadic fights with zebrafish of the AB strain', *Behavioural Brain Research*, 370(April), p. 111942. doi:[10.1016/j.bbr.2019.111942](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111942).
- Muto, A. *et al.* (2013) 'Glucocorticoid receptor activity regulates light adaptation in the zebrafish retina', *Frontiers in Neural Circuits*, 7.
- Naert, T. and Vleminckx, K. (2018) 'CRISPR/Cas9 disease models in zebrafish and *Xenopus*: The genetic renaissance of fish and frogs', *Drug Discovery Today: Technologies*, 28, pp. 41–52. doi:[10.1016/j.ddtec.2018.07.001](https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.07.001).
- Nasevicius, A. and Ekker, S.C. (2000) 'Effective targeted gene "knockdown" in zebrafish', *Nature Genetics*, 26(2), pp. 216–220. doi:[10.1038/79951](https://doi.org/10.1038/79951).
- Nasiadka, A. and Clark, M.D. (2012) 'Zebrafish breeding in the laboratory environment', *ILAR Journal*, 53(2), pp. 161–168. doi:[10.1093/ilar.53.2.161](https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.161).
- Naumann, E.A. *et al.* (2010) 'Monitoring neural activity with bioluminescence during natural behavior', *Nature Neuroscience*, 13(4), pp. 513–520. doi:[10.1038/nn.2518](https://doi.org/10.1038/nn.2518).
- Neelkantan, N. *et al.* (2013) 'Perspectives on Zebra fish Models of Hallucinogenic Drugs and Related Psychotropic Compounds'.
- Nelson, J.S. (1994) *Fishes of the world. 3rd edition.* 2019/10/09, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 2019/10/09. Cambridge University Press. doi:[DOI: 10.1017/S0025315400090378](https://doi.org/10.1017/S0025315400090378).
- Nelson, K.E. *et al.* (1999) 'Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*', *Nature*, 399(6734), pp. 323–329. doi:[10.1038/20601](https://doi.org/10.1038/20601).
- Nesan, D. and Vijayan, Mathilakath M (2013) 'Role of glucocorticoid in developmental programming: Evidence from zebrafish', *General and Comparative Endocrinology*, 181, pp. 35–44. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.10.006>.
- Nesan, D. and Vijayan, Mathilakath M. (2013) 'The transcriptomics of glucocorticoid receptor signaling in developing zebrafish', *PLoS ONE*, 8(11), pp. 1–15. doi:[10.1371/journal.pone.0080726](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080726).
- Newton, R. (2000) 'Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important?', *Thorax*, 55(7), pp. 603 LP – 613. doi:[10.1136/thorax.55.7.603](https://doi.org/10.1136/thorax.55.7.603).
- Nielsen, S. *et al.* (1995) 'Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by

inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(4), pp. 1013–1017. doi:10.1073/pnas.92.4.1013.

Ninkovic, J. and Bally-Cuif, L. (2006) 'The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse', *Methods*, 39(3), pp. 262–274. doi:10.1016/j.ymeth.2005.12.007.

Njagi, J. *et al.* (2010) 'Electrochemical quantification of serotonin in the live embryonic zebrafish intestine', *Analytical chemistry*, 82(5), pp. 1822–1830.

Norcross, M. *et al.* (2008) 'Effects of adolescent fluoxetine treatment on fear-, anxiety-or stress-related behaviors in C57BL/6J or BALB/cJ mice', *Psychopharmacology*, 200(3), pp. 413–424.

Norton, W. and Bally-Cuif, L. (2010) 'Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics.', *BMC neuroscience*, 11, p. 90. doi:10.1186/1471-2202-11-90.

Norton, W.H.J. *et al.* (2011) 'Modulation of Fgfr1a signaling in zebrafish reveals a genetic basis for the aggression–boldness syndrome', *Journal of Neuroscience*, 31(39), pp. 13796–13807.

Norton, W.H.J. (2012) 'Measuring Larval Zebrafish Behavior: Locomotion, Thigmotaxis, and Startle BT - Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research', in Kalueff, A. V and Stewart, A.M. (eds). Totowa, NJ: Humana Press, pp. 3–20. doi:10.1007/978-1-61779-597-8_1.

Norton, W.H.J., Folchert, A. and Bally-Cuif, L. (2008) 'Comparative analysis of serotonin receptor (HTR1A/HTR1B families) and transporter (slc6a4a/b) gene expression in the zebrafish brain', *Journal of Comparative Neurology*, 511(4), pp. 521–542. doi:10.1002/cne.21831.

Norton, W.H.J.W. *et al.* (2011) 'Modulation of Fgfr1a signaling in zebrafish reveals a genetic basis for the aggression-boldness syndrome.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(39), pp. 13796–13807. doi:10.1523/JNEUROSCI.2892-11.2011.

Novak, C.M. *et al.* (2005) 'Caloric restriction and physical activity in zebrafish (*Danio rerio*)', *Neuroscience Letters*, 383(1–2), pp. 99–104. doi:10.1016/j.neulet.2005.03.048.

Oakley, R.H. *et al.* (1999) 'The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor β isoform. Specificity and mechanisms of action', *Journal of Biological Chemistry*, 274(39), pp. 27857–27866. doi:10.1074/jbc.274.39.27857.

van Oers, K. *et al.* (2005) 'Contribution of Genetics to the Study of Animal Personalities: A Review of Case Studies', *Behaviour*, 142(9/10), pp. 1185–1206. Available at: <http://www.jstor.org/stable/4536296>.

Ohl, F. (2005) 'Animal Models of Anxiety', in Holsboer, F. and Ströhle, A. (eds) *Anxiety and Anxiolytic Drugs*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 35–69. doi:10.1007/3-540-28082-0_2.

Oliveira, R.F., Silva, J.F. and Simões, J.M. (2011) 'Fighting Zebrafish: Characterization of Aggressive Behavior and Winner–Loser Effects', *Zebrafish*, 8(2), pp. 73–81. doi:10.1089/zeb.2011.0690.

van Oortmerssen, G.A. *et al.* (1990) 'Routine Formation and Flexibility in Social and Non-Social Behaviour of Aggressive and Non-Aggressive Male Mice', *Behaviour*, 112(3–4), pp. 176–193. doi:https://doi.org/10.1163/156853990X00185.

Orger, M.B. *et al.* (2000) 'Perception of Fourier and non-Fourier motion by larval zebrafish', *Nature Neuroscience*, 3(11), pp. 1128–1133. doi:10.1038/80649.

Orger, M.B. and de Polavieja, G.G. (2017) 'Zebrafish behavior: opportunities and challenges', *Annual review of neuroscience*, 40, pp. 125–147.

Orger, M.B. and De Polavieja, G.G. (2017) 'Zebrafish Behavior: Opportunities and Challenges', *Annual Review of Neuroscience*, 40, pp. 125–147. doi:10.1146/annurev-neuro-071714-033857.

Osler, W. (1910) 'The Lumleian Lectures ON ANGINA PECTORIS.', *The Lancet*, 175(4519), pp. 973–977. doi:https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)14114-0.

Oswald, M.E. *et al.* (2013) 'Is behavioral variation along the bold-shy continuum associated with variation in the stress axis in zebrafish?', *Physiological and biochemical zoology : PBZ*, 85(6), pp. 718–28. doi:10.1086/668203.

Øverli, Ø. *et al.* (2002) 'Differences in behaviour between rainbow trout selected for high- and low-stress responsiveness', *Journal of Experimental Biology*, 205(3), pp. 391–395. doi:10.1016/s0079-6123(08)60196-x.

- Øverli, Ø. *et al.* (2004) 'Stress coping style predicts aggression and social dominance in rainbow trout.', *Hormones and behavior*, 45(4), pp. 235–41. doi:10.1016/j.yhbeh.2003.12.002.
- Øverli, Ø. *et al.* (2007) 'Evolutionary background for stress-coping styles : Relationships between physiological , behavioral , and cognitive traits in non-mammalian vertebrates', 31, pp. 396–412. doi:10.1016/j.neubiorev.2006.10.006.
- Owen, J.P. and Kelsh, R.N. (2021) 'A suitable anaesthetic protocol for metamorphic zebrafish', *PLoS one*, 16(3). doi:10.1371/journal.pone.0246504.
- Padilla, S. *et al.* (2011) 'Assessing locomotor activity in larval zebrafish: Influence of extrinsic and intrinsic variables', *Neurotoxicology and Teratology*, 33(6), pp. 624–630. doi:10.1016/j.ntt.2011.08.005.
- Painter, Meghan M. *et al.* (2009) 'Antidepressants at environmentally relevant concentrations affect predator avoidance behavior of larval fathead minnows (*Pimephales promelas*)', *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12), pp. 2677–2684. doi:10.1897/08-556.1.
- Painter, Meghan M *et al.* (2009) 'Antidepressants at environmentally relevant concentrations affect predator avoidance behavior of larval fathead minnows (*Pimephales promelas*)', *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12), pp. 2677–2684.
- Pariante, C.M. (2009) 'Risk factors for development of depression and psychosis. Glucocorticoid receptors and pituitary implications for treatment with antidepressant and glucocorticoids', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1179, pp. 144–152. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04978.x.
- Parker, M.O. *et al.* (2012) 'Housing conditions differentially affect physiological and behavioural stress responses of zebrafish, as well as the response to anxiolytics.', *PLoS one*, 7(4), p. e34992. doi:10.1371/journal.pone.0034992.
- Pather, S. and Gerlai, R. (2009) 'Shuttle box learning in zebrafish', *Behavioural Brain Research*, 196(2), pp. 323–327. doi:10.1016/j.bbr.2008.09.013.Shuttle.
- Paull, G.C. *et al.* (2010) 'Dominance hierarchies in zebrafish (*Danio rerio*) and their relationship with reproductive success.', *Zebrafish*, 7(1), pp. 109–17. doi:10.1089/zeb.2009.0618.
- Pavlidis, M. and Samaras, A. (2020) *Mediterranean Fish Welfare : Guide to Good Practices and Assessment Indicators*.
- Pavlidis, M. *et al.* (2003) 'Evaluation of transportation procedures on water quality and fry performance in red porgy (*Pagrus pagrus*) fry', *Aquaculture*, 218(1), pp. 187–202. doi:https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00314-9.
- Pavlidis, M. *et al.* (2011) 'Adaptive changes in zebrafish brain in dominant-subordinate behavioral context.', *Behavioural brain research*, 225(2), pp. 529–37. doi:10.1016/j.bbr.2011.08.022.
- Pavlidis, M. *et al.* (2013) 'Husbandry of Zebrafish, *Danio Rerio*, and the Cortisol Stress Response.', *Zebrafish*, 00(00). doi:10.1089/zeb.2012.0819.
- Pavlidis, M., Theodoridi, A. and Tsalafouta, A. (2015) 'Neuroendocrine regulation of the stress response in adult zebrafish, *Danio rerio*', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 60, pp. 121–131. doi:10.1016/j.pnpbp.2015.02.014.
- Peeters, F., Nicholson, N.A. and Berkhof, J. (2003) 'Cortisol Responses to Daily Events in Major Depressive Disorder', *Psychosomatic Medicine*, 65(5). Available at: https://journals.lww.com/psychosomaticmedicine/Fulltext/2003/09000/Cortisol_Responses_to_Daily_Events_in_Major.18.aspx.
- Pei, S. *et al.* (2017) 'Erratum: risk of prenatal depression and stress treatment: alteration on serotonin system of offspring through exposure to Fluoxetine', *Scientific reports*, 7.
- Peitsaro, N. *et al.* (2003) 'Modulation of the histaminergic system and behaviour by α -fluoromethylhistidine in zebrafish', *Journal of Neurochemistry*, 86(2), pp. 432–441. doi:https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01850.x.
- Pelli, M. and Connaughton, V.P. (2015) 'Chronic exposure to environmentally-relevant concentrations of fluoxetine (Prozac) decreases survival, increases abnormal behaviors, and delays predator escape responses in guppies', *Chemosphere*, 139, pp. 202–209. doi:https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.033.

- Peng, X. *et al.* (2016) 'Anxiety-related behavioral responses of pentylenetetrazole-treated zebrafish larvae to light-dark transitions', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 145, pp. 55–65. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.03.010>.
- Perreault, H., Semsar, K. and God, J. (2003) 'Fluoxetine treatment decreases territorial aggression in a coral reef fish', *Physiology & Behavior*, 79(4–5), pp. 719–724. doi:10.1016/S0031-9384(03)00211-7.
- Peters, A., McEwen, B.S. and Friston, K. (2017) 'Uncertainty and stress: Why it causes diseases and how it is mastered by the brain', *Progress in Neurobiology*, 156, pp. 164–188. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.05.004>.
- Phillips, J.B. and Westerfield, M. (2014) 'Zebrafish models in translational research: tipping the scales toward advancements in human health', *Disease Models & Mechanisms*, 7(7), pp. 739–743. doi:10.1242/dmm.015545.
- Piato, A.L. *et al.* (2011) 'Acute restraint stress in zebrafish: behavioral parameters and purinergic signaling.', *Neurochemical research*, 36(10), pp. 1876–86. doi:10.1007/s11064-011-0509-z.
- Piato, Â.L. *et al.* (2011) 'Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses.', *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 35(2), pp. 561–7. doi:10.1016/j.pnpbp.2010.12.018.
- Pickering, A.D. and Pottinger, T.G. (1985) 'Acclimation of the brown trout, *Salmo trutta* L., to the stress of daily exposure to malachite green.', *Aquaculture*, 44, pp. 145–152.
- Piferrer, F. and Ribas, L. (2020) *The use of the zebrafish as a model in fish aquaculture research*. 1st edn, *Fish Physiology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi:10.1016/bs.fp.2020.10.003.
- Pippal, J.B. *et al.* (2011) 'Characterization of the zebrafish (*Danio rerio*) mineralocorticoid receptor', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 332(1), pp. 58–66. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.09.014>.
- Pittenger, C. and Duman, R.S. (2008) 'Stress, Depression, and Neuroplasticity: A Convergence of Mechanisms', *Neuropsychopharmacology*, 33(1), pp. 88–109. doi:10.1038/sj.npp.1301574.
- Piwovarska, J. *et al.* (2012) 'Serum cortisol concentration in patients with major depression after treatment with fluoxetine', *Psychiatry Res*, 198(3), pp. 407–411. doi:10.1016/j.psychres.2012.01.029.
- Podhorna, J. and Brown, R.E. (2002) 'Strain differences in activity and emotionality do not account for differences in learning and memory performance between C57BL/6 and DBA/2 mice', *Genes, Brain and Behavior*, 1(2), pp. 96–110. doi:<https://doi.org/10.1034/j.1601-183X.2002.10205.x>.
- Popova, N.K. (2008) 'From gene to aggressive behavior: the role of brain serotonin.', *Neuroscience and behavioral physiology*, 38(5), pp. 471–5. doi:10.1007/s11055-008-9004-7.
- Portas, C.M., Bjorvatn, B. and Ursin, R. (2000) 'Serotonin and the sleep/wake cycle: Special emphasis on microdialysis studies', *Progress in Neurobiology*, 60(1), pp. 13–35. doi:10.1016/S0301-0082(98)00097-5.
- Post, R.M. (1992) 'Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder', *American Journal of Psychiatry*, 149(8), pp. 999–1010. doi:10.1176/ajp.149.8.999.
- Postlethwait, J. (2006) 'The Zebrafish Genome: A Review and msx Gene Case Study', in *Genome Dynamics*, pp. 183–197. doi:10.1159/000095104.
- Pottinger, T.G. (2008) 'The Stress Response in Fish—Mechanisms, Effects and Measurement', *Fish Welfare*. (Wiley Online Books), pp. 32–48. doi:<https://doi.org/10.1002/9780470697610.ch3>.
- Pottinger, T.G. and Carrick, T.R. (1999) 'Modification of the Plasma Cortisol Response to Stress in Rainbow Trout by Selective Breeding', *General and Comparative Endocrinology*, 116(1), pp. 122–132. doi:<https://doi.org/10.1006/gcen.1999.7355>.
- Pottinger, T.G. and Carrick, T.R. (2001) 'Stress Responsiveness Affects Dominant–Subordinate Relationships in Rainbow Trout', *Hormones and Behavior*, 40(3), pp. 419–427. doi:<https://doi.org/10.1006/hbeh.2001.1707>.
- Pourcel, C., Salvignol, G. and Vergnaud, G. (2005) 'CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies', *Microbiology*, 151(3), pp. 653–663. doi:10.1099/mic.0.27437-0.

- Pratt, W.B. (1993) 'The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor', *Journal of Biological Chemistry*, 268(29), pp. 21455–21458. doi:10.1016/s0021-9258(20)80556-0.
- Prunet, P., Sturm, a and Milla, S. (2006) 'Multiple corticosteroid receptors in fish: from old ideas to new concepts.', *General and comparative endocrinology*, 147(1), pp. 17–23. doi:10.1016/j.ygcen.2006.01.015.
- Purdy, R.H. *et al.* (1991) 'Stress-induced elevations of γ -aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain', *Neurobiology*, 88(May), pp. 4553–4557. doi:10.1073/pnas.88.10.4553.
- Rainboth, W. (1994) 'Inland fishes of India and adjacent countries', *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4(1), pp. 135–136. doi:10.1007/BF00043269.
- Raleigh, M.J. *et al.* (1991) 'Serotonergic mechanisms promote dominance acquisition in adult male vervet monkeys', *Brain Research*, 559(2), pp. 181–190. doi:10.1016/0006-8993(91)90001-C.
- Ramsay, J.M. *et al.* (2006) 'Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*', *Aquaculture*, 258(1–4), pp. 565–574. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.04.020.
- Ramsay, J.M. *et al.* (2009) 'Whole-body cortisol response of zebrafish to acute net handling stress', *Aquaculture*, 297(1–4), pp. 157–162. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.08.035.
- Reid, S.G., Bernier, N.J. and Perry, S.F. (1998) 'The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release', *Communicated by Dr P.W. Hochachka, Editor.1*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 120(1), pp. 1–27. doi:https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)00037-1.
- Ribas, V.R. *et al.* (2018) 'Pattern of anxiety, insecurity, fear, panic and/or phobia observed by quantitative electroencephalography (QEEG)', *Dementia & Neuropsychologia*. scielo, pp. 264–271.
- Rice, C. *et al.* (2011) 'Developmental lead exposure causes startle response deficits in zebrafish', *Aquatic Toxicology*, 105(3), pp. 600–608. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.08.014.
- Richendrfer, H. *et al.* (2012) 'On the edge: Pharmacological evidence for anxiety-related behavior in zebrafish larvae', *Behavioural Brain Research*, 228(1), pp. 99–106. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.11.041.
- Riebli, T. *et al.* (2011) 'Behavioural type affects dominance and growth in staged encounters of cooperatively breeding cichlids', *Animal Behaviour*, 81(1), pp. 313–323.
- Rihel, J. *et al.* (2010) 'Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation', *Science*, 327(5963), pp. 348–351.
- Rihel, J. and Schier, A.F. (2012) 'Behavioral screening for neuroactive drugs in zebrafish', *Developmental Neurobiology*, 72(3), pp. 373–385. doi:10.1002/dneu.20910.
- Rivetti, C., Campos, B. and Barata, C. (2016) 'Low environmental levels of neuro-active pharmaceuticals alter phototactic behaviour and reproduction in *Daphnia magna*', *Aquatic Toxicology*, 170, pp. 289–296. doi:10.1016/j.aquatox.2015.07.019.
- Roeser, T. and Baier, H. (2003) 'Visuomotor Behaviors in Larval Zebrafish after GFP-Guided Laser Ablation of the Optic Tectum', *Journal of Neuroscience*, 23(9), pp. 3726–3734. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-09-03726.2003.
- Rosado, B. *et al.* (2011) 'Effect of fluoxetine on blood concentrations of serotonin, cortisol and dehydroepiandrosterone in canine aggression', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 34, pp. 430–436. doi:10.1111/j.1365-2885.2010.01254.x.
- Rossi, A., Barraco, A. and Donda, P. (2004) 'Fluoxetine: a review on evidence based medicine', *Annals of General Hospital Psychiatry*, 3, p. 2. doi:10.1186/1475-2832-3-2.
- Rottmann, R.W., Francis-Floyd, R. and Durborow, R. (1992) 'The Role of Stress in Fish Disease', *Southern Regional Agricultural Center and the Texas Aquaculture Extension Service* [Preprint], (474).
- Roy-Byrne, P.P. *et al.* (1991) 'Neuroendocrine effects of diazepam in panic and generalized anxiety disorders', *Biological psychiatry*, 30(1), pp. 73–80.
- Rozeboom, A.M., Akil, H. and Seasholtz, A.F. (2007) 'Mineralocorticoid receptor overexpression in forebrain decreases anxiety-like behavior and alters the stress response in mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(11), pp. 4688–4693.

- Ruhl, N. and McRobert, S.P. (2005) 'The effect of sex and shoal size on shoaling behaviour in *Danio rerio*', *Journal of Fish Biology*, 67(5), pp. 1318–1326.
- Ruis, M.A.W. *et al.* (2000) 'Personalities in female domesticated pigs: Behavioural and physiological indications.', *Applied Animal Behaviour Science*, 66(1–2), pp. 31–47. doi:10.1016/S0168-1591(99)00070-2.
- Ruiz-Gomez, M. de L. *et al.* (2011) 'Response to environmental change in rainbow trout selected for divergent stress coping styles', *Physiology & Behavior*, 102(3), pp. 317–322. doi:https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.11.023.
- Sailer, C.D., Radenic, S.J. and Wisenden, B.D. (2012) 'A Method for Sorting Zebrafish on the Exploratory-Boldness Behavioral Axis BT - Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research', in Kalueff, A. V and Stewart, A.M. (eds). Totowa, NJ: Humana Press, pp. 145–151. doi:10.1007/978-1-61779-597-8_10.
- Saint-Amant, L. and Drapeau, P. (1998) 'Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo', *Journal of Neurobiology*, 37(4), pp. 622–632. doi:https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(199812)37:4<622::AID-NEU10>3.0.CO;2-S.
- Saint-Amant, L. and Drapeau, P. (2003) 'Whole-cell patch-clamp recordings from identified spinal neurons in the zebrafish embryo', *Methods in Cell Science*, 25(1), pp. 59–64. doi:10.1023/B:MICS.0000006896.02938.49.
- Sakamoto, T. *et al.* (2016) 'Principal function of mineralocorticoid signaling suggested by constitutive knockout of the mineralocorticoid receptor in medaka fish', *Scientific reports*, 6, p. 37991. doi:10.1038/srep37991.
- Salchner, P. and Singewald, N. (2002) 'Neuroanatomical substrates involved in the anxiogenic-like effect of acute fluoxetine treatment', *Neuropharmacology*, 43(8), pp. 1238–1248. doi:https://doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00329-5.
- Sallinen, V. *et al.* (2009) 'Hyperserotonergic phenotype after monoamine oxidase inhibition in larval zebrafish', *Journal of Neurochemistry*, 109(2), pp. 403–415. doi:https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05986.x.
- Samaras, A. and Pavlidis, M. (2020) 'A Modified Protocol for Cortisol Analysis in Zebrafish (*Danio rerio*), Individual Embryos, and Larvae', *Zebrafish*, 17(6), pp. 394–399. doi:10.1089/zeb.2020.1898.
- Sapolsky, R.M., Krey, L.C. and McEwen, B.S. (1984) 'Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(19), pp. 6174–6177.
- Sareen, J. *et al.* (2005) 'The relationship between anxiety disorders and physical disorders in the U.S. National Comorbidity Survey', *Depression and Anxiety*, 21(4), pp. 193–202. doi:10.1002/da.20072.
- Sathiyaa, R. and Vijayan, M.M. (2003) 'Autoregulation of glucocorticoid receptor by cortisol in rainbow trout hepatocytes', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 284(6 53-6), pp. 1508–1515. doi:10.1152/ajpcell.00448.2002.
- Saverino, C. and Gerlai, R. (2008) 'The social zebrafish: behavioral responses to conspecific, heterospecific, and computer animated fish.', *Behavioural brain research*, 191(1), pp. 77–87. doi:10.1016/j.bbr.2008.03.013.
- Scerbina, T., Chatterjee, D. and Gerlai, R. (2012) 'Dopamine receptor antagonism disrupts social preference in zebrafish: a strain comparison study', *Amino acids*, 43(5), pp. 2059–2072.
- Schaaf, M.J.M. *et al.* (2008) 'Discovery of a functional glucocorticoid receptor β -isoform in zebrafish', *Endocrinology*, 149(4), pp. 1591–1598. doi:10.1210/en.2007-1364.
- Scheid, C. and Noë, R. (2010) 'The performance of rooks in a cooperative task depends on their temperament', *Animal Cognition*, 13(3), pp. 545–553.
- Schjolden, J. *et al.* (2005) 'Divergence in behavioural responses to stress in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with contrasting stress responsiveness', *Hormones and Behavior*, 48(5), pp. 537–544. doi:10.1016/j.yhbeh.2005.04.008.
- Schmidt, M. V *et al.* (2009) 'Postnatal glucocorticoid excess due to pituitary glucocorticoid receptor

- deficiency: differential short-and long-term consequences', *Endocrinology*, 150(6), pp. 2709–2716.
- Schnörr, S.J. *et al.* (2012) 'Measuring thigmotaxis in larval zebrafish', *Behavioural Brain Research*, 228(2), pp. 367–374. doi:10.1016/j.bbr.2011.12.016.
- Schoneveld, O.J.L.M., Gaemers, I.C. and Lamers, W.H. (2004) 'Mechanisms of glucocorticoid signalling', *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1680(2), pp. 114–128. doi:10.1016/j.bbaexp.2004.09.004.
- Schreck, C. (2000) 'Accumulation and long-term effects of stress in fish.', in.
- Schulte-Merker, S. and Stainier, D.Y.R. (2014) 'Out with the old, in with the new: reassessing morpholino knockdowns in light of genome editing technology', *Development*, 141(16), pp. 3103–3104. doi:10.1242/dev.112003.
- Sebire, M. *et al.* (2015) 'Prozac affects stickleback nest quality without altering androgen, spiggin or aggression levels during a 21-day breeding test', *Aquatic Toxicology*, 168, pp. 78–89. doi:10.1016/j.aquatox.2015.09.009.
- Seckl, J.R. *et al.* (1991) 'Distribution of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNA expression in human postmortem hippocampus', *Brain Research*, 561(2), pp. 332–337. doi:https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91612-5.
- Selye, H. (1936) 'A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents.', *Nature*, 138, p. 32.
- Selye, H. (1950) 'Stress and the general adaptation syndrome', *British medical journal*, 1(4667), pp. 1383–1392. doi:10.1136/bmj.1.4667.1383.
- Selye, H. (1952) 'The Story of the Adaptation Syndrome.', *JBJS*, 35(3). Available at: https://journals.lww.com/jbjsjournal/Fulltext/1953/35030/The_Story_of_the_Adaptation_Syndrome__Hans_Selye,.45.aspx.
- Selye, H. (1973) 'The Evolution of the Stress Concept: The originator of the concept traces its development from the discovery in 1936 of the alarm reaction to modern therapeutic applications of syntoxic and catatoxic hormones', *American Scientist*, 61(6), pp. 692–699. Available at: <http://www.jstor.org/stable/27844072>.
- Serra, E.L., Medalha, C.C. and Mattioli, R. (1999) 'Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment.', *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]*, 32(12), pp. 1551–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10585639>.
- Seyedabadi, M. *et al.* (2014) 'The role of serotonin in memory: interactions with neurotransmitters and downstream signaling', *Experimental Brain Research*, 232(3), pp. 723–738. doi:10.1007/s00221-013-3818-4.
- Sharma, S. *et al.* (2009) 'The function of wall-following behaviors in the Mexican blind cavefish and a sighted relative, the Mexican tetra (*Astyanax*)', *Journal of Comparative Physiology A*, 195(3), pp. 225–240. doi:10.1007/s00359-008-0400-9.
- Shields, F.D. and Knight, S.S. (2013) 'Floodplain restoration with flood control: Fish habitat value of levee borrow pits', *Ecological Engineering*, 53, pp. 217–227. doi:https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.12.046.
- Shiozaki, K. *et al.* (2020) 'Neuropeptide Y deficiency induces anxiety-like behaviours in zebrafish (*Danio rerio*)', *Scientific Reports*, 10(1), p. 5913. doi:10.1038/s41598-020-62699-0.
- Shmakov, S. *et al.* (2017) 'Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems', *Nature Reviews Microbiology*, 15(3), pp. 169–182. doi:10.1038/nrmicro.2016.184.
- Al Shuraiqi, A., Al-Habsi, A. and Barry, M.J. (2021) 'Time-, dose- and transgenerational effects of fluoxetine on the behavioural responses of zebrafish to a conspecific alarm substance', *Environmental Pollution*, 270, p. 116164. doi:10.1016/j.envpol.2020.116164.
- Sih, A., Bell, A. and Johnson, J.C. (2004) 'Behavioral syndromes: An ecological and evolutionary overview', *Trends in Ecology and Evolution*, 19(7), pp. 372–378. doi:10.1016/j.tree.2004.04.009.
- Silverman, M.N. and Sternberg, E.M. (2012) 'Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1261(1), pp. 55–63. doi:https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06633.x.

Simon, N.G. and Lu, S.F. (2005) 'Androgens and aggression.', in Nelson, R.J. (ed.) *Biology of aggression*. Oxford University Press.

Simon, N.M. *et al.* (2002) 'Hypothyroidism and hyperthyroidism in anxiety disorders revisited: New data and literature review', *Journal of Affective Disorders*, 69(1–3), pp. 209–217. doi:10.1016/S0165-0327(01)00378-0.

Simon, P., Dupuis, R. and Costentin, J. (1994) 'Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions', *Behavioural Brain Research*, 61(1), pp. 59–64. doi:https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90008-6.

Sireeni, J. *et al.* (2020) 'Profound effects of glucocorticoid resistance on anxiety-related behavior in zebrafish adults but not in larvae', *General and Comparative Endocrinology*, 292(January). doi:10.1016/j.ygcen.2020.113461.

Smith, B.R. and Blumstein, D.T. (2010) 'Behavioral types as predictors of survival in Trinidadian guppies (*Poecilia reticulata*)', *Behavioral Ecology*, 21(5), pp. 919–926.

Somers, J.M. *et al.* (2006) 'Prevalence and incidence studies of anxiety disorders: A systematic review of the literature', *Canadian Journal of Psychiatry*, 51(2), pp. 100–113. doi:10.1177/070674370605100206.

Sorribes, A. *et al.* (2013) 'The ontogeny of sleep-wake cycles in zebrafish: a comparison to humans', *Frontiers in neural Circuits*, 7, p. 178.

Sousa, N., Almeida, O.F.X. and Wotjak, C.T. (2006) 'A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents', *Genes, Brain and Behavior*, 5(s2), pp. 5–24. doi:https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00228.x.

Souza, R.R. *et al.* (2014) 'Paradoxical mineralocorticoid receptor-mediated effect in fear memory encoding and expression of rats submitted to an olfactory fear conditioning task', *Neuropharmacology*, 79, pp. 201–211.

Speedie, N. and Gerlai, R. (2008) 'Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*)', *Behavioral Brain Research*, 188(1), pp. 168–177. doi:10.1016/j.bbr.2007.10.031.Alarm.

Spence, R. *et al.* (2006) 'The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh', *Journal of Fish Biology*, 69(5), pp. 1435–1448. doi:https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01206.x.

Spence, R. *et al.* (2007) 'Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh', *Journal of Fish Biology*, 71(1), pp. 304–309. doi:10.1111/j.1095-8649.2007.01492.x.

Spence, R. *et al.* (2008) 'The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*.', *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 83(1), pp. 13–34. doi:10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x.

Spence, R. and Smith, C. (2006) 'Mating preference of female zebrafish, *Danio rerio*, in relation to male dominance', *Behavioral Ecology*, 17(5), pp. 779–783. doi:10.1093/beheco/arl016.

Spence, R., Smith, C. and Ashton, R. (2007) 'Oviposition decisions are mediated by spawning site quality in wild and domesticated zebrafish, *Danio rerio*', *Behaviour*, 144(8), pp. 953–966. doi:https://doi.org/10.1163/156853907781492726.

Stainier, D.Y.R., Kontarakis, Z. and Rossi, A. (2015) 'Making sense of anti-sense data', *Developmental Cell*, 32(1), pp. 7–8. doi:10.1016/j.devcel.2014.12.012.

Steenbergen, P.J., Richardson, M.K. and Champagne, D.L. (2011a) 'Patterns of avoidance behaviours in the light/dark preference test in young juvenile zebrafish: A pharmacological study', *Behavioural Brain Research*, 222(1), pp. 15–25. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.025.

Steenbergen, P.J., Richardson, M.K. and Champagne, D.L. (2011b) 'The use of the zebrafish model in stress research.', *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 35(6), pp. 1432–51. doi:10.1016/j.pnpbp.2010.10.010.

Steimer, T. (2011) 'Animal models of anxiety disorders in rats and mice: Some conceptual issues', *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 13(4), pp. 495–506. doi:10.31887/dcns.2011.13.4/tsteimer.

Sterling, P. (2012) 'Allostasis: A model of predictive regulation', *Physiology & Behavior*, 106(1), pp. 5–15. doi:https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.06.004.

Sterling, P. and Eyer, J. (1988) 'Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology.', in

Handbook of life stress, cognition and health. Oxford, England: John Wiley & Sons, pp. 629–649.

Sternberg, S.H. *et al.* (2014) 'DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9', *Nature*, 507(7490), pp. 62–67. doi:10.1038/nature13011.

Stewart, A. *et al.* (2010) 'The Developing Utility of Zebrafish in Modeling Neurobehavioral Disorders', *Journal International Journal of Comparative Psychology*, 23(1), pp. 104–120. Available at: <https://escholarship.org/uc/item/6hc254ds>.

Stewart, A., Maximino, C., *et al.* (2011) 'Neurophenotyping of Adult Zebrafish Using the Light/Dark Box Paradigm', in Kalueff, A. V and Cachat, J.M. (eds) *Zebrafish Neurobehavioral Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 157–167. doi:10.1007/978-1-60761-953-6_13.

Stewart, A., Wu, N., *et al.* (2011) 'Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(6), pp. 1421–1431. doi:10.1016/j.pnpbp.2010.11.035.

Stewart, A.M. *et al.* (2012) 'Understanding spatio-temporal strategies of adult zebrafish exploration in the open field test', *Brain Research*, 1451, pp. 44–52. doi:10.1016/j.brainres.2012.02.064.

Stewart, A.M., Grossman, L., *et al.* (2014) 'Aquatic toxicology of fluoxetine: Understanding the knowns and the unknowns', *Aquatic Toxicology*, 156, pp. 269–273. doi:10.1016/j.aquatox.2014.08.014.

Stewart, A.M., Nguyen, M., *et al.* (2014) 'Developing zebrafish models of autism spectrum disorder (ASD)', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 50, pp. 27–36. doi:10.1016/j.pnpbp.2013.11.014.

Stewart, A. M. *et al.* (2015) 'Molecular psychiatry of zebrafish', *Molecular Psychiatry*, 20(1), pp. 2–17. doi:10.1038/mp.2014.128.

Stewart, Adam Michael *et al.* (2015) 'Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank To bedside.', 37(5), pp. 264–278. doi:10.1016/j.tins.2014.02.011.Stewart.

Stien, L.H. *et al.* (2020) 'Assessing Fish Welfare in Aquaculture', in Kristiansen, T.S. *et al.* (eds) *The Welfare of Fish*. Cham: Springer International Publishing, pp. 303–321. doi:10.1007/978-3-030-41675-1_13.

Stolte, E.H. *et al.* (2008) 'Corticosteroid receptors involved in stress regulation in common carp, *Cyprinus carpio*.', *The Journal of endocrinology*, 198(2), pp. 403–17. doi:10.1677/JOE-08-0100.

Stöwe, M. *et al.* (2010) 'Selection for fast and slow exploration affects baseline and stress-induced corticosterone excretion in Great tit nestlings, *Parus major*', *Hormones and Behavior*, 58(5), pp. 864–871.

Streisinger, G. *et al.* (1981) 'Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*)', *Nature*, 291(5813), pp. 293–296. doi:10.1038/291293a0.

Stubbs, B. *et al.* (2016) 'The epidemiology of back pain and its relationship with depression, psychosis, anxiety, sleep disturbances, and stress sensitivity: Data from 43 low- and middle-income countries', *General Hospital Psychiatry*, 43, pp. 63–70. doi:10.1016/j.genhosppsy.2016.09.008.

Sturm, A. *et al.* (2005) '11-deoxycorticosterone is a potent agonist of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mineralocorticoid receptor', *Endocrinology*, 146(1), pp. 47–55.

Summers, C.H. *et al.* (2005) 'Glucocorticoid interaction with aggression in non-mammalian vertebrates: reciprocal action', *European journal of pharmacology*, 526(1–3), pp. 21–35.

Summers, C.H. and Winberg, S. (2006) 'Interactions between the neural regulation of stress and aggression.', *The Journal of experimental biology*, 209(Pt 23), pp. 4581–9. doi:10.1242/jeb.02565.

Sumpter, J.P., Donnachie, R.L. and Johnson, A.C. (2014) 'The apparently very variable potency of the anti-depressant fluoxetine', *Aquatic Toxicology*, 151, pp. 57–60. doi:10.1016/j.aquatox.2013.12.010.

Suriyampola, P.S. *et al.* (2015) 'Zebrafish Social Behavior in the Wild', *Zebrafish*, 13(1), pp. 1–8. doi:10.1089/zeb.2015.1159.

Szuhany, K.L., Bugatti, M. and Otto, M.W. (2015) 'A meta-analytic review of the effects of exercise on brain-derived neurotrophic factor', *Journal of Psychiatric Research*, 60, pp. 56–64.

doi:10.1016/j.jpsychires.2014.10.003.

Takahashi, A. *et al.* (2011) 'Brain serotonin receptors and transporters: Initiation vs. termination of escalated aggression.', *Psychopharmacology*, 213, pp. 183–212. doi:10.1007/s00213-010-2000-y.

Takahashi, H. and Sakamoto, T. (2013) 'The role of "mineralocorticoids" in teleost fish: Relative importance of glucocorticoid signaling in the osmoregulation and "central" actions of mineralocorticoid receptor', *General and Comparative Endocrinology*, 181, pp. 223–228. doi:https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.11.016.

Talling, J.C. and Lemoalle, J. (1998) *Ecological dynamics of tropical inland waters*. Cambridge: Cambridge University Press.

Tang, Y. *et al.* (2021) 'Environmental level of the antidepressant venlafaxine induces behavioral disorders through cortisol in zebrafish larvae (*Danio rerio*)', *Neurotoxicology and Teratology*, 83(September 2020), p. 106942. doi:10.1016/j.ntt.2020.106942.

Taylor, G. *et al.* (1996) 'Male reproductive systems under chronic fluoxetine or trimipramine treatment', *Physiology & behavior*, 59(3), pp. 479–485.

Taylor, J.S. *et al.* (2003) 'Genome duplication, a trait shared by 22,000 species of ray-finned fish', *Genome Research*, 13(3), pp. 382–390. doi:10.1101/gr.640303.

Teles, M.C. *et al.* (2013) 'Social modulation of brain monoamine levels in zebrafish.', *Behavioural brain research*, 253C, pp. 17–24. doi:10.1016/j.bbr.2013.07.012.

Terova, G. *et al.* (2005) 'Quantification of a glucocorticoid receptor in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) reared at high stocking density.', *Gene*, 357(2), pp. 144–51. doi:10.1016/j.gene.2005.06.016.

'The Principles of Humane Experimental Technique' (1960) *Medical Journal of Australia*, 1(13), p. 500. doi:https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x.

Thompson, R.F. and Spencer, W.A. (1966) 'Habituation: A model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior.', *Psychological Review*. US: American Psychological Association, pp. 16–43. doi:10.1037/h0022681.

Tinbergen, N. (1972) 'On the orientation of the digger wasp *Philanthus triangulum* Fabr. I', *The animal in its world*, 1, pp. 103–127.

Torres, G. *et al.* (1998) 'Fluoxetine induces the transcription of genes encoding c-fos, corticotropin-releasing factor and its type 1 receptor in rat brain', *Neuroscience*, 87(2), pp. 463–477. doi:10.1016/S0306-4522(98)00147-X.

Tran, S. and Gerlai, R. (2013) 'Individual differences in activity levels in zebrafish (*Danio rerio*)', *Behavioural Brain Research*, 257, pp. 224–229. doi:10.1016/j.bbr.2013.09.040.

Treit, D. and Fundytus, M. (1988) 'Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats.', *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. Netherlands: Elsevier Science, pp. 959–962. doi:10.1016/0091-3057(88)90413-3.

Tronche, F. *et al.* (1999) 'Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety', *Nature Genetics*, 23(1), pp. 99–103. doi:10.1038/12703.

Tsalafouta, A. *et al.* (2018) 'Characterization and Expression Dynamics of Key Genes Involved in the Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) Cortisol Stress Response during Early Ontogeny', *Marine Biotechnology*, 20(5), pp. 611–622. doi:10.1007/s10126-018-9833-5.

Tudorache, C., Schaaf, M.J.M. and Slabbekoorn, H. (2013) 'Covariation between behaviour and physiology indicators of coping style in zebrafish (*Danio rerio*)', *Journal of Endocrinology*, 219(3), pp. 251–258. doi:10.1530/JOE-13-0225.

Uchida, D. *et al.* (2002) 'Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish', *Journal of Experimental Biology*, 205(6), pp. 711–718. doi:10.1242/jeb.205.6.711.

Vachon-Preseau, E. (2018) 'Effects of stress on the corticolimbic system: implications for chronic pain', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 87(July 2017), pp. 216–223. doi:10.1016/j.pnpbp.2017.10.014.

Vaswani, M., Linda, F.K. and Ramesh, S. (2003) 'Role of selective serotonin reuptake inhibitors in

psychiatric disorders: a comprehensive review', *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 27(1), pp. 85–102. doi:S0278-5846(02)00338-X [pii].

Veenema, A.H. *et al.* (2003) 'Differences in basal and stress-induced HPA regulation of wild house mice selected for high and low aggression', 43, pp. 197–204. doi:10.1016/S0018-506X(02)00013-2.

Vera-Chang, M.N. *et al.* (2018) 'Transgenerational hypocortisolism and behavioral disruption are induced by the antidepressant fluoxetine in male zebrafish *Danio rerio*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(52), pp. E12435–E12442. doi:10.1073/pnas.1811695115.

Vera-Chang, M.N., Moon, T.W. and Trudeau, V.L. (2019) 'Cortisol disruption and transgenerational alteration in the expression of stress-related genes in zebrafish larvae following fluoxetine exposure', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 382(August), p. 114742. doi:10.1016/j.taap.2019.114742.

Verbeek, P., Iwamoto, T. and Murakami, N. (2007) 'Differences in aggression between wild-type and domesticated fighting fish are context dependent', *Animal Behaviour*, 73(1), pp. 75–83.

Vignet, C. *et al.* (2013) 'Systematic Screening of Behavioral Responses in Two Zebrafish Strains', *Zebrafish*, 00(00), p. 130605081839008. doi:10.1089/zeb.2013.0871.

Vijayan, M.M., Aluru, N. and Leatherland, J.F. (2010) 'Stress response and the role of cortisol.', in *Fish diseases and disorders, Volume 2*. CABI Publishing.

Voichick, N., Topping, D.J. and Griffiths, R.E. (2018) 'Technical note: False low turbidity readings from optical probes during high suspended-sediment concentrations', *Hydrology and Earth System Sciences*, 22(3), pp. 1767–1773. doi:10.5194/hess-22-1767-2018.

Volgin, A.D. *et al.* (2019) 'Zebrafish models for personalized psychiatry: Insights from individual, strain and sex differences, and modeling gene x environment interactions', *Journal of Neuroscience Research*, 97(4), pp. 402–413. doi:https://doi.org/10.1002/jnr.24337.

Vos, T. *et al.* (2017) 'Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016', *The Lancet*, 390(10100), pp. 1211–1259. doi:10.1016/S0140-6736(17)32154-2.

Vythilingam, M. *et al.* (2004) 'Hippocampal volume, memory, and cortisol status in major depressive disorder: effects of treatment', *Biological Psychiatry*, 56(2), pp. 101–112. doi:10.1016/j.biopsych.2004.04.002.

Walker, S.E. *et al.* (2017) 'Constitutive differences in glucocorticoid responsiveness to stress are related to variation in aggression and anxiety-related behaviors', *Psychoneuroendocrinology*, 84(June), pp. 1–10. doi:10.1016/j.psyneuen.2017.06.011.

Wallace, C.K. *et al.* (2018) 'Effectiveness of Rapid Cooling as a Method of Euthanasia for Young Zebrafish (*Danio rerio*)', *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 57(1), pp. 58–63.

Wallace Deckel, A. *et al.* (1998) 'Lateralized effects of ethanol on aggression and serotonergic systems in *Anolis carolinensis*', *Brain Research*, 807(1–2), pp. 38–46. doi:10.1016/S0006-8993(98)00718-5.

Wang, Y. *et al.* (2006) 'Characterization and expression of serotonin transporter genes in zebrafish', *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 208, pp. 267–274. doi:10.1620/tjem.208.267.

Weber-Hamann, B. *et al.* (2007) 'Resistin and adiponectin in major depression: the association with free cortisol and effects of antidepressant treatment', *Journal of psychiatric research*, 41(3–4), pp. 344–350. doi:10.1016/j.jpsychires.2006.01.002.

Weinberger II, J. and Klaper, R. (2014) 'Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow)', *Aquatic toxicology*, 151, pp. 77–83.

Weinberger, J.I. and Klaper, R. (2014) 'Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow).', *Aquatic Toxicology*, 151, pp. 77–83. doi:10.1016/j.aquatox.2013.10.012.

- Wendelaar Bonga, S E (1997) 'The stress response in fish.', *Physiological Reviews*, 77(3), pp. 591–625.
- Wendelaar Bonga, S.E. (1997) 'The stress response in fish', *Physiological Reviews*, 77(3), pp. 591–625. doi:10.1152/physrev.1997.77.3.591.
- Westerfield, M. (2000) *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed. University of Oregon Press, Eugene.
- Weyts, F.A.A. *et al.* (1999) 'Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish', *Fish and Shellfish Immunology*, 9(1), pp. 1–20. doi:10.1006/fsim.1998.0170.
- Whirledge, S. and DeFranco, D.B. (2018) 'Glucocorticoid signaling in health and disease: Insights from tissue-specific GR knockout mice', *Endocrinology*, 159(1), pp. 46–61. doi:10.1210/en.2017-00728.
- White, R.M. (2015) 'Cross-species oncogenomics using zebrafish models of cancer', *Current Opinion in Genetics & Development*, 30, pp. 73–79. doi:https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.04.006.
- Williams, C.H. and Hong, C.C. (2016) 'Zebrafish small molecule screens: Taking the phenotypic plunge', *Computational and structural biotechnology journal*, 14, pp. 350–356. doi:10.1016/j.csbj.2016.09.001.
- Williams, J.S. and Williams, G.H. (2003) '50th Anniversary of Aldosterone', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(6), pp. 2364–2372. doi:10.1210/jc.2003-030490.
- Wilson, A.J. *et al.* (2011) 'Integrating personality research and animal contest theory: aggressiveness in the green swordtail *Xiphophorus helleri*', *PLoS One*, 6(11), p. e28024.
- Winberg, S. *et al.* (1997) 'Serotonin as a regulator of hypothalamic-pituitary-interrenal activity in teleost fish', *Neuroscience letters*, 230(2), pp. 113–116.
- Winder, V.L. *et al.* (2012) 'Fluoxetine effects on sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) locomotor activity', *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 47(1), pp. 51–58.
- Wirrcer, E. *et al.* (2017) 'Homeodomain protein Otp affects developmental neuropeptide switching in oxytocin neurons associated with a long-term effect on social behavior', *eLife*. Edited by J.K. Elmquist, 6, p. e22170. doi:10.7554/eLife.22170.
- Wong, D.T., Bymaster, F.P. and Engleman, E.A. (1995) 'Prozac (fluoxetine, lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: Twenty years since its first publication', *Life Sciences*, 57(5), pp. 411–441. doi:10.1016/0024-3205(95)00209-0.
- Wong, K. *et al.* (2010) 'Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*)', *Behavioural Brain Research*, 208(2), pp. 450–457. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.023.
- Wong, R.Y., French, J. and Russ, J.B. (2019) 'Differences in stress reactivity between zebrafish with alternative stress coping styles', *Royal Society Open Science*, 6(5). doi:10.1098/rsos.181797.
- Wong, R.Y., Oxendine, S.E. and Godwin, J. (2013a) 'Behavioral and neurogenomic transcriptome changes in wild-derived zebrafish with fluoxetine treatment.', *BMC genomics*, 14(1), p. 348. doi:10.1186/1471-2164-14-348.
- Wong, R.Y., Oxendine, S.E. and Godwin, J. (2013b) 'Behavioral and neurogenomic transcriptome changes in wild-derived zebrafish with fluoxetine treatment', *BMC Genomics*, 14(1), p. 348. doi:10.1186/1471-2164-14-348.
- Wright, D. *et al.* (2006) 'QTL Analysis of Behavioral and Morphological Differentiation Between Wild and Laboratory Zebrafish (*Danio rerio*)', *Behavior Genetics*, 36(2), p. 271. doi:10.1007/s10519-005-9029-4.
- Wright, D. and Krause, J. (2006a) 'Repeated measures of shoaling tendency in zebrafish (*Danio rerio*) and other small teleost fishes', 1(4), pp. 1828–1831. doi:10.1038/nprot.2006.287.
- Wright, D. and Krause, J. (2006b) 'Repeated measures of shoaling tendency in zebrafish (*Danio rerio*) and other small teleost fishes', *Nature Protocols*, 1(4), pp. 1828–1831.
- Yang, M. *et al.* (2014) 'Growth inhibition and coordinated physiological regulation of zebrafish (*Danio rerio*) embryos upon sublethal exposure to antidepressant amitriptyline', *Aquatic Toxicology*, 151, pp. 68–76. doi:10.1016/j.aquatox.2013.12.029.

Yewers, M.S.C., Pryke, S. and Stuart-Fox, D. (2016) 'Behavioural differences across contexts may indicate morph-specific strategies in the lizard *Ctenophorus decresii*', *Animal Behaviour*, 111, pp. 329–339.

Young, E.A. *et al.* (2004) 'HPA axis activation in major depression and response to fluoxetine: a pilot study', *Psychoneuroendocrinology*, 29(9), pp. 1198–1204. doi:<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2004.02.002>.

Yuan, M. *et al.* (2018) 'Behavioral and metabolic phenotype indicate personality in zebrafish (*Danio rerio*)', *Frontiers in Physiology*, 9(MAY), pp. 1–10. doi:10.3389/fphys.2018.00653.

Zebrafish Developmental Timeline (2022) *BioRender*.

Zhang, T.Y. *et al.* (2013) 'Epigenetic mechanisms for the early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression in rodents and humans', *Neuropsychopharmacology*, 38(1), pp. 111–123.

Zhou, J. and Cidlowski, J.A. (2005) 'The human glucocorticoid receptor: One gene, multiple proteins and diverse responses', *Steroids*, 70(5-7 SPEC. ISS.), pp. 407–417. doi:10.1016/j.steroids.2005.02.006.

Zindler, F. *et al.* (2020) 'Do environmentally relevant concentrations of fluoxetine and citalopram impair stress-related behavior in zebrafish (*Danio rerio*) embryos?', *Chemosphere*, 261, p. 127753. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.127753.

Ziv, L. *et al.* (2012) 'An affective disorder in zebrafish with mutation of the glucocorticoid receptor', *Molecular Psychiatry*, 18(6), pp. 681–691. doi:10.1038/mp.2012.64.

Ziv, L. *et al.* (2013) 'An affective disorder in zebrafish with mutation of the glucocorticoid receptor', *Molecular psychiatry*. 2012/05/29, 18(6), pp. 681–691. doi:10.1038/mp.2012.64.