

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Biológiai Intézet, Ökológiai Tanszék

**Vazotocin és vazoaktív intestinalis polipeptid agyi
expressziójának nemtől és szaporodási stádiumtól
függő változásai zebra-pintyeken**



Készítette: Udvardy Szabina
Biológia BSc

Témavezető: Dr. Zachar Gergely
tudományos munkatárs
Semmelweis Egyetem; Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

Belső konzulens: Szabó Krisztián
tudományos segédmunkatárs
SZIE-ÁOTK, Biológiai Intézet



Budapest
2016

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	2
1. Bevezetés.....	3
2. Irodalmi áttekintés.....	4
2.1. A zebra-pinty.....	4
2.2. Az agyi szociális hálózat.....	5
2.3. Vazotocin.....	9
2.4. Vazoaktív intestinalis polipeptid.....	13
3. Célkitűzések.....	15
4. Anyag és módszer.....	16
4.1. A zebra-pintyek és tartási körülményeik.....	16
4.2. Az agyak eltávolítása.....	17
4.3. Az agyak feldolgozása.....	17
4.3.1. Immunhisztokémia.....	18
4.3.2. Lefedés.....	18
4.4. A metszetek kiértékelése.....	19
4.4.1. Fénymikroszkópia.....	19
4.4.2. Képanalízis.....	21
4.4.3. Statisztika.....	21
5. Eredmények.....	22
5.1. AVT.....	22
5.2. VIP.....	26
6. Diskusszió.....	29
7. Összefoglalás.....	34
8. Abstract.....	35
9. Irodalomjegyzék.....	36
10. Köszönetnyilvánítás.....	40

Rövidítések jegyzéke

AH – anterior hypothalamus

AVT – arginin-vazotocin

AVP – arginin-vazopresszin

BSTm – bed nucleus of stria terminalis

CoA - commissura anterior

DBC - decussatio brachiorum conjuntivorum

GnRH – gonadotropin-releasing hormon

ICo – nucleus intercollicularis

LS – lateralis septum (LS1, LS2, LS3: rostralis, medialis, illetve caudalis LS)

mPoa – medialis preopticus area

OT – oxitocin

PAG –periaqueductal grey, periaqueductalis szürkeállomány

PBS – phosphate buffered saline, foszfát-puffer

Poa – preopticus area

PVN – paraventricular nucleus of hypothalamus

TSM - tractus septomesencephalicus

VIP – vazoaktív intestinalis polipeptid

1. Bevezetés

A szülői utódgondozás fontos része az emberek szociális viselkedésének, így természetes hogy sok, modellállaton végzett kutatás irányul efelé. Azonban a hagyományos laboratóriumi rágcsálók szülői stratégiája eltér az emberétől, így nem a legmegfelelőbbek ezen kérdéskör tanulmányozására. A madaraknál gyakori monogámia és ehhez sokszor társuló kétszülős utódgondozás (Burley & Johnson, 2002) alternatív modellállatokat kínál a szülői viselkedés kutatására. Zebrapintyek (*Taeniopygia guttata*) esetében a hím és a tojó is inkubálja a tojásokat és eteti a fiókákat, közel egyenlő arányban (Zann, 1996), így a nemek közti anatómiai eltérés is vizsgálható az agyban.

Egyes agyterületek és a köztük húzódó neurotranszmitter rendszer egyéb szociális interakciók esetén, mint pl. egyedek közötti kapcsolatok kialakítása, vagy a territorialitás széleskörűen vizsgált, azonban szerepük a szülői viselkedésben mindeztáig ismeretlen.

Ezek miatt döntöttünk úgy, hogy kutatásunk az arginin-vasotocin (AVT) és a vazóaktív intestinalis peptid (VIP) eloszlására irányul különböző stádiumban lévő hím és tojó zebrapintyek esetében azon agyterületekben, melyek fontos szerepet játszanak a szociális viselkedés szabályozásában.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A zebrapinty

A díszpintyfélék (Estrildidae) családjához tartozó zebrapinty (*Taeniopygia guttata*) Ausztrália széleskörűen elterjedt endemikus magevő énekesmadara. Természetes élőhelyén az aszály ideje és hosszúsága nem prediktálható, így ezen pintyek és egyéb élőlények számára létfontosságúak a vízjárta területek, ahol táplálékot és élőhelyet találnak maguknak a száraz időszakban is (Zann, 1996). Ameddig megfelelő mennyiségű víz és táplálék elérhető, addig fészekaljat fészekalj után nevelnek fel. A készletek kimerülésével alábbhagy a reprodukció mértéke, ami a hereméret és az ovuláció dehidratáció hatására bekövetkező csökkenésével magyarázható (Christensen & Vleck, 2008). Bár a szaporodásmódjuk opportunistá a kiszámíthatatlan környezeti tényezőknek köszönhetően, tavasszal kicsit többször figyeltek meg náluk reprodukív viselkedést. (Zann, 1996).

A 90-300 egyedből álló kolóniákban (Goodson, 2005) fészkelő zebrapinty szociálisan monogám, de társa halála esetén új párt választ (Zann, 1996). Azonban a laborban összepárosított párok hím egyedei ugyanúgy udvarolnak párjuknak, mintha a hímek maguk választották volna partnerüket (Ihle et al., 2015). Párjuk felé hajlamosak szinte azonnal kötődést kialakítani (Klatt & Goodson, 2013a). Az emberen kívül eddig egyedül a zebrapintynél mutattak ki asszortatív párválasztó stratégiát. Ez a társválasztó viselkedés kiszámíthatatlan környezetben biztos szaporodási lehetőséget nyújthat gyengébb minőségű madaraknak is. (Holveck & Riebel, 2010)

Kétszülős utódgondozás figyelhető meg náluk, vagyis a hím és a tojó is részt vesz a fészeképítésben, inkubációban¹ és a fiókák etetésében. A tojók kicsivel talán több energiát fektetnek az utódgondozásba, de nagy különbségek fedezhetők fel párok közt. Átlagosan 5 tojásból áll egy fészekalj, azonban a magas embrió és fióka mortalitás miatt a fészekaljak feléből repül csak ki fióka a vadonban (Zann, 1996).

A fiatal madarak leghamarabb 50-60 napon állnak párba, így sokszor születésük évében már létre is hoznak fészekaljat, ami átlagosan 5 tojásból áll. Az inkubáció általában 14 napig tart, és 19 nap szükséges a fiókák kirepüléséig (Zann, 1996).

A japán fűrj (*Coturnix japonica*) és a házityúk (*Gallus gallus domesticus*) után talán a zebrapinty a legkedveltebb laboratóriumi madár kis termete, opportunistá szaporodásmódja, igénytelen életmódja, illetve viszonylag rövid életmenete miatt.

¹ A tojások keltetése

² A mesotocin és oxitocin szerkezete egyedül a 8. aminosavban tér el, ami mesotocin esetében izoleucin.

Domesztikált egyedeinél is gyors a kötődés kialakulása és emberközelen is szívesen költenek. (Zann, 1996). A legtöbb laborállattal ellentétben reprodukciójukat nem a fotoperiódus hanem a csapadék mennyisége szabályozza. Így gonádjuk nem mutat ciklikus aktivitást, sosem fejlődik teljesen vissza még kifejezetten kedvezőtlen környezeti körülmények alatt sem. Gonádjaik mérete és aktivitása csökken, de javuló környezeti feltételek esetén gyors válaszra képesek (Harding & Rowe, 2003). Mivel reprodukciójukat a víz és táplálékelérhetőség limitálja, laboratóriumban képesek egész évben szaporodni (Zann, 1996)

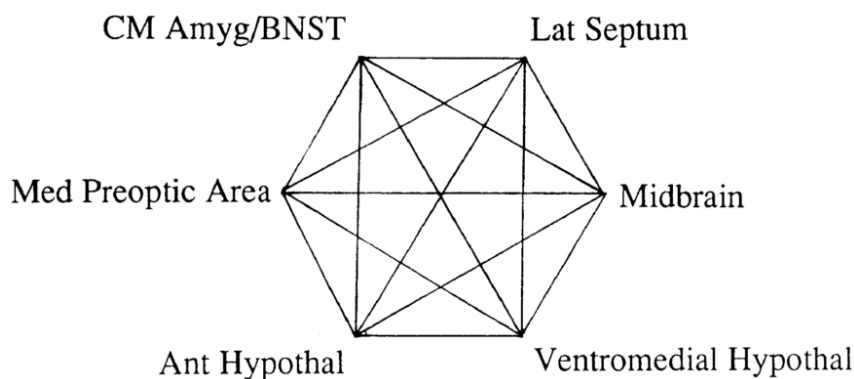
Ezen tulajdonságainak köszönhetően évtizedeken keresztül volt modellállata az idegrendszeri kísérleteknek. Ismerjük reprodukív fiziológiáját és a nonapeptidek szerepét számos szocioszexuális viselkedésben. Genomjának teljes szekvenciájának ismeretében egyre fontosabb lesz viselkedésgenetikai és genomikai kutatásokban is (Klatt & Goodson, 2013a; Leung et al., 2011).

Fontos kérdés azonban, hogy a kutatások során vizsgált zebra-pintyék mennyire különböznek vadon élő társaiktól, tehát mennyire lehet általánosítani az eredményeket. Forstmeier és társainak munkája (2007) bemutatta, hogy a laboratóriumokban tartott pintyék vesztettek genetikai változatosságukból, de még így is nagyfokú polimorfizmust mutatnak, nem estek át komoly palacknyak-hatáson ausztráliai társaikhoz képest. Azonban arra felhívja a figyelmet, hogy a kutatóknak figyelemmel kell lennie a madarak származására, ugyanis az észak-amerikai és európai populációk közt jelentős különbséget fedeztek fel, ami igazolhatja a kutatások eltérő eredményeit illetve azok más laborok általi megismételhetetlenségét.

2.2. Az agyi szociális hálózat

Az agyi szociális hálózat elmélete Newman (1999) felvetésén alapul, aki észrevette, hogy emlősökben bizonyos agyterületek nem elkülönült, lineáris szabályozói egyes szociális viselkedéseknek. Hímek és nőstények szociális viselkedéseit kutató, lézió, elektromos stimuláción, hormon és neurofarmakológiai manipuláción és azonnali korai gén expresszió alapuló vizsgálatok arra mutattak, hogy a limbikus területek együttese alakítja ezen viselkedéseket, úgy mint pl. a nőstény szexuális viselkedést és agressziót, territoriális jelölést és az ehhez fűződő agressziót, anyai viselkedést és anyai agressziót. Ezen területek pedig a következők: medialis kiterjesztett amygdala, lateralis septum (LS), medialis preopticus area (mPOA), anterior hypothalamus (AH), ventromedial nucleus és a

szomszédos ventrolateralis hypothalamus, valamint a középagy periaqueductalis szürkeállománya (periaqueductal gray, PAG) és szomszédos tegmentalis területek (1. ábra). Newman felvázolja, hogy a kognitív funkciókat elősegítő kérgi hálózatokhoz hasonlóan ezen területek egy kéreg alatti limbikus hálózatot alkotnak, melyek a szex-szteroidok által szabályozott szociális viselkedések létrehozásában és szabályozásában vesznek részt.



1. ábra: Az agyi szociális hálózat részei Newman elképzelése szerint (1999) – BSTm, LS, középagy, ventromedialis hypothalamus, AH, mPoa.

Ahhoz, hogy egy területet vagy sejtcsoportot a szociális hálózat csomópontjának tekinthessünk, bizonyos feltételeknek teljesülniük kell. Ezen területek mindegyike kölcsönös kapcsolatban áll az összes többi ilyen csomóponttal, neuronjai gonadális hormon receptort tartalmaznak, és több mint egy szociális viselkedés aktivációjában vagy szabályozásában vesznek részt. Newman feltételezte, hogy egy adott szociális viselkedés nem egy csomópont ki- vagy bekapcsolt állapotának eredménye, hanem ezen hálózat aktivációs mintázatából ered, tehát viselkedések összetett sorrendje (pl.: hím szexuális viselkedés: szaglászás, hágás, ejakulálás, tisztálkodás) mely a hálózat aktivitásának dinamikus időbeli mintázatából következik.

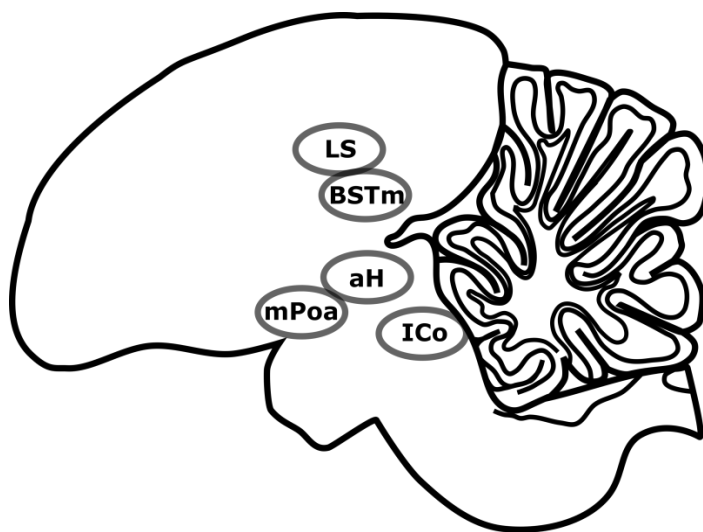
Az agyterületek közti kapcsolat és azok érzékenysége a szex szteroidokra és a perinatális fejlődés kritikus időszak alatti érzékenység a nemi hormonok organizációs hatására függ az állat fajtától. Az állat nemétől pedig függ a nemi szteroidok jelenléte az agyban ezen kritikus periódus alatt. A szteroidok hatására a szociális hálózat szexuálisan dimorffá válik, vagyis a sejtek és specifikus sejtípusok száma az adott csomópontban nemenként el fog térni. Természetesen a szex-szteroidokra való érzékenység és az idegi összeköttetések dinamikusan változnak az élet során a szexuális érettséggel, tanulási

tapasztalattal, reprodukció és napi ciklussal, betegséggel és öregedéssel. Rövidebb időtávon pedig másik állat szagából, érzékelésből, színekből, mozgásból és hangokból beérkező szenzoros stimulusok által. Ezen stimulusok azonnali változást okoznak a szociális hálózat csomópontjainak szinaptikus aktivitásában, mely hatás a szinaptikus kapcsolat erősségétől függően akár hosszútávú változásokhoz vezethet. Az adott egyed legjellemzőbb szociális válasza az evolúciónak köszönhetően részben gének által determinált, részben az egyedfejlődés által befolyásolt.

Az emlősökre értelmezett szociális hálózat elképzelését Goodson (2005) kiterjesztette az összes gerincesre. Ezt elsősorban a madarak és emlősök szociális hálózatának idegi összeköttetésén, hisztokémiáján és szex szteroid receptorok elhelyezkedésén alapuló nagyfokú hasonlóság tette lehetővé, megállapításai azonban ugyanúgy igazak a halakra, kétélűekre és hüllőkre is. Ezen hasonlóságok és a viselkedéssel megfigyelések arra utalnak, hogy a szociális hálózat a gerincesek agyának alapvető és evolúciósan konzerválódott struktúrája. Ezen felül Goodson tisztázza, hogy a szociális hálózat csomópontjain kívül az emlős agy rendkívül sok szociális viselkedés szempontjából releváns agyterület tartalmaz, így Newman hálózatát a szociális agy magjának kéne tekinteni, nem pedig egészének. Egy másik kutatásában munkatársaival (Goodson et al., 2005) olyan adatokat kapott amelyek azt sugallták, hogy a társas viselkedés változásával együtt specifikus változások következnek be az agyi szociális hálózatban, hiszen nem találtak agyi különbséget két pinyfaj között amelyekben a koloniális viselkedés egymástól függetlenül jött létre az evolúció során. Érdeemes megemlíteni, hogy emlősökben a szociális hálózatot a mezolimbikus dopaminerg rendszerrel társítják, így Newman hálózatát a kiterjesztéssel együtt a szociális döntéshozó hálózat névvel illetik (Goodson & Kingsbury, 2014). Ez a hálózat azonban egyelőre a csomópontok megfelelő homológjainak hiányában nem terjeszthető ki más gerincesekre.

A szociális hálózat egyik csomópontja a mPOA, mely a kopulációs (Balthazart & Ball, 2007) és szülői (Dulac et al., 2014; Pfaff et al., 2009) viselkedés szabályozója és felelős a párkötődés kialakulásáért is (Young et al., 2012). Az anterior hypothalamust elsősorban az agresszióval társítják (Goodson et al., 2012). A hippokampuszból legerősebb bemenetet kapó (Goodson, 2005) laterális septumhoz szintén társítják az agressziót (Maney et al., 2005), a szülői gondoskodást (Dulac et al., 2014), csoportalkotó viselkedést (Kingsbury et al., 2013), párkötődés kialakulását (Klatt & Goodson, 2013a) és a szociális felismerést (Kabelik et al., 2010). A kiterjesztett amygdalához tartozik az általam vizsgált (2. ábra) medialis bed nucleus of stria terminalis (BSTm) is (Goodson &

Kingsbury, 2014), ami az agresszív viselkedést (Maney et al., 2005), a párkötődést (Montagnese et al., 2014), és a csoportos viselkedést (Kingsbury et al., 2013; Kingsbury, 2015) is szabályozza. A középgagy részét képezi a PAG (Goodson & Kingsbury, 2014), amelynek egy része homológ madarakban az általam kutató nucleus intercollicularis (ICo) területével (Kingsbury et al., 2015). Az ICo-t eddig kopulációs viselkedéshez (Goodson & Kingsbury, 2014), agresszióhoz (Goodson & Kingsbury, 2014), de legfőképpen a vokalizációhoz társították (Soediono, 1989). Ez utóbbi viselkedés, mivel énekesmadarokról van szó, fontos része a párzási és egyéb szociális magatartásnak.



2. ábra Az általam vizsgált területek elhelyezkedése saggittalis metszeten

Számos taxonon végzett neurobiológiai kutatás bebizonyította, hogy a szociális viselkedést - komplexitása ellenére - lehet azt molekuláris, celluláris és rendszerek szintjén is tanulmányozni. Ezen tanulmányok jelentős része a neuropeptidekre koncentrál, melyek több tulajdonságuk miatt is megfelelőnek bizonyulnak a viselkedés szabályozására. Először is, az előagyban diffúzan expresszálódó monoaminokkal vagy aminosav neurotranszmitterekkel ellentétben a legtöbb neuropeptid és receptora diszkrét idegi pályákra lokalizálódik. Másodsor, a neuropeptidok neuromodulátorként is funkcionálnak relatív lassú, elhúzó hatással az idegi funkciókra. Végezetül, néhány neuropeptid rendszer nagymértékű plaszticitást mutat a szteroid hormon koncentráció élettani fluktuációja alatt és a fejlődés során (Insel & Young, 2000).

2.3. Vazotocin

A vazotocin, más néven arginin-vazotocin a nem-emplős gerincesek szervezetében jelen lévő nonapeptid, tehát 9 aminosav-származékból épül fel (Goodson & Bass, 2001). A gerincesek nonapeptidjei az arginin-vazotocin feltételezhetően 450 milliárd évvel ezelőtti korai halakban bekövetkezett ősi duplikációjából alakultak ki, így jött létre az oxitocin (OT) és a vazotocin klád (Goodson & Thompson, 2010; Klatt & Goodson, 2013a, 2013b). Az emlősöknél széleskörben kutatott oxitocin nem-emplős homológjai a halak szervezetében előforduló izotocin és a tüdőshalak, kétéltűek, hüllők, madarak (és néhány erszényes) testében jelen lévő mezotocin (Ile⁸-OT)². A vazopresszin pedig a vazotocin (Ile³-VP) homológja emlősöknél. Ezeknek a peptideknek mind a funkciójuk, mind a szerkezetük magas szinten konzerválódott a gerincesekben, a vazotocin és oxitocin egyetlen aminosavban tér el egymástól (Kelly & Goodson, 2014a; Klatt & Goodson, 2013a, 2013b).

Magnocelluláris és parvocelluláris nonapeptid sejtcsoportok megtalálhatók a preopticus area és a hypothalamus területén (Poa-AH) az összes gerinces esetében. A parvocelluláris sejtek alkotják a viselkedésre releváns vazotocin/vazopresszin (AVT/AVP) rendszer konzerválódott központját. Ezen régió AVT/AVP elemei számos fajban szexuálisan dimorfak és érzékenyek a gonadális hormonokra (Goodson & Bass, 2001; Soediono, 1989), viszont az opportunista módon szaporodó zebraapinty esetében a vazotocin-immunoreaktív sejtek számát a kifejlett egyedekben nem szabályozza szteroid hormon (Kabelik et al, 2010). A parvocelluláris sejtekkel ellentétben a magnocelluláris sejtcsoportok csak néhány faj esetében mutatnak szexuális dimorfizmust, és a központi nyúlványok hiánya arra utal, hogy ezek a sejtek nem szabályozzák közvetlenül a viselkedést. Hatással lehetnek azonban élettani változásokra a hipofízisen keresztül, mely különböző viselkedéseket válthat ki (pl. szülői tisztogató viselkedés) (Goodson & Bass, 2001). A Poa-AH sejtcsoportjaiból nyúlványok indulnak ki több felé: az agyalapi mirigy hátulsó lebenyéből a nonapeptidek bejutnak a véráramba; a hipofízis elülső lebenyének eminentia mediana területén a nonapeptidek az adrenokortikotropin kibocsátását stimulálják; míg az agy hátsó részében a vegetatív funkciókat befolyásolják. Ezen peptidek intrahipotalamikus kibocsátása számos viselkedést szabályoz, melyeket evolúciósan megelőzött és kiegészített a környezetre és szociális stresszorokra adott élettani reakciók

² A mesotocin és oxitocin szerkezete egyedül a 8. aminosavban tér el, ami mesotocin esetében izoleucin.

szabályozása (Goodson & Thompson, 2010). A direkt innerváción kívül a vazotocin parakrin jelátviteli utakon keresztül is hathat (Kelly & Goodson, 2013, 2014a).

A nonapetpidek a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok alcsaládjának alkotórészeivel lépnek kapcsolatba, így kifejtve hatásukat. Ezidáig halakban, kétéltűekben, madarakban és emlősökben négy releváns receptort fedeztek fel, melyek többé-kevésbé megfeleltethetők egymásnak (1. táblázat). A madarakban a VT1, VT2, VT3 és VT4 található meg, melyek eloszlása fajonként és fajon belül is változik, így szinte korlátlan funkcionális variációt eredményezhet (Albers, 2015; Goodson & Thompson, 2010; Klatt & Goodson, 2013a; Leung et al., 2011).

1. táblázat: A vazopresszin-oxitocin peptid család receptorainak nevezéktana gerincesekben (Albers, 2015)

Emlősök	V1a	V1b	V2	OT
Madarak	VT4	VT2	VT1	VT3
Hüllők	-	-	-	-
Kétéltűek	V1a	V3/V1b	V2	MT
Halak	V1a1/V1a2	-	V2	IT

A VT1 az agyban és az uterusban expresszálódik, a vazotocin-szerű hormonokat nagyobb hatékonysággal köti, mint az oxitocin-szerűeket. Filogenetikailag az emlős V2 receptorral egy csoportba tartozik. A másodjára felfedezett VT2 receptor a VT1-hez hasonlóan nagyobb hatásfokkal köti a vazotocint, mint a mezotocint. Nagy számban expresszálódik az agyalapi mirigy elülső lebenyének kortikotropin sejtjeiben. Elsődleges funkciója a vazotocin hatását közvetíteni az adrenokortikotropin hormon szekréciójára stressz alatt. A viselkedés szempontjából legrelevánsabb receptoroknak a VT3 és VT4 bizonyulnak, melyek az énekesmadarak agyában széleskörűen expresszálódnak (Leung et al., 2011). Mivel a vesében jelen lévő V2 receptor homológja a madaraknál nem expresszálódik ott, így a madarakban a VT4 receptor relatív fontosabb lehet a vazotocin emlős homológjához, a vazopresszinhez (másnéven antidiuretikus hormon) társított funkcióhoz, vagyis a vízháztartás egyensúlyának beállításához (Klatt & Goodson, 2013b). Leung és munkatársai (2011) kimutatták, hogy a neuropeptid kötőhelyek és a receptor mRNS-ének expressziója a paraventricularis nucleus (PVN) és az amigdala egy részét leszámítva³ ugyanazon a helyen található. Ez arra utal, hogy a receptorok a neuronok

³ Nem tartalmazznak kötőhelyet

sejttestében vagy közelükben expresszálódnak; vagy esetleg az mRNA transzkriptum azokra a területekre szállítódik, ahol a receptorok expresszálódnak.

Azáltal, hogy a nonapeptidek számos agyterületre, illetve a vérárammal akár az egész testbe eljutnak, rendkívül fontos szabályozó szerepük van. A vazotocin az elsődleges vízháztartás-szabályozó hormon a madarakban (Harding & Rowe, 2003), hasonlóképpen mint homológja, a vazopresszin az emlősökben. Ezen felül szabályozza a tojásrakást azáltal, hogy közvetlen indukálja az uterus izmainak összehúzódását, pont úgy mint az oxitocin (Norris, 2011). Ezeken kívül vérnyomás-szabályozó szerepe is van (Leung et al., 2011), és hatással van a GnRH szekréciójára (Soediono, 1989).

A vazotocin számos viselkedéssel is kapcsolatba hozható, nem véletlenül az egyik legszéleskörűbben vizsgált peptid az ilyen kutatásokban. Homológjával, a vazopresszinnel együtt szerepük van a hibernációra, helyzetváltoztatásra, tisztálkodó viselkedésre, felderítő viselkedésre, tanulásra és memóriára, illetve többféle szociális viselkedésre is, melyeket Goodson és Bass (2001) összefoglaló cikkükben gyűjtöttek össze. Szociális viselkedésen belül hatással vannak a kémiai jelölésre, vokalizációra, szülői viselkedésre, szexuális viselkedésre, kötődés és társválasztásra, agresszióra, szociális felismerésre és még a fajok között kialakuló eltérő stratégiára is. Klatt és Goodson (2013a) kutatásuk alapján azt gondolják, hogy a nonapeptid sejtestek és axon nyúlványok nagymértékű hasonlósága miatt a vazotocin alapmechanizmusának célja a párkötődés kialakulása emlősökben és madarakban egyaránt. Azonban a vazotocinnak és vazopresszinnek legszélesebb körben megalapozott szerepe a vokalizációra kifejtett szabályozó hatása (Goodson & Bass, 2001).

A vazotocin hatását számos tényező befolyásolja. Transzkripciója függ nemtől, szociális kontextustól és a személyiségtől is (Kelly & Goodson, 2014b), így nem meglepő hogy ezek a különbségek a viselkedésben is megjelennek. Ezen felül a viselkedési hatások változnak fajtól, gonadális nemtől és hormonális kondíciótól függően is. Maney és munkatársai (2005) kutatásaik során fajon belüli eltérést is kimutattak a fehér torkú verébsármánynál (*Zonotrichia albicollis*). Az agresszívabb, fehér fejtetőcsíkos morfológiájú egyedek nagyobb vazotocin-immunoreaktivitást mutattak a caudalis LS ventrolateralis részén és BSTm területén, abban a két régióban, mely az agresszív viselkedéssel áll kapcsolatban a gerinceseknél. Általában az AVT /AVP széleskörűben társított a hím viselkedési formákkal, habár ez részben a csak hímek által bemutatott (pl. társ hívása) viselkedések hangsúlya miatt lehet. (Goodson & Bass, 2001). Goodson és Bass (2001) cikkükben azt is kifejtik, hogy habár az AVT/AVP jelenléte egy adott régióban utalhat egy adott funkcióra, ezen peptidek eloszlására és az adott viselkedésre

erős hatása van a receptorok eloszlásának, ami evolúciósan könnyen változhat. Ez segít megmagyarázni, hogy az AVT/AVP által szabályozott viselkedések miért hasonlóak a gerinces taxonokban, míg a hatásuk iránya (gátlás vagy elősegítés) még igazán közeli fajok között is eltérhet. Erre az egyik legjobb példa Goodson (1998) kutatása, ami rávilágított arra, hogy a szintén Estrildidae családba tartozó territoriális gránátpintynél (*Uraeginthus granatina*) az AVT intraszeptális infúziója gátolja az agresszív viselkedést, míg egy korábbi kutatásban arra az eredményre jutottak, hogy a koloniális zebra-pintynél elősegíti azt (Goodson & Adkins-Regan, 1999).

Mint említettem, a vazotocinnak fajspecifikus hatása is előfordul, így érdemes megvizsgálni az eddig felhalmozódott információkat zebra-pinty esetében. A kanárrival (*Serinus canaria*) ellentétben - feltételezhetően az opportunistáknak köszönhetően - a zebra-pintyben a vazotocin nem mutat feltűnő szezonális változást (Voorhuis & de Kloet, 1992). Úgy tűnik, a vazotocin minden évszakban fontos szerepet játszik. Gátolhatja, illetve stimulálhatja az udvarlási viselkedést dózistól, androgén állapottól, és exogén esetben a beadás helyétől függően (Harding & Rowe, 2003). Klatt és Goodson (2013a) kísérletében a perifériásan bejuttatott VT3 antagonisták erőteljesen csökkentették a fészkelési viselkedését tojóknál, míg a VT4 antagonisták gyengébb hatást fejtettek ki, mely mindkét nem esetében megfigyelhető volt. A centrálisan bejuttatott antagonisták egyáltalán nem fejtettek ki hatást a fészkelési magatartásra. Ez arra utal, hogy az antagonisták hatásai perifériásan, a petevezetékén keresztül érvényesülnek. Harding és Rowe (2003) kutatásai alapján azt feltételezik, hogy a vazotocin centrális és perifériás hatásai szétválaszthatóak és ellentétes irányúak. Ugyanis a száraz időszakban a hipotalamikusan termelődő vazotocin a hipofízisből a keringésbe kerül. Ez több mechanizmuson keresztül gátolja a gonádok funkcióit. Ellenben az extrahipotalamikusan agyterületek vazotocin termelésének és funkciójának gátlás alá kéne kerülnie aszály idején a gonádális hormonok hiánya miatt. Amikor a víz elérhetővé válik, a vazotocin funkciója a hipotalamo-hipofízis rendszerben gyengül, kisebb mennyiség ürülve a keringésbe, ezzel feloldva a gonádok gátlását. A vazotocin extrém rövid felezési ideje (13 perc) lehetővé teszi, hogy amint a víz újra elérhetővé válik, a gonádok gyorsan kikerüljenek a vazotocin gátló hatása alól. Láthatjuk, hogy mint az elsődleges vízháztartás-szabályozó hormon madarakban, a vazotocinnak fontos szerepe van az opportunistáknak szaporodó zebra-pintyek környezethez alkalmazkodó gyors reprodukív szabályozásában (Harding & Rowe, 2003; Soediono, 1989). A társaságkedvelő viselkedésre szintén hatással van a vazotocin -elsősorban a BSTm és a PVN területén - ami a kolóniákban élő zebra-pintynél

igen fontos. A vazotocin fontos hatása az agresszió szabályozása. A PVN területén az AVT ivarspecifikus hatást gyakorol az ellenkező nemmel szembeni agresszióra: tojóknál csökkenti, hímeknél növeli azt (Kelly & Goodson, 2014a) Az intraszeptálisan beadott AVT szintén növeli az agressziót (Goodson & Adkins-Regan, 1999).

Mint azt Leung (2011) is kifejti, az agyrégiók és a hozzájuk társított neuropeptidek szerepe a viselkedésre különösképpen komplexnek tekinthető, és a neurális kapcsolatok mintázatától, aktivációjától, társulásra való hajlamtól és szociális kontextustól függ.

2.4. Vazoaktív intestinalis polipeptid

Az általam vizsgált másik neuropeptid a 28 aminosavból felépülő vazoaktív intestinalis polipeptid (VIP), melynek a vazotocinnal ellentétben nem olyan széleskörűen kutatott a funkciója a szociális viselkedésben. A VIP szintén egy konzerválódott peptid a gerincesekben, a csirkében található cDNS-es szerkezete hasonlít az emlős VIP génjére. (Kuenzel et al., 1997). Madarakban és emlősökben a VIP neuronok és rostok szinte minden szociális viselkedésért felelős agyterületen jelen vannak (Kingsbury et al., 2013).

A VIP-t számos hipotalamikus és extrahipotalamikus sejtcsoport termeli (Kingsbury et al., 2013). Ez a peptid a VPAC receptoron keresztül hat, amely a VIP-n kívül alacsony affinitással a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptidét is köti (Kingsbury et al., 2013; Kingsbury, 2015). A VPAC receptor következetesen jelen van gerincesekben a párkötődés szabályozásával kapcsolatos agyterületeken, így feltételezhető, hogy ezen receptor létfontosságú lehet a monogámia kialakulásában (Kingsbury & Goodson, 2014).

Legkutatottabb és ezáltal legismertebb szerepe a VIP-nak a prolaktin termelésre kifejtett hatása emlősökben és madarakban (Kingsbury et al., 2013; Maney et al., 2005). Az eminentia mediana környéki VIP neuronok által kibocsátott VIP az agyalapi mirigy elülső lebenyéhez eljutva a pars distalis területén elhelyezkedő laktotróp sejtekben stimulálja a prolaktin szintézisét és szekrécióját (Christensen & Vleck, 2008; Norris, 2011). Kimutatták, hogy a VIP növeli a hipofízisben a prolaktin mRNS expresszióját (Kuenzel et al., 1997). Emlőmirigyek hiányában néhány madárfaj, pl. a galambfélék begytejet termelnek megnövekedett prolaktin hatására. A megnövekedett prolaktin szekréció viselkedésbeli hatására néhány madárban kiváltódik az inkubáló viselkedés. (Kingsbury et al., 2013). Ezenfelül, mint az elsődleges prolaktin kibocsátó, a VIP hatással lehet az inkubáción kívül a szülői viselkedésre és a szaporodás szezonális befejezésére is. Maney és munkatársai (2005) ki is mutatták a fészeképítési viselkedés és a VIP közti

korrelációt szinte minden szociális viselkedésért fontos agyterületen, azonban azzal továbbra sem vagyunk tisztában, hogy ez a kapcsolat a prolaktin szekréción keresztül jön-e létre.

A VIP funkcióihoz sorolható még a vazodilatáció, feltételezhetően ennek a hatása a megnövekedett véráramlás; az exokrin mirigyek megnövekedett szekréciója elmősökben, illetve a sómirigyé madarakban (Kuenzel et al., 1997). Az emlős agy energia-metabolizmusában is szerepe van, emellett a patkányok cirkadián ritmusának modulátora vagy metabolikus komponense, katekolamin szintézisének és neuroszekréciójának elősegítője, illetve GnRH szekréciójának szabályozója (Kingsbury & Goodson, 2014; Kuenzel et al., 1997). A centrális VIP stimulálja az adrenokortikotropin hormon és kortikoszteron szekrécióját, mely hatásnak legalább egy része a hypothalamus paraventriculáris magjának VIP kibocsátásán keresztül zajlik (Kingsbury et al., 2013). Végezetül fontos megemlíteni, hogy a VIP hatással van a fejlődésben lévő, illetve kifejlett állatok neuroendokrin rendszerére és vegetatív idegrendszerére (Kuenzel et al., 1997).

A VIP szociális viselkedési funkciói azonban a madarak agressziójára és a rágcsálók szociális felismerésére gyakorolt hatásán kívül kevésbé ismertek (Kingsbury et al., 2013). Egér embriogenezis alatt a VIP jel csökkentése a méhben VPAC antagonistával vagy az anyában VIP hiány előidézésével gátolható a normál játszó viselkedés, a kötődési viselkedés, a szociális felismerés és a szociális újdonságra adott válasz az utódok kamasz- illetve felnőttkorában. (Kingsbury et al., 2013). VIP gátlása zebrapintyben az AH területén csökkenti a fészekvédelemmel kapcsolatos agressziót, míg a társ kompetíciót nem. Azonban más viselkedésbeli aspektusra - mint pl. szociális kontaktus, társaságkedvelés, udvarlás, párkötődés - nem volt hatással (Goodson et al., 2012). Kingsbury és munkatársai (2013) viszont ki tudták mutatni a csoportpreferenciára való hatását VPAC receptor antagonistá segítségével. A VPAC receptor antagonistá tojókban csökkenti, míg hímekben növeli a nagyobb csoport kedvelését. Ezen felül csökkenti az új környezetbe helyezett állatok szociális kontaktusát. Ezt megerősíti az is, hogy a LS és BSTm területén a VPAC receptorok nagyobb denzitásban található meg a koloniális zebrapintyben egyéb territoriális fajokhoz képest. Láthatjuk, hogy a VIP fontos szerepet tölt be a szociális kontaktus, társaságkedvelés és párkötődés területén zebrapintyben (Kingsbury & Goodson, 2014). Megjegyzendő, hogy a kapcsolat a VPAC receptorok, VIP és viselkedés közt madarakban sokszor hely- és ivarspecifikus (Kingsbury & Goodson, 2014).

3. Célkitűzések

Az általunk vizsgált két neuropeptid bizonyítottan szerepet játszik a szociális viselkedés szabályozásában (Goodson & Bass, 2001), ezáltal a szaporodási stádium egyes viselkedéselemeiben, pl. a fészekkészítésben is (Kingsbury et al., 2015; Klatt & Goodson 2013b), azonban arról nincs tudásunk, hogy az AVT és VIP eloszlása a szaporodási stádiumtól vagy a nemtől függ-e jobban.

Kutatásunk előzménye Montagnese és munkatársai (2014, 2015) kék cinegén (*Cyanistes caeruleus*) és függőcinegén (*Remiz pendulinus*) végzett vizsgálata, melynek célja volt felderíteni, hogy a szaporodási stratégiától vagy nemtől függ-e ugyanezen két peptid eloszlása. Mivel ez egy természetben végzett kísérlet volt, így óhatatlanul fennállt a veszélye hogy eredményeiket befolyásolta a különböző költési stádiumban járó madarak anatómiai változékonysága, illetve a befogott madarak csoportonkénti mennyisége is problémákra adott okot. Ezek miatt volt célszerű laborba, kontrolláltabb körülmények közé helyezni a kísérletet. Így lehetőségünk volt a kérdést kisebb részekre bontani és konklúzívabb eredményeket kapni.

Kutatásunkban ezáltal arra próbáltunk választ találni, hogy a nemekre jellemző anatómiai eltérések vagy az éppen elvégzett viselkedés a meghatározóbb e két neuropeptid eloszlásában.

A szakirodalom az AVT és VIP ellentétes hatásáról számol be zebrapintyek egyes viselkedésénél (Goodson, 1998), így másik kérdésünk az volt, hogy ezek mennyisége mennyire korrelál egymással.

Goodson és Adkins-Reagen 1999-es cikkükben még azt írják, addig senki nem vizsgálta az AVT és VIP természetes eloszlási mintázatát különböző szociális körülmények közt (Goodson & Adkins-Regan, 1999). Természetesen az elmúlt évek során ez irányban is folytak kutatások, azonban sok kérdésre továbbra sem sikerült választ találni. Az egyik ilyen kérdés ezen neuropeptidek utódgondozás során bekövetkező változásai, amelyet tudunkkal eddig még senki nem vizsgált. Bár kutatásunk elsődleges célja nem ezen neuropeptidek teljes agyi eloszlásának feltérképezése szociális viselkedés - esetünkben pl. utódgondozás - terén, azonban reméltük, hogy néhány szociális viselkedés szempontjából fontos agyterület vizsgálatával segíthetünk hozzájárulni ehhez.

4. Anyag és módszer

4.1. A zebrapintyek és tartási körülményeik

A kísérletünkhöz az Eötvös Loránd Tudományegyetem (ELTE) Etológia Tanszékének Állatházában ausztrál vadbefogott egyedekből alapított zebrapinty populációt használtuk (engedélyszám: XIV-I-001/2269-4/2012). Az általunk használt madarak a 12-13. generációval ezelőtt vadon befogott madarak leszármazottjai.

Az állatházban a pintyek két természetesen megvilágított helyiségbe vannak elhelyezve. Nagyjából 100 egyed nemenként elkülönítve egy-egy 1,5 x 2,4 x 2 m-es aviáriumban él. Ebbe a helyiségbe a jelenleg nem-szaporodó állomány van összezárva. A két aviárium pintyei audiovizuális ingerekkel kapcsolatban vannak egymással, de fizikailag nem. A másik szobában megközelítőleg 100 egyed páronként egy 100 x 30 x 35 cm-es összenyitott dupla ketreben van elhelyezve, mely egy 12 x 12 x 12 cm-es fa költődobozzal is fel van szerelve. A költőláda tetejéhez egy „dummy” kamera van rögzítve. Ezt az inkubáció 8. és a fiókák etetésének 11. napján délelőtt valódira kicserélve 3 órás videó felvételeket készítettünk az adott pár utódgondozó magatartásáról. Ebben a szobában a ketrecek elhelyezése miatt a párok általában nem látják egymást, de hanggal kommunikálhatnak.

A madarak *ad libitum* standard pinty magkeveréket és naponta friss vizet kapnak, valamint hetente minimum kétszer ásványi anyagban és proteinben gazdag tojás-eleséget és csíráztatott magokat. Az állatházban apró szemcseméretű sódert használnak alomként és kókuszrostot biztosítanak fészekanyagként. A ketreceket és röpdéket heti rendszerességgel takarítják.

Kísérletünk során a madarakat három csoportba osztottuk: kontroll, párba állított, illetve gondozó. A kontroll csoport egyedei a nagy röpdékből kerültek ki. A másik két csoporthoz egy időben páronként összeállítottuk a pintyeket, azzal a különbséggel, hogy a nem gondozó csoport nem kapott költőládát és fészekanyagot. A párok minimum 30 napot töltöttek együtt mielőtt az agyak kivételére sor került volna.

A madarak párba állítása és a kísérlet ezen része 2015 januárja és decembere között zajlott le. Az állatház kapacitása és az állatok szaporodási ciklusa indokolta ezt a hosszú kísérleti periódust. Ezáltal a mintavételezésre több alkalommal került sor, arra azonban próbáltunk figyelni, hogy a gondozó párral együtt másik csoportba tartozó pintyek agyát is kivegyük.

A tavaszi periódusban összesen 20 állat agyát távolítottuk el, ami 4 pár gondozó, 3 pár nem gondozó és 3 pár kontroll madarat jelent. Ezekből az adatokból gyűjtött előzetes eredmények alapján úgy döntöttünk, ősszel a gondozó és a kontroll csoport közti különbségre helyezük a hangsúlyt, így még további 3 pár gondozó és 3 pár kontrollal bővítettük a mintaelemszámot. Sajnálatos módon az egyik immunhisztokémia nem sikerült jól, így 4 madár metszeteit ki kellett vonnunk a statisztikai elemzésből. Mindent összevetve összesen 28 madár neuropeptid eloszlását volt lehetőségünk megvizsgálni.

4.2. Az agyak eltávolítása

Az agyak eltávolítására szintén az ELTE Állatházában került sor. Amint egy pár fiókái elérték a 11. napot, aznap délután kettő és három óra körül sor került dekapitálásukra. Azért választottuk a fiókák etetésének 11. napját, mert az ELTÉ-n hagyományosan a 11. nap délelőtt készül videó, így a későbbiekben a szakdolgozat kiterjesztéseként a videó adatait a mieinkhez hasonlítva további eredményekhez juthatunk. Emellett szintén fontos volt a felvételek zavartalanságát biztosítani akkor is amikor más etológiai kutatásokhoz készült a videó, hiszen az összes, kísérletekben részt vevő madár egy helyiségben van elhelyezve. Az eredmények összehasonlítása végett nagyjából egy időpontban kellett kivenni az állatok agyát, ugyanis ha szezonális változást nem is mutatnak az általam vizsgált neuropeptidek, napi változást mutathatnak, mint a hormonok.

Az etetés 11. napján a ketrecből eltávolítva a szülők súlya, tarsus- és szárnyhossza feljegyzésre került. Az egyedek dekapitálása után közvetlenül vért vettünk az arteria carotis-ból. A foramen magnumtól indulva a hosszanti hasadék a (*fissura longitudinalis cerebri*) mentén felvagtuk a lágy koponyát, majd a két felét óvatosan eltávolítottuk. Az agyat az agyidegek átvágása után óvatosan kiemeltük. A hímekből korrelációs vizsgálatok elvégzésének céljából a heréket is eltávolítottuk. Sajnos a szülők nélkül maradt fiókák életképtelennek bizonyulnak 11 napos korukban, így kénytelenek voltunk az ő agyukat is eltávolítani és elraktározni egy későbbi kutatás céljából. Az agyakat és a heréket 4 %-os paraformaldehid oldatba tettük fixálás céljából.

4.3. Az agyak feldolgozása

Kettő-hétnapos fixálás után az agyakat 25-30%-os szacharóz oldatba helyeztük, amelynek krioprotektív tulajdonságát használtuk ki a fagyasztva metszés során. Az agyakat fagyasztó mikrotómmal 50 µm-es vastagságú koronális metszetekre vágtuk. A tavasszal metszett agyagnál három sorozatba szedtük szét a metszeteket, hogy Nissl-festést is

elvégezhesünk az AVT és VIP mellett. Az őszi metszés során már mellőztük a Nissl-t, ez ugyanis kérdéses esetben segítené az agyterületek könnyebb beazonosíthatóságát, azonban erre nem volt szükség. A metszeteket a festésig foszfát pufferben (PBS), hűtőben tároltuk. Előfordult, hogy a metszeteket nátrium-aziddal kellett kezelnünk a penészgomba megjelenését elkerülendő, azonban az azid az eredményeket nem befolyásolja.

4.3.1. Immunhisztokémia

A metszeteket háromszor átmostuk PBS-sel, majd 1%-os dihidrogén-peroxidos PBS-ben áztattuk 15 percig, ezzel elkerülve az endogén peroxidáz aktivitásból eredő zavaró háttér-reakciót. A három 15 perces 0,1%-os Tween 20-PBS mosást követően 0,1%-os Tween 20-PBS-ben 1%-os normál kecske szérumban hagytuk egy óráig a metszeteket a nem specifikus immunkötőhelyek blokkolásának céljából. A nyúlban termelt primer ellenanyagokat 0,1 %-os normál kecske szérum tartalmú 0,1%-os Tween 20-PBS-ben kevertük össze, majd inkubáltuk a metszeteken egy éjszakán át. A Prof. David Gray-tól (University of Witwatersrand, Johannesburg, South Africa) ajándékba kapott anti-AVT-t 1/50.000-hez (Gray & Simon, 1983), míg a Dr. Görcs Tamástól kapott anti-VIP-t 1/10.000-hez hígítottuk (Gulyás et al., 1990). Reggel a háromszori Tween 20-PBS mosást követően felhelyeztük a metszetekre kétórás időtartamra az anti-nyúl szekundert 1/100-as hígításban 0,1%-os Tween 20-PBS-ben. A három PBS-es mosás után ABC-kezelést (avidin-biotin enzim-komplex) alkalmaztunk két órán keresztül. Újabb kétszeri PBS és kétszeri 0,05M-es Tris (pH 8) mosás után 10 percig Ni-DAB kezelést (nikkeles 3,3'-diamino-benzidin) alkalmaztunk, melyhez dihidrogén-peroxidot adva előhívtuk a színreakciót. A DAB-os módszer előnye hogy a fény nem károsítja a metszeteket így hosszú távon tárolhatók és újra kielemezhetőek, hátránya hogy az előhívást szűk időperiódus alatt kell elvégezni. Amennyiben túl hamar állítjuk le a folyamatot PBS-sel, akkor nem festődik meg az összes neuropeptid tartalmú struktúra, viszont ha túl későn, akkor az egyre sötétedő metszeteken nem lehet megkülönböztetni a háttértől a festődést.

4.3.2. Lefedés

Az immunhisztokémia segítségével megfestett metszeteket PBS-ben anatómiai sorba raktam, majd krómzselatinban felhúztam tárgylemezre. A tárgylemezeket pár napig lefedve hagytam kiszáradni, majd felszálló alkoholsorban (víz, 50%, 70%, 90%, abszolút alkohol) dehidratáltam 5-5 percen keresztül, azután kétszer 5 perc xilol-fürdőben áztattam.

A xilolos fürdőből kivett tárgylemezt DePeX segítségével lefedtük. A mikroszkópos feldolgozás előtt két napig száradni hagytuk a metszeteket.

4.4. A metszetek kiértékelése

4.4.1. Fénymikroszkópia

A metszeteket Olympus BX51 típusú fénymikroszkóp segítségével elemeztem, a képeket a mikroszkóphoz kapcsolt Olympus DP 50-es digitális kamera segítségével készítettem el.

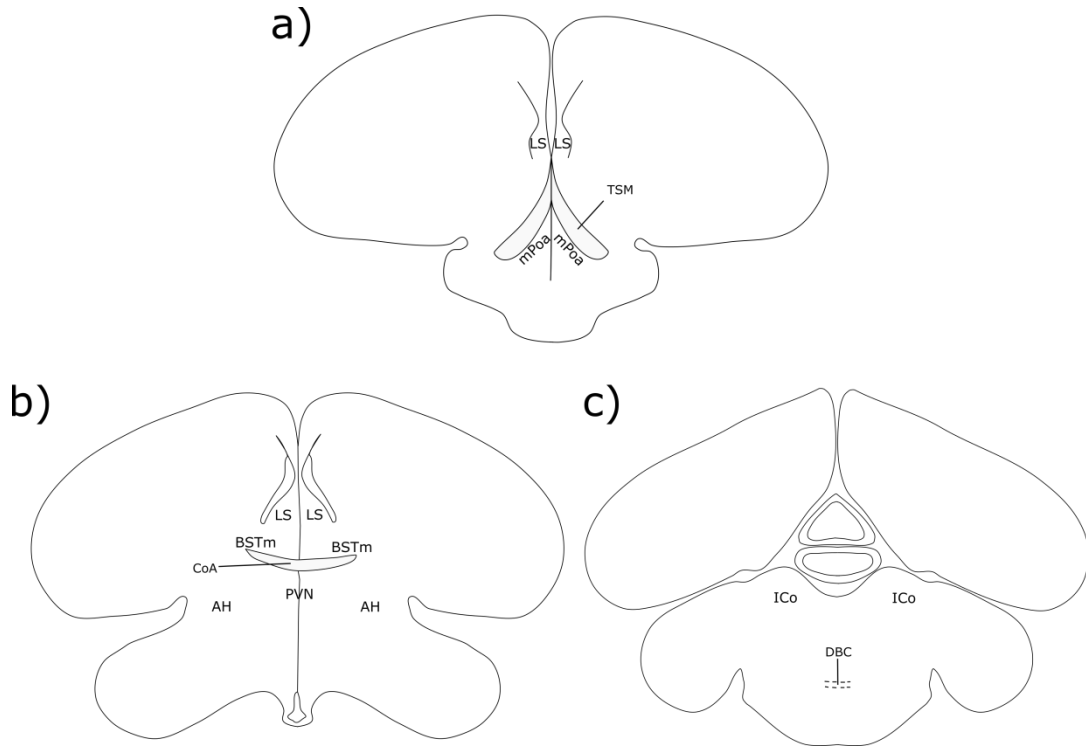
Minden képet azonos mikroszkóp-beállítással fotóztam, kisebb eltérések azonban előfordulhattak. A képeket 48-bites TIFF formátumban mentettem, mely veszteség nélkül tárolja a fotókat. Az agyterületeket 1,25x, 4x, 10x, 20x és 40x-es objektívvel is lefotóztam az utólagos visszakereshetőség céljából, az elemzést azonban csak a 40x-es objektívvel készített képen végeztem el. Az agyterületek beazonosításában Nixdorf-Bergweiler és Bischof zebra-pinty atlasza (2007), korábbi tapasztalataim valamint a festődések voltak segítségemre.

Az mPoa-t mindig azon a metszeten fotóztam ahol a tractus septomesencephalicus (TSM) kiszélesedik (3. ábra a) metszet). Az AVT-s metszeten a gondozók esetében a jelölődés egyértelműen meghatározta a területet, a többi csoportnál illetve a VIP-s metszeten ehhez a tapasztalatomhoz igazodtam.

A BSTm, PVN, illetve az AH a commissura anterior (CoA) által világosan meghatározható metszeten (3. ábra b) metszet) került fotózásra. PVN-t csak a vazotocinra megfestett immunhisztokémiás metszeten fotóztam kontroll régió gyanánt. A PVN parvocelluláris és magnocelluláris sejtcsoportokat is tartalmaz (Kelly & Goodson, 2014a), így nem várunk a három kezelési csoport között különbséget.

A lateralis septum végighúzódik a septum teljes rostrocaudalis hosszában, így három külön metszeten is fotóztam, hogy képet kapjunk rostralis (3. ábra a) metszet), medialis (3. ábra b) metszet) és caudalis részeiről is. A rostralis septumot a mPoa-val megegyező metszeten, a medialis az AH-os metszeten, a caudalis részt pedig az utolsó olyan metszeten fotóztam, ahol még látszik a lateralis septum.

Az egyetlen nehezebben behatárolható agyterületnek a nucleus intercollicularis bizonyult (3. ábra c) metszet). A diencephalon azon metszetén fotóztam, amelyen a nucleus mesencephalicus lateralis, pars dorsalis „tojás alakot” vesz fel, valamint a decussatio brachiorum conjunctivorum (DBC) is jelen van.



3. ábra A fotózott agyterületek: a) A telencephalon – mPoa, rostralis LS. b) A commissura anterior által könnyen beazonosítható metszet – medialis LS, BSTm, PVN, AH. c) Középagy - ICo

Az immunhisztokémiának köszönhetően az AVT-t illetve VIP-t tartalmazó neuronok és rostjaik egyértelmű lilás-feketés színnel kirajzolódtak, még erősebb háttér esetén is. Az adott agyterületen belül minden egyes esetben törekedtem arra, hogy a legtöbb festődött rost, sejt benne legyen az elemzéshez használt képen.

4.4.2. Képanalízis

A metszetek kielemezését az ImageJ 1.50b verziójával végeztem. Miután átállítottam a képet 8 bites szürkeárnyalatúra, az automata küszöbérték (threshold) funkcióval két bites fekete-fehér képpé konvertáltam. Az automata thresholdtól abban az esetben tértem el, amikor láthatóan több terület jelölődött ki a valós festődéshez képest. Ez esetben a threshold általában a hisztogram alsó értéke alatt volt pár egységgel. Ezután a festődött területet kijelöltem, ügyelve arra, hogy lehetőleg kör, de mindenképp konvex alakzatot kapjak. A lefedés során a fedőlemez alá bekerült por esetén a kijelölt területbe azt nem vettem bele, ezzel elkerülve a fals eredményt.

A kijelölt terület méretét, százalékos borítottságát, a festődés erősségének móduszát, mediánját, illetve átlagát mind megmértem, majd ezt excell táblázatban összegeztem.

Mivel mindkét agyfélteke agyterületeit lefotóztam, de a bal és jobboldalt korábban nem különböztettük meg, így területenként átlagot számítottam a két oldal adataiból, és ezzel dolgoztam tovább.

4.4.3. Statisztika

A statisztikai elemzéshez az R program 3.0.1 verzióját használtam. Kutatásunk alapvetően a csoportok és a nemek közti eltérés vizsgálatára épült, így többszemponos varianciaelemzést alkalmaztunk. Úgy gondoltuk, célváltozónak legcélszerűbb a festődött terület százalékos borítottságát választani, bár a kijelölt terület mérete, illetve a teljes képen (5757424 pixelegység) található festődés százalékos borítottsága is informatív lehet. Magyarázó változóként a kezelési csoportot, nemet, illetve ezen faktorok interakcióját használtuk. A modelltől kivéve az interakciót eredményeink nem változtak. A faktorszintek páronkénti összehasonlításához Tukey-féle post hoc tesztet alkalmaztunk.

A rendelkezésünkre álló adatokból kiszámoltam hímek esetében, hogy a testtömeg hány százalékát adja ki az össz heretömeg, így összehasonlíthatóvá téve az adatokat. Agyterületenként megnéztük ezen hányados és a festődés közti Spearman-féle rangkorrelációs együtthatót. Egy esetben az adatok nyilvánvaló lineáris eloszlása miatt Pearson-féle korrelációs együtthatót is számoltunk.

Az anterior hypothalamus beazonosíthatóságában felmerülő problémák miatt erre az agyterületre nem készítettünk statisztikát.

5. Eredmények

Kutatásunk során legnagyobb eltérést a kontroll és a gondozó csoport között vártuk. Előzetes eredményeink is ezt sugallták, így a kísérleti állatok számának minimalizálását is szem előtt tartva ősszel már nem gyűjtöttünk mintát a párba állított csoportból. Ennek következtében az eredmények kiértékelése során is ezt a két csoportot vettük figyelembe. Tájékoztató jelleggel a párosított csoport adatait is ábrázoltuk, azonban az hangsúlyozandó, hogy a kis mintaelemszám következtében erről a csoportról nem vonható le messzemenő következtetés.

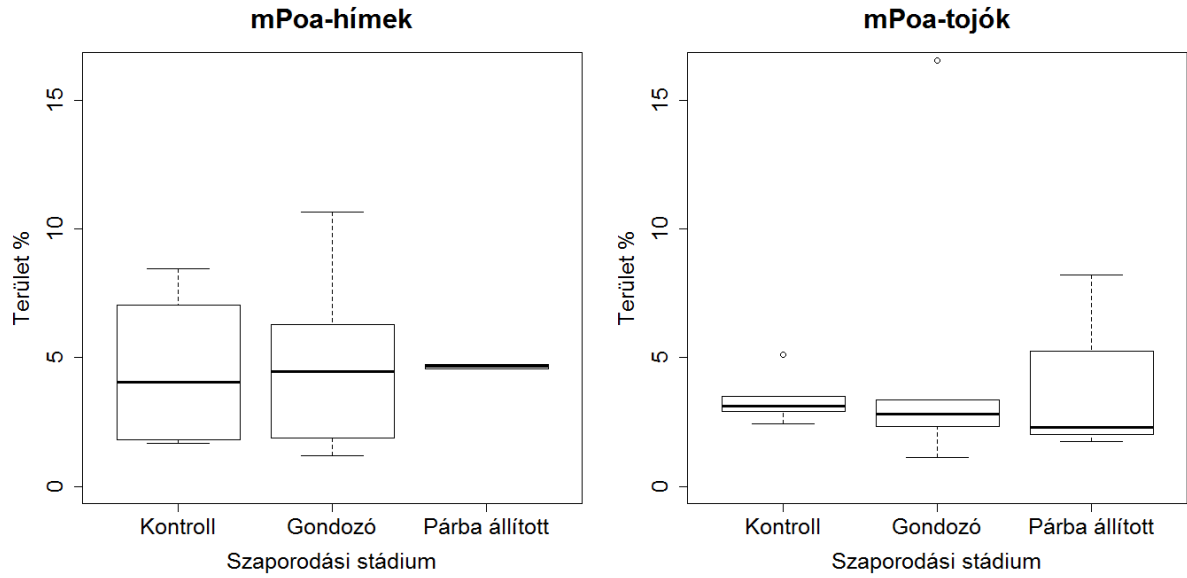
5.1. AVT

Korábbi feltételezéseink ellenére agyterületenként nem találtunk szembetűnő eltérést a kezelési csoportok illetve a nemek közt. Ezt a 2. táblázat adatai szemléltetik. A caudalis lateralis septum területén közel szignifikáns ($p=0.059$) eltérést találtunk a csoportok között, azonban ott a párosított egyedek vazotocin festődése tért el a kontrollhoz képest. A Tukey-féle post hoc teszt a gondozó és a párba állított csoport között mutatott ki szignifikáns eredményt ($p=0.048$).

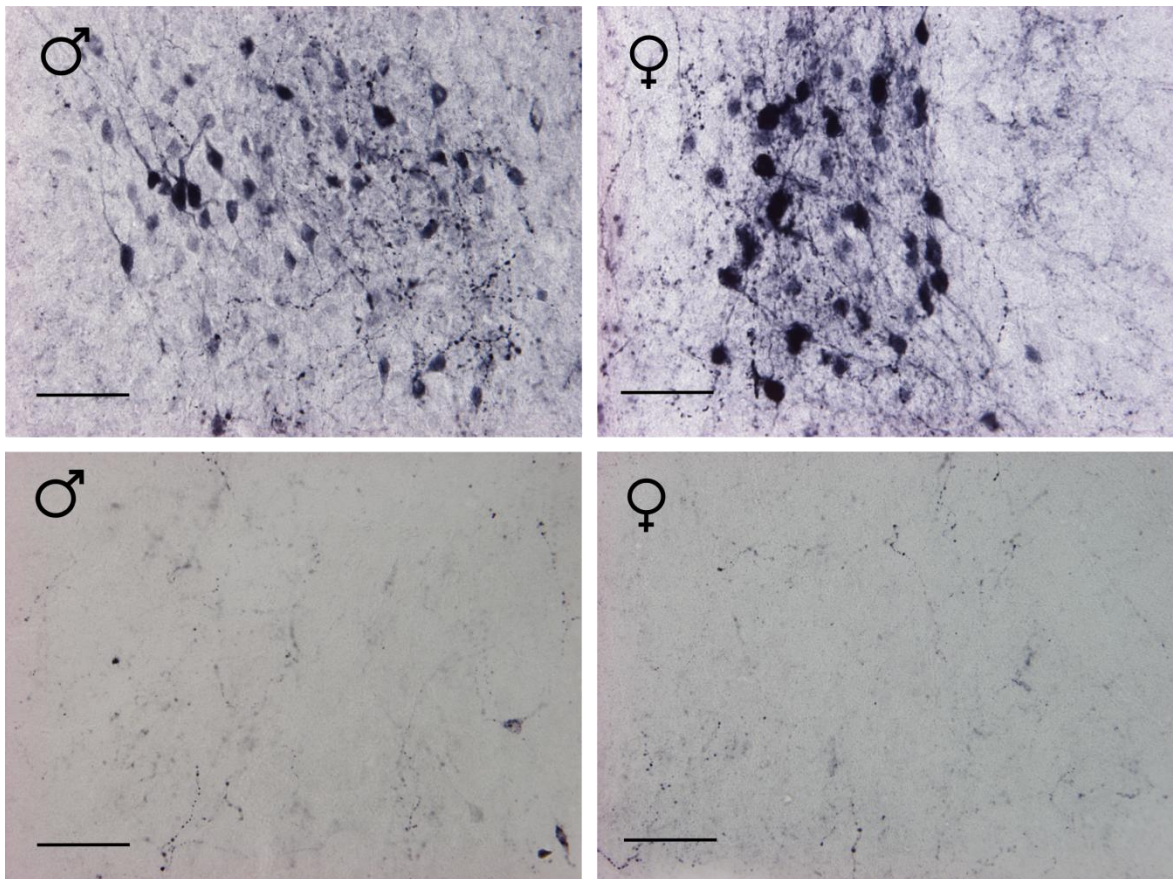
2. táblázat: Agyterületenként elvégzett ANOVA. Az adatok p-értékeket jelölnek.

	mPoa	LS1	LS2	LS3	BSTm	PVN	ICo
Nem	0,7235	0,7967	0,8800	0,52414	0,9326	0,9972	0,8435
Csoport	0,8548	0,4146	0,2899	0,05914	0,3232	0,0813	0,4147
Nem x Csoport	0,9508	0,9915	0,9937	0,14176	0,9762	0,2789	0,6653

Legnagyobb különbséget a szülői viselkedésért felelős mPoa területén vártuk, azonban meglepő módon a gondozók agyában nem tudtuk se több, se kevesebb vazotocint termelő rostot kimutatni a kontroll csoporthoz képest. A 4. ábra jól láthatóan szemlélteti ezt. Nemek közt sem tudtuk számottevő különbséget megállapítani, bár az egyik tojó agyában háromszor akkora volt az immunoreaktív területek aránya, mint a többi egyedében.



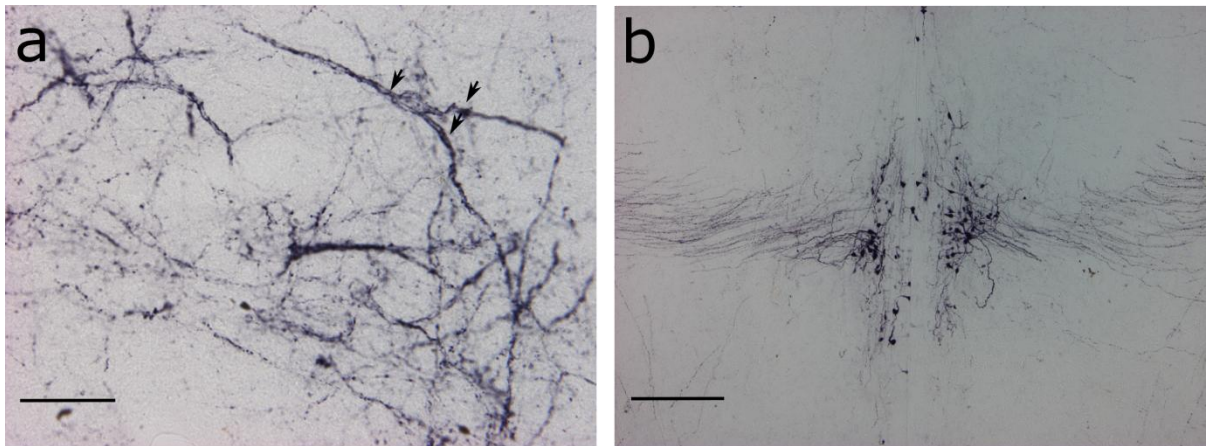
4. ábra: A mPoa AVT-immunoreaktív elemei nemre és csoportra lebontva (n=28)



5. ábra: Az egyedek közti nagy variancia az mPoa területén gondozó egyedekben. Mércse: 50 μ m

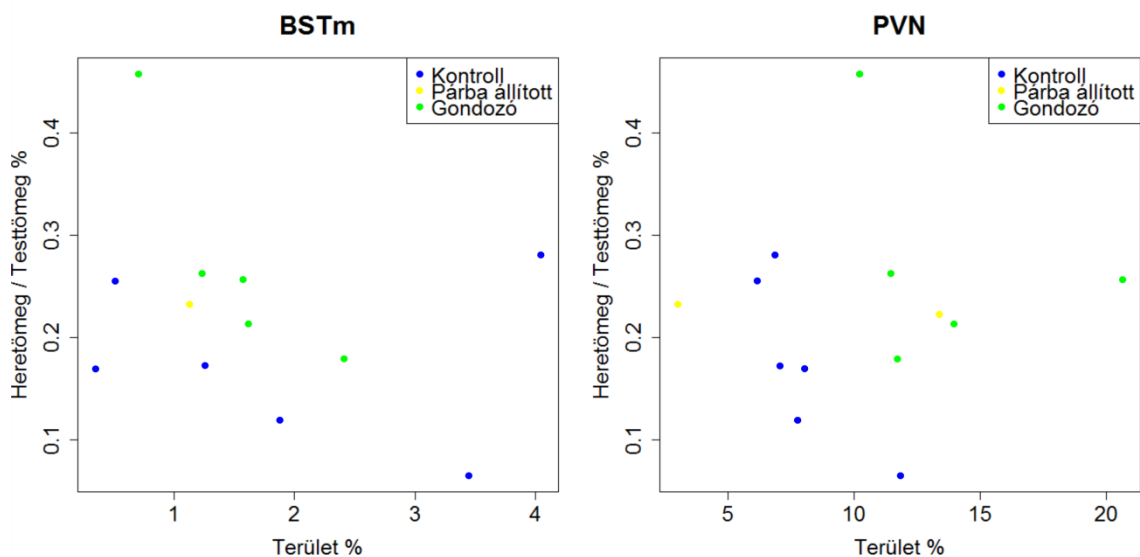
Az összes általam vizsgált agyterületen – leszámítva talán a vazotocin-termelő sejteket tartalmazó PVN-t – hatalmas egyedi variációt figyeltünk meg csoportokon belül is. Az 5. ábrán a mPoa területéről fotózott képeket ábrázolom gondozó állatok esetében. Nemeken belül is szembeötlően nagy különbség figyelhető meg. Egyes egyedeknél alig találtunk pár vazotocint tartalmazó rostot, míg másoknál a neuronokat jól behálózó rostköteg látható.

A lateralis septum területén találtuk a legkevesebb vazotocin-immunoreaktív elemet mindhárom csoport esetén. A caudalis LS esetén szignifikánshoz közeli p-értéket kaptunk (0.059) a csoportok közti összehasonlításnál, mégpedig a párba állított egyedek magasabb vazotocin immunoreaktivitása miatt. Az BSTm korábban leírt szexuális dimorfizmusa ellenére nekünk nem sikerült a nemek közt festődésbeli különbséget találnunk (2. táblázat). Vazotocin szempontjából legtöbb immunoreaktív elemet tartalmazó agyterületnek minden kétséget kizáróan a PVN bizonyult (6. ábra). A vazotocintermelő paraventriculáris és magnocelluláris sejtcsoportok itteni elhelyezkedésének köszönhetően ez nem okozott meglepetést számunkra. Az ICo-nál is viszonylag erős festődés figyelhető meg, de csak a caudalis metszeteken. Eleinte a commissura posterior környéki metszeteken fotóztam az ICo-t, ez esetben ez a terület a metszet lateralis részén található meg. Itt egyáltalán nem találtunk festődő rostot. A kutatás későbbi szakaszában véletlenül fedeztük fel, hogy sokkal caudalisabb metszeten - ahol az ICo már inkább dorsalisán helyezkedik el mint lateralisán (3. ábra) - nagyon erős jelölődés figyelhető meg. Így a statisztikai elemzéshez ezeket a metszeteket használtuk fel. Az ICo-nál jól látható ahogy a sejteken végződő axonok kirajzolják a proximális dentriteket, mely a 6. ábra a) képén is jól látszik. Nemek, illetve csoportok közötti eltérés azonban ezen a területen sem volt megfigyelhető.



6. ábra: a) ICO - jól megfigyilehető a proximális dentritek kirajzolódása (nyilak). b) A PVN kis nagyításon is egyértelműen festődő területe. Mércze: a) 50 μ m, b) 200 μ m

A heretömeg és agyterületek közti összefüggést vizsgálva több agyterületen is korrelációt tudtunk kimutatni. BSTm-nél a gondozó hímek vazotocin immunoreaktivitása negatívan korrelált a heretömegeggel (p -érték = 0.017, $\rho = -1$). Ha az összes hím heretömege és AVT festődése közt vizsgáltuk a korrelációt, nem kaptunk szignifikáns eredményt (p -érték = 0.5429). Még egy agyterületen, a PVN-nél fedeztünk fel hasonló jelenséget (7. ábra). Ott a kontroll hímek immunoreaktív elemei és a heretömeg közt szintén erős negatív korreláció figyelhető meg (p -érték = 0.033, $\rho = -0.89$), míg az összes hím vizsgálva nem található hasonló mintázat (p -érték = 0.7507).



7. ábra A heretömeg és a festődés közti összefüggés a BSTm és a PVN területén. BSTm területén a gondozó hímek, míg a PVN-nél a kontroll hímek heretömege korrelált negatívan a vazotocin-immuoreaktív területek arányával

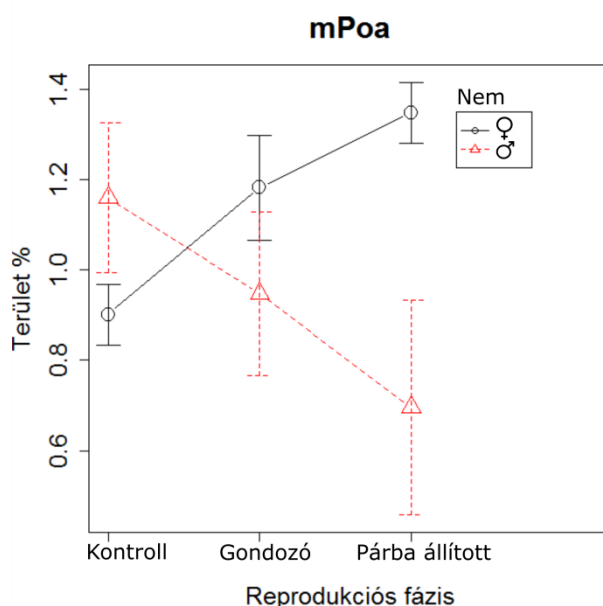
5.2. VIP

A vazotocinhoz hasonlóan a VIP immunoreaktivásban sem találtunk jelentős nemenkénti illetve csoportonkénti eltérést (3. táblázat). Megemlítendő, hogy a vazotocinnal ellentétben a VIP-nál nem találtunk területre korlátozódó festődést. Általánosságban elmondható, hogy a VIP-t tartalmazó axonok szinte az egész agyban jelen vannak, nagyjából egyenletesen, de kisebb mennyiségben szétszóródva.

3. táblázat Agyterületenként ANOVA. Az adatok p-értékeket jelölnek.

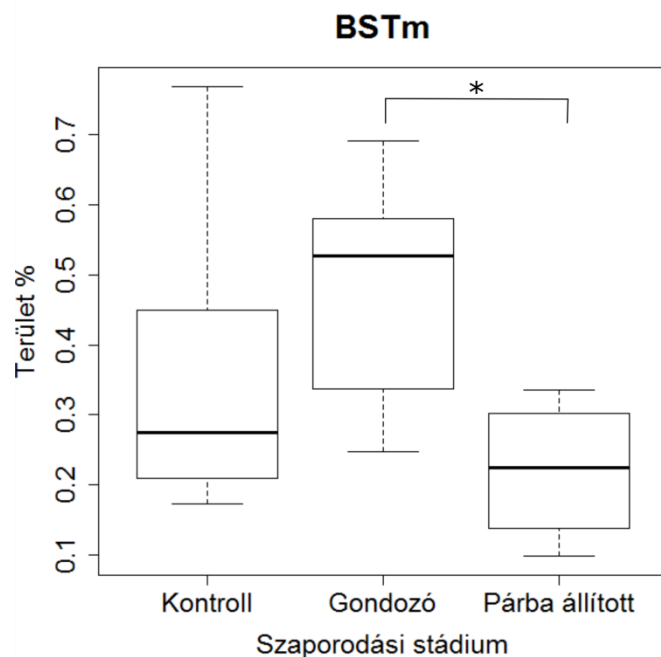
	mPoa	LS1	LS 2	LS 3	BSTm	ICo
Nem	0,37177	0,6300	0,1424	0,7264	0,40786	0,6124
Csoport	0,98587	0,6156	0,7854	0,9415	0,04297	0,6977
Nem x Csoport	0,04989	0,5376	0,7881	0,1538	0,75349	0,7143

A mPoa területén éppen szignifikánsnak (p-érték= 0.04989) mutatkozott a nem és csoport közti interakció (8. ábra). Adataink alapján úgy tűnik, a nem szaporodó hímekben több a VIP jelölődés, míg párbaállás idején lecsökken az. A tojóknál ezzel szemben ellentétes hatást találtunk: náluk párbaállás idején található több VIP az mPoa területén. Megemlítendő hogy eredményeink alapján úgy tűnik, a párba állt egyedeknél hímek esetében a legkevesebb, tojók esetében pedig a legtöbb a VIP-immunoreaktív elemek aránya az összes csoport közül, azonban azt sem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy az alacsony mintaelemszám alapján nem tudunk biztos konklúziót levonni.



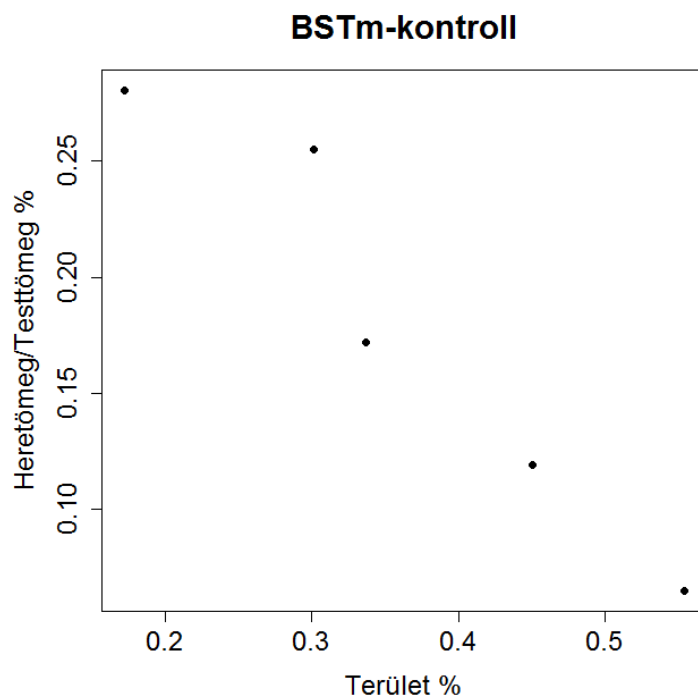
8. ábra: A VIP jelölődés mennyisége a nemek és a csoportok szerint az mPoa területén

A ICo, illetve lateralis septum egyik területén sem tudtunk nemenkénti vagy csoportonkénti eltérést kimutatni. A BSTm területén a csoport enyhén szignifikáns (p -érték=0.043) faktornak mutatkozott (9. ábra). Tukey-féle posthoc teszttel kiderült, hogy 95%-os konfidencia intervallum mellett a gondozó csoport a párba állítottéhoz képest nagyobb VIP-immunoreaktivitást mutat ($p=0.041$).



9. ábra A BSTm területén található festődésbeli eltérések csoportonként.
A csillag szignifikáns különbséget jelöl (Tukey, $P < 0,05$)

A vazotocinhoz hasonlóan a VIP-nál is megnéztük a heretömeggel való korrelációt. A BSTm területén a kontroll csoportba tartozó hímek heretömege egyértelműen negatívan korrelált a VIP-immunoreaktív területek arányával (Pearson-féle korrelációs együttható: p -érték = 0.008, korreláció= -0.96; Spearman-féle rangkorrelációs együttható: p -érték= 0.017, $\rho = -1$), mint ahogy az a 10. ábrán is látható. A többi agyterületen nem találtunk szignifikáns kapcsolatot a heretömeg és a festődés közt.



10. ábra A heretömeg és a festődés közti összefüggés a BSTm területén kontroll hímekben

Megnéztük, vajon az AVT és VIP-immunoreaktivitás közt van-e kapcsolat egyes agyterületeken. A lateralis septum mindhárom területén pozitív korrelációt találtunk a vizsgált két neuropeptid között (LS1: p-érték= 0.001, rho= 0.61; LS2: p-érték=0.0005, rho=0.63; LS3: p-érték = 0.012, rho=0.53). Csoportokra is megnézve azt találtuk, hogy az AVT és a VIP-jelölődés mind gonozó (p-érték = 0.008, rho=0.77), mind a kontroll (p-value = 0.013, rho=0.74) egyedekeben pozitívan korrelál a medialis LS területén. A caudalis LS esetében az utógonozó állatok AVT és VIP festődésében majdnem szignifikáns korrelációt találtunk (p-érték = 0.056, rho=0.6). A BSTm területén a gonozó egyedek VIP és AVT-immunoreaktivitása közt szintén erős pozitív korrelációt figyeltünk meg (p-érték = 0.021, rho=0.7).

6. Diszkusszió

Az AVT és VIP központi idegrendszeri változásait – fiókanevelés közben – tudomásunk szerint eddig még nem vizsgálták. A VIP-t utódgondozás terén legszéleskörűbben a fészkelési viselkedéssel kapcsolatban tanulmányozták, és a legkésőbbi fázis amit kutattak az az inkubáció (Kingsbury, 2015). A vazotocinnal kapcsolatban pedig a legkésőbbi reprodukciós fázis, amiről információnk az a fészkelési viselkedés (Klatt & Goodson, 2013b).

Kutatásunk során legnagyobb változásra ezen peptidek eloszlásában az utódgondozó viselkedésnél számítottunk, emiatt a párba állított csoport adatgyűjtésének befejezését későbbre halasztottuk. Annak ellenére, hogy ezen két neuropeptid számos szociális viselkedés szabályozásában részt vesz (Goodson & Bass, 2001; Kingsbury, 2015), mi nem találtunk jelentős eltérést a kontroll és a gondozó csoportunk között. Úgy tűnik, hogyha valahol különbségre lehet számítani, az a már párba állt, de még tojást le nem rakott egyedek és a másik két csoport között várható.

Kutatásunk fő célja az AVT és VIP szaporodási stádiumban bekövetkező eloszlásbeli változásait volt hivatott felderíteni a szociális viselkedés szempontjából releváns agyterületeken. Az AVT esetében egyik vizsgált agyterületen se találtunk szignifikáns különbséget a nem szaporodó és gondozó egyedek között. Számunkra meglepő eredmény volt, hogy a mPoa területén nem találtunk a csoportok közt eltérést, hiszen ennek a területnek a szülői viselkedés szempontjából igen fontos szerepe van (Dulac et al., 2014; Pfaff et al., 2009). Patkányokban kimutatták, hogy a V1b receptor blokkolása ezen az agyterületen növelte az utódok visszahordását a fészkekbe (Bayerl et al., 2016). Mivel az intraszeptálisan beadott AVT növeli az agressziót zebra-pintyben (Goodson & Adkins-Regan, 1999), azt vártuk volna hogy az egy aviáriumba nemenként összezárt kontroll csoport agyában több vazotocint tudunk kimutatni, mint az agresszióknak kevésbé kitett gondozó csoport esetében. Egyedül a caudalis LS területén kaptunk közel szignifikáns eltérést a csoportok közt, de alaposabban megvizsgálva kiderült, hogy a párba állított és a gondozó egyedek közt figyelhető meg különbség. Rágcsálókban az endogén vazopresszin a V1a és OTR receptorokon keresztül szabályozza a párkötődést az LS-ben, és feltételezhető hogy a vazotocin (vagy a mezotocin) a VT3 receptoron keresztül hatva szintén elősegíti a párkötődés kialakulását zebra-pintyben ugyanezen területen (Klatt & Goodson, 2013a). A párkötődés elősegítése magyarázhatná a magasabb AVT-immunoreaktivitást a párba állított pintyeknél, azonban ennek a feltételezésnek az

igazolásához nagyobb mintaelemszámra lenne szükségünk. Mindemellett fontos megemlíteni, hogy az LS számos zónára és szubrégióra van osztva kémiai összetétele és funkciója alapján (Goodson et al, 2004). Az általunk a caudalis LS-ben mért denzitás is vélhetően több, különböző alrégiót jellemez, melyek elfedhetik az egyes zónák körzeti különbségeket. Az LS-sel közvetlen összeköttetésben álló BSTm (Kelly & Goodson, 2013) vazotocin neuronjai elősegítik a nagyobb csoport preferenciáját hím zebraapintyekben, emellett szabályozzák az agressziót mindkét nemben (Kabelik et al., 2010; Kelly et al., 2011). Emiatt azt vártuk, hogy a kontroll hímelekben több AVT-immunoreaktív elemet figyelünk meg. Nem volt meglepő, hogy a vizsgált agyterületek közül - minden szaporodási stádiumban - a PVN festődött a legjobban, hiszen a PVN-ben megtalálhatók a vazotocint termelő magnocelluláris és parvocelluláris sejtcsoportok. A PVN vazotocintermelésének gátlása csökkenti a nagyobb csoport közelében eltöltött időt és mindemellett ivarspecifikus hatást gyakorol az ellenkező nemmel szembeni agresszióra: tojóknál csökkenti, hímeknél növeli azt (Kelly & Goodson, 2014a). Ezek alapján legalább a párba állított csoportnál ivari dimorfizmust vártunk volna, amit nem sikerült megfigyelni. Az agressziót elősegítő ICO területén (Goodson & Kingsbury, 2014) is erős festődést tapasztaltunk, azonban Voorhuis és de Kloet (1992) ezen a területen sokkal jelentősebb és kiterjedtebb AVT-immunoreaktivitást figyelt meg zebraapintynél.

Az, hogy a kontroll és az utódgondozó csoport közt nem tudtunk különbséget kimutatni eredhet akár az egyedek nagy varianciájából is. Zebraapintyeknél a vazotocin receptorok mRNS eloszlásában nagy intraspecifikus különbségeket írtak le (Leung et al., 2011), nem zárható ki az sem, hogy ez a peptidek esetében méginkább így van. Megeshet, hogy ez a nagy egyedi variancia a peptidek gyors időbeli változásának köszönhető. Előfordulhat, hogy az egyedek közti különbség nagyobb, mint amekkora a két szaporodási stádium közt bekövetkező változás. Azonban a nagy egyedi variancia várhatóan megnyilvánul a vele korreláló viselkedésekben is. A viselkedési adatok elemzéseinek elkészülte után azokat fel lehet használni a neuroendokrin adatok összevetéséhez.

Nem sikerült nemi dimorfizmust kimutatnunk az AVT eloszlásában a BSTm területén, még a kontroll egyedek között sem, annak ellenére hogy zebraapinty agyban már leírták ezt a különbséget (Pfaff et al., 2009). Voorhuis és de Kloet (1992) hozzánk hasonlóan nem talált nemi különbséget a vazotocin eloszlásában zebraapintynél. Kimura és munkatársai (1999) szintén immunhisztokémiával azonban képesek voltak nemi dimorfizmust kimutatni az LS és BSTm területén zebraapintyben, amelyet tojók tesztoszteron kezelésével is alátámasztottak. Az ivari különbségek, bár specifikus

vizsgálatban kimutathatóak, nem jelentősek, és nem is feltétlenül minden szaporodási stádiumban detektálhatók. Ez okozhatta, hogy vizsgálatunkban nem tapasztaltunk ivari különbséget.

A VIP eloszlását vizsgálva megfigyeltük, hogy a mPoa területén jelölődő VIP-immunoreaktív elemek aránya ivartól és csoporttól is függ. A párba állított hímekben kevesebb VIP jelölődést találtunk a nem szaporodó egyedekhez képest, míg tojóknál ellentétes hatást figyeltünk meg: párbaálláskor megnőtt a VIP-immunoreaktív elemek aránya. A másik terület ahol eltérést találtunk a VIP jelölődésben az a BSTm. A gondozó egyedekben nagyobb arányú VIP-immunoreaktivitást tapasztaltunk a párba állítottakhoz képest. Ezt magyarázhatja, hogy a párba állt hímek több agressziót mutatnak más hímek ellen, hogy megakadályozzák a tojó párosodását más hímekkel, míg a tojó szervezete már a fészkelésre és az utódgondozásra készül. Nem véletlen tehát, hogy bennük magasabb VIP festődés mutatkozik a mPoa területén. Goodson és munkatársai munkája alapján (2012) valószínűsíthető, hogy a VIP a BSTm-ben elősegíti a csoportalkotó viselkedést. Ez azonban nem magyarázza adatainkat. Kingsbury és munkatársai (2015) a fészkepítési viselkedés és a VIP transzkripció kapcsolatának vizsgálata során arra az eredményre jutottak, hogy szinte az összes általuk vizsgált agyterületben (köztük a mPoa, LS, BSTm) a transzkripció aránya pozitívan korrelált a fészkepítési viselkedéssel, illetve sokszor a fészekben eltöltött idővel is. Egyedül az AH és az ICO területén találtak negatív korrelációt. A BSTm-ben mi is kimutattuk a gondozás pozitív hatását a VIP mennyiségére, azonban a többi agyterületen nem tapasztaltunk változást. Azt várjuk, hogy a videófelvételek alapján össze tudjuk hasonlítani a szülői gondozás mértékét és az egyedek agyában tapasztalt VIP-immunoreaktivitást.

Számos változót és agyterületet vizsgáltunk meg, így valójában kicsi az esély arra, hogy nem találtunk különbséget annak ellenére, hogy az jelen van. Az bizonyított tény, hogy a párba állás számos változást indukál az agyban (Young & Wang, 2004). Úgy tűnik, hogyha ehhez képest van is különbség az utódgondozó egyedek agyában, az visszaáll a kontroll szintre. Feltételezzük, hogy a nem szaporodó és az utódgondozó agy hasonlósága a zebra-pinty opportunistá szaporodásmódjához köthető. Opportunistaként pár hiányában a zebra-pinty redukált szexuális viselkedést mutat. AVT-re és VIP-ra irányuló kutatások nagy része a szexuális viselkedéshez kapcsolódó változásokat vizsgálták: párbaállás, párkötődés (Kingsbury & Goodson, 2014; Klatt & Goodson, 2013a) és agresszív viselkedés (Albers, 2015; Goodson et al., 2012; Goodson, 1998). Azonban mind az utódgondozó, mind a kontroll csoportban csökkent ez a fajta viselkedés a párbaálláshoz képest. A vadon élő

zebrapintyeknél nagyon alacsony az extra-pár kopulációból származó fiókák aránya, alig éri el a 2%-ot (Griffith et al., 2010), így bár információink hiányosak, feltételezhetjük, hogy utódgondozás során sem nő meg az extra-pár kopulációk száma. Mivel a gondozó és kontroll csoport közt vártuk eredetileg a legnagyobb különbséget, erre a két csoportra fókuszáltunk. Így a párba állított csoportnál a mintaelemszám későbbi növelésével várhatóan további különbségek lesznek kimutathatók. Ennek ellenére a mPoa és a BSTm területén még így is figyelemre méltó eredményeket kaptunk. Fontos megjegyezni, hogy az immunhisztokémia nem alkalmas a termelő peptidek pontos kvantifikációjára, csak jelentős strukturális (több sejt, több rost) változások detektálására alkalmas. Úgy tűnik a kontroll és a gondozó egyedek közti különbségek nem érik el ezt a szintet.

Az AVT-immunoreaktivitás és a heretömeg negatív korrelációját figyeltük meg a BSTm területén gondozó hímek esetében. Kelly és Goodson (2013) kutatása során azt találta, hogy a BSTm területén az AVT-immunoreaktivitás negatívan korrelál az agresszióval. A kisebb heretömeg általában alacsonyabb keringő tesztoszteron-koncentrációval jár (Garamszegi et al., 2005), ami csökkent agressziót okoz (Soma, 2006). Sajnos ezt az eredményünket nem fogjuk tudni alátámasztani viselkedésadatokkal, ugyanis a költőládában készített videófelvétel nem alkalmas az agresszió megfigyelésére. Szintén a vazotocin-immunoreaktivitás és a heretömeg negatív korrelációját figyeltük meg a PVN területén, de ott a kontroll egyedekben. Ez arra enged következtetni, hogy az az egyed, amelyik kevesebb energiát fektet a heretömeg növelésére, vagyis a spermakompetícióra, az több vazotocint termel. Kabelik és munkatársai (2010) azt találták, hogy a centrális vazotocin kibocsátás a pár nélküli hímekben erősíti az agressziót a hímek közti agresszív versengésben. Ez alapján gondolhatunk arra, hogy a kisebb heretömegű egyed a magasabb vazotocin szekrécióval, ezáltal agresszívabb viselkedésével veszi fel a szaporodásbeli versenyt hímtársai ellen. A többi csoportban nincs direkt hím-hím kompetíció, így hasonló stratégiára sincsen szükség, ami magyarázhatja a hasonló korreláció hiányát.

A VIP-immunoreaktivitás és a heretömeg közt a BSTm területén kontroll egyedek esetében negatív korrelációt találtunk. A csoportkedvelőbb pintyek agyában a territoriális fajokhoz képest nagyobb denzitásban találhatóak a VIP kötőhelyeik a BSTm területén. (Goodson et al., 2012) Feltételezhető, hogy a nagyobb heretömeggel rendelkező és ezáltal agresszívabb állatok - akinek a BSTm területén kevesebb VIP-immunoreaktív elem található meg – kevésbé preferálják a nagyobb csoportot.

Bár a VIP és AVT hatása fajonként eltérhet, akár ellentétes is lehet, érdemes figyelmet szentelni e két neuropeptid fajon belüli antagonistikus funkciójára. Goodson és

Adkins-Regan zebra-pintyén végzett kutatása (1999) kimutatta, hogy intraszeptálisan beadott AVT elősegítette az agressziót, míg az anti-AVT és VIP meggátolta azt. A két peptid agresszióban betöltött funkciója azonban valószínűleg függ a fajra jellemző szaporodási rendszertől, a vizsgált agyterülettől és a szaporodási stádiumtól is. A zebra-pintyvel ellentétben, a territoriális gránátpintyben a VIP elősegíti az agressziót, a szintén territoriális, de az Emberizidae családba tartozó kereplő verébsármányra (*Spizella pusilla*) azonban nincs hatása (Goodson, 1998). A két neuropeptid gonadális szteroid érzékenysége is ellenkező hatású. A vazotocinnal ellentétben a kasztrálás növeli a VIP-immunoreaktivitást a caudalis LS területén hím fürjben, míg ez a növekedés tesztoszteron kezeléssel visszafordítható (Maney et al., 2005). A számos példa ellenére mi nem negatív korrelációt találtunk az AVT és VIP eloszlása között, hanem pozitívát, ráadásul két területen is. Az LS-ben és a BSTm-ben gyűjtött adataink alapján úgy tűnik, ez a két peptid nem kizárólagosan antagonistá hatású.

Eredményeink tehát arra engedek következtetni, hogy utódgondozás során az AVT-t és VIP-t termelő rostok, illetve sejtek száma nem szaporodik fel a csoportban élő, nem szaporodó egyedekhez képest. Az immunhisztokémia korlátozottan kvantitatív jellegéből adódóan ezzel a módszerrel nem tudjuk megállapítani, hogy az adott rostból/sejtből mennyi neuropeptid szabadul fel, melynek mennyisége ugyanannyi jelölődött rost esetében is eltérhet. Ráadásul a nagyobb mértékben felszabaduló peptidek esetén sem következtethetünk arra, hogy poszt-szinaptikusan azokból mennyi képes receptorokat aktiválni, tehát hogy mennyire van hatásuk az idegrendszerre, ezáltal a viselkedésre.

Végezetül tehát, ahhoz hogy tisztázzuk az AVT és VIP szerepét vagy éppen annak hiányát az utódgondozás során, szükség lenne egy átfogóbb vizsgálatra pontosabb módszerrel, mely kiterjed a receptorok és peptidek eloszlásbeli változására és a jelátviteli utak aktiválásbeli eltérésére is.

7. Összefoglalás

Az utódgondozás az emberi szociális viselkedés egy fontos része, mely modellállatokon jól tanulmányozható. Azonban a standard laboratóriumi rágcsálók szülői stratégiái eltérnek az emberétől, emiatt modellállatunknak a kétszülős utódgondozású zebrapintyet (*Taeniopygia guttata*) választottuk.

Az agyterületek és a neurotranszmitterek szerepe szociális interakciókban, mint például territorialitás és párkötődés széleskörben kutatottak, azonban szülői utódgondozásban betöltött szerepük eddig ismeretlen. Így tehát kutatásunk során két neuropeptid, az arginin-vasotocin (AVT) és a vasoaktív intestinalis peptid (VIP) agyi szociális hálózatban betöltött szerepét vizsgáltuk különböző reprodukív stádium során immunhisztokémia segítségével.

Feltételezésünkkel ellentétben a kontroll és az utódgondozó csoportok nem mutattak különbséget az AVT expressziójában. A BSTm területén viszont a gondozó és a párba állított csoport közt, a mPoa esetén a csoport és ivar közt eltérés mutatkozott a VIP jelölődésében. Nagyon nagy egyedi varianciát tapasztaltunk mindkét neuropeptid esetében, ami egybevág az irodalmi adatokkal és elfedheti a finomabb különbségeket. Emellett pozitív korrelációt találtunk az AVT és a VIP eloszlása között, illetve több agyterület immunoreaktivitása is összefüggést mutatott a hímek hereméretével, ami a gonadális szteroid szabályozó szerepére utal.

Kutatásunk rávilágított arra, hogy ezen peptidek szülői utódgondozásban betöltött szerepét pontosabb módszerekkel és a receptoraik eloszlását is figyelembe véve érdemes megvizsgálni. A továbbiakban tervezzük összevetni a neuropeptidek expresszióját az utódgondozás során felvett viselkedésadatokkal, az előbbiben tapasztalt nagy egyedi varianciát megmagyarárandó.

8. Abstract

Gender and reproductive status-dependent changes in the expression of arginine vasotocin and vasoactive intestinal polypeptide in the brain of the zebra finch (*Taeniopygia guttata*)

Parental care is an important part of the social behaviour of humans that can be studied in animal models. However, parental strategies of standard laboratory rodents are different from those of humans. In zebra finches both sexes participate in parental care: males and females both incubate the eggs and feed the hatchlings.

Brain regions and neurotransmitter systems underlying other social interactions such as territoriality and pair bond are widely studied, but their role in parental care is unknown. Therefore, with standard immunohistochemistry, we investigated the distribution of arginine-vasotocin (AVT) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the social brain network of male and female zebra finches (*Taeniopygia guttata*) in various reproductive stages.

Contrary to our hypothesis, there were no differences between the control and the feeding group in the case of AVT. Differences were observed in VIP immunoreactivity between the feeding and the paired group in the BSTm and between the groups and the genders in the mPoa. We did find large individual variance in the AVT and VIP immunolabeling in most of the brain regions which was in harmony with the scientific literature and probably covered any subtle differences. We found positive correlation between the distribution of AVT and VIP. Neuropeptide immunolabel correlated with the testis size of males in some of the brain areas which supports the regulatory effect of gonadal steroids on their distribution.

As a result, our study has emphasised the importance of a more precise research regarding the role of the peptides in parental care, with relation to the distribution of their receptors. We plan to compare the the neuropeptide expression with the behavioural data collected during parental care to explain the high individual variation.

9. Irodalomjegyzék

- Albers, H. E. (2015). Species, sex and individual differences in the vasotocin/vasopressin system: Relationship to neurochemical signaling in the social behavior neural network. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 36, 49–71. doi:10.1016/j.yfrne.2014.07.001
- Balthazart, J., & Ball, G. F. (2007). Topography in the preoptic region: Differential regulation of appetitive and consummatory male sexual behaviors. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 28(4), 161–178. doi:10.1016/j.yfrne.2007.05.003
- Bayerl, D. S., Kaczmarek, V., Jurek, B., van den Burg, E. H., Neumann, I. D., Gaßner, B. M., ... Bosch, O. J. (2016). Antagonism of V1b receptors promotes maternal motivation to retrieve pups in the MPOA and impairs pup-directed behavior during maternal defense in the mpBNST of lactating rats. *Hormones and Behavior*, 79, 18–27. doi:10.1016/j.yhbeh.2015.12.003
- Burley, N. T., & Johnson, K. (2002). The evolution of avian parental care. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*, 357(1419), 241–250. doi:10.1098/rstb.2001.0923
- Christensen, D., & Vleck, C. M. (2008). Prolactin release and response to vasoactive intestinal peptide in an opportunistic breeder, the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *General and Comparative Endocrinology*, 157(2), 91–98. doi:10.1016/j.ygcen.2008.04.013
- Dulac, C., O'Connell, L. A., & Wu, Z. (2014). Neural control of maternal and paternal behaviors. *Science*, 345(6198), 765–770. doi:10.1126/science.1253291
- Forstmeier, W., Segelbacher, G., Mueller, J. C., & Kempenaers, B. (2007). Genetic variation and differentiation in captive and wild zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *Molecular Ecology*, 16(19), 4039–4050. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03444.x
- Garamszegi, L. Z., Eens, M., Hurtrez-Bousses, S., & Moller, A. P. (2005). Testosterone, testes size, and mating success in birds: A comparative study. *Hormones and Behavior*, 47(4), 389–409. doi:10.1016/j.yhbeh.2004.11.008
- Goodson, J. L. (1998). Vasotocin and Vasoactive Intestinal Polypeptide Modulate Aggression in a Territorial Songbird, the Violet-Eared Waxbill (*Estrildidae:Uraeginthus granatina*). *General and Comparative Endocrinology*, 111(2), 233–244. doi:10.1006/gcen.1998.7112
- Goodson, J. L. (2005). The vertebrate Social Behavior Network: Evolutionary Themes and Variations. *Hormones and Behavior*, 48(1), 11–22. doi:10.1016/j.yhbeh.2005.02.003.
- Goodson, J. L. , & Kingsbury, M. A. (2014). What's in a name? Considerations of homologies and nomenclature for vertebrate social behavior networks. *Hormones and Behavior*, 64(1), 103–112. doi:10.1016/j.yhbeh.2013.05.006.
- Goodson, J. L., & Adkins-Regan, E. (1999). Effect of intraseptal vasotocin and vasoactive intestinal polypeptide infusions on courtship song and aggression in the male zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Journal of Neuroendocrinology*, 11(1), 19–25. doi:10.1046/j.1365-2826.1999.00284.x
- Goodson, J. L., & Bass, A. H. (2001). Social behavior functions and related anatomical characteristics of vasotocin/vasopressin systems in vertebrates. *Brain Research Reviews*, 35(3), 246–265. doi:10.1016/S0165-0173(01)00043-1
- Goodson, J. L., Evans, A. K., & Lindberg, L. (2004). Chemoarchitectonic subdivisions of the songbird septum and a comparative overview of septum chemical anatomy in jawed vertebrates. *The Journal of Comparative Neurology*, 473(3), 293–314. doi:10.1002/cne.20061

- Goodson, J. L., Evans, A. K., Lindberg, L., & Allen, C. D. (2005). Neuro-evolutionary patterning of sociality. *Proceedings of the Royal Society*, 272(272), 227–235. doi:10.1098/rspb.2004.2892
- Goodson, J. L., Kabelik, D., & Schrock, S. E. (2009). Dynamic neuromodulation of aggression by vasotocin: influence of social context and social phenotype in territorial songbirds, (June), 554–556.
- Goodson, J. L., Kelly, A. M., Kingsbury, M. a., & Thompson, R. R. (2012). An aggression-specific cell type in the anterior hypothalamus of finches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(34), 13847–52. doi:10.1073/pnas.1207995109
- Goodson, J. L., & Thompson, R. R. (2010). Nonapeptide mechanisms of social cognition, behavior and species-specific social systems. *Current Opinion in Neurobiology*, 20(6), 784–794. doi:10.1016/j.conb.2010.08.020
- Goodson, J. L., Wilson, L. C., & Schrock, S. E. (2012). To flock or fight: neurochemical signatures of divergent life histories in sparrows. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 Suppl , 10685–92. doi:10.1073/pnas.1203394109
- Gray, D. G., & Simon, E. (1983). Mammalian and avian antidiuretic hormone: studies related to possible species variation in osmoregulatory systems. *J.Comp.Physiol.[A]*, 151, 241–246.
- Griffith, S. C., Holleley, C. E., Mariette, M. M., Pryke, S. R., & Svedin, N. (2010). Low level of extrapair parentage in wild zebra finches. *Animal Behaviour*, 79(2), 261–264. doi:10.1016/j.anbehav.2009.11.031
- Gulyás, A. I., Görcs, T. J., & Freund, T. F. (1990). Innervation of different peptide-containing neurons in the hippocampus by gabaergic septal afferents. *Neuroscience*, 37(1), 31–44. doi:10.1016/0306-4522(90)90189-B
- Harding, C. F., & Rowe, S. A. (2003). Vasotocin treatment inhibits courtship in male zebra finches; concomitant androgen treatment inhibits this effect. *Hormones and Behavior*, 44(5), 413–8. doi:10.1016/j.yhbeh.2003.06.007
- Holveck, M.-J., & Riebel, K. (2010). Low-quality females prefer low-quality males when choosing a mate. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 277(1678), 153–60. doi:10.1098/rspb.2009.1222
- Ihle, M., Kempnaers, B., & Forstmeier, W. (2015). Fitness Benefits of Mate Choice for Compatibility in a Socially Monogamous Species. *PLoS Biology*, 13(9), 1–21. doi:10.1371/journal.pbio.1002248
- Insel, T. R., & Young, L. J. (2000). Neuropeptides and the evolution of social behavior. *Current Opinion in Neurobiology*, 10(6), 784–789.
- Kabelik, D., Klatt, J. D., Kingsbury, M. A., & Goodson, J. L. (2010). Endogenous vasotocin exerts context-dependent behavioral effects in a semi-naturalistic colony environment, 56(1), 101–107. doi:10.1016/j.yhbeh.2009.03.017.
- Kabelik, D., Morrison, J. A., & Goodson, J. L. (2010). Cryptic regulation of vasotocin neuronal activity but not anatomy by sex steroids and social stimuli in opportunistic desert finches. *Brain, Behavior and Evolution*, 75(1), 71–84. doi:10.1159/000297522
- Kelly, A. M., & Goodson, J. L. (2013). Behavioral relevance of species-specific vasotocin anatomy in gregarious finches. *Frontiers in Neuroscience*, 7(December), 242. doi:10.3389/fnins.2013.00242
- Kelly, A. M., & Goodson, J. L. (2014a). Hypothalamic oxytocin and vasopressin neurons exert sex-specific effects on pair bonding, gregariousness, and aggression in finches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(16), 6069–74. doi:10.1073/pnas.1322554111

- Kelly, A. M., & Goodson, J. L. (2014b). Personality is tightly coupled to vasopressin-oxytocin neuron activity in a gregarious finch. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8(February), 55. doi:10.3389/fnbeh.2014.00055
- Kelly, A. M., Kingsbury, M. A., Hoffbuhr, K., Schrock, S. E., Kabelik, D., Thompson, R. R., & Goodson, J. L. (2011). Vasotocin Neurons and Septal V1a-like Receptors Potently Modulate Songbird Flocking and Responses to Novelty. *Hormones and Behavior*, 60(1), 12–21. doi:10.1016/j.yhbeh.2011.01.012.Vasotocin
- Kimura, T., Okanoya, K., & Wada, M. (1999). Effect of testosterone on the distribution of vasotocin immunoreactivity in the brain of the zebra finch, *Taeniopygia guttata castanotis*. *Life Sciences*, 65(16), 1663–1670. doi:10.1016/S0024-3205(99)00415-4
- Kingsbury, M. A. (2015). New perspectives on vasoactive intestinal polypeptide as a widespread modulator of social behavior. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 6, 139–147. doi:10.1016/j.cobeha.2015.11.003
- Kingsbury, M. a., & Goodson, J. L. (2014). Pair bond formation is impaired by VPAC receptor antagonism in the socially monogamous zebra finch. *Behavioural Brain Research*, 272, 264–268. doi:10.1016/j.bbr.2014.06.042
- Kingsbury, M. a., Jan, N., Klatt, J. D., & Goodson, J. L. (2015). Nesting behavior is associated with VIP expression and VIP–Fos colocalization in a network-wide manner. *Hormones and Behavior*, 69, 68–81. doi:10.1016/j.yhbeh.2014.12.010
- Kingsbury, M. A., Miller, K. M., & Goodson, J. L. (2013). VPAC receptor signaling modulates grouping behavior and social responses to contextual novelty in a gregarious finch: A role for a putative prefrontal cortex homologue. *Hormones and Behavior*, 64(3), 511–518. doi:10.1016/j.yhbeh.2013.07.004
- Klatt, J. D., & Goodson, J. L. (2013a). Oxytocin-like receptors mediate pair bonding in a socially monogamous songbird. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 280(1750), 20122396. doi:10.1098/rspb.2012.2396
- Klatt, J. D., & Goodson, J. L. (2013b). Sex-specific activity and function of hypothalamic nonapeptide neurons during nest-building in zebra finches. *Hormones and Behavior*, 64(5), 818–824. doi:10.1016/j.yhbeh.2013.10.001
- Kuenzel, W. J., Mccune, S. K., Talbot, R. T., Sharp, P. J., & Hill, J. M. (1997). Sites of Gene Expression for Vasoactive Intestinal Polypeptide Throughout the Brain of the Chick (*Gallus domesticus*). *Journal of Comparative Neurology*, 381(1), 101–118.
- Leung, C. H., Abebe, D. F., Earp, S. E., Goode, C. T., Grozhik, A. V, Mididoddi, P., & Maney, D. L. (2011). Neural Distribution of Vasotocin Receptor mRNA in Two Species of Songbird. *Endocrinology*, 152(12), 4865–4881. doi:10.1210/en.2011-1394
- Maney, D. L., Erwin, K. L., & Goode, C. T. (2005). Neuroendocrine correlates of behavioral polymorphism in white-throated sparrows. *Hormones and Behavior*, 48(2), 196–206. doi:10.1016/j.yhbeh.2005.03.004
- Montagnese, C. M., Székely, T., Csillag, A., & Zachar, G. (2015). Distribution of vasotocin- and vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in the brain of blue tit (*Cyanistes coeruleus*). *Frontiers in Neuroanatomy*, 9(July), 1–24. doi:10.3389/fnana.2015.00090
- Montagnese, C. M., Székely, T., Gray, D., Tamás, B., & Zachar, G. (2014). Immunoreactivity Distribution of Vasotocin and Vasoactive Intestinal Peptide in Brain Nuclei of Two Songbird Species with Different Breeding. *Brain, Behavior and Evolution*, 83, 140–149. doi:10.1159/000357831
- Newman, S. (1999). The Medial Extended Amygdala in Male Reproductive Behavior A Node in the Mammalian Social Behavior Network. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 242–257.

- Nixdorf-Bergweiler, B. E., & Bischof, H.-J. (2007). A Stereotaxic Atlas Of The Brain Of The Zebra Finch, *Taeniopygia Guttata*: With Special Emphasis On Telencephalic Visual And Song System Nuclei in Transverse and Sagittal Sections. Letöltés ideje: 2015. március 13.
- Norris, D. O. (2011). *Hormones and Reproduction of Vertebrates Volume 4: Birds*. Academic Press. p 3-4
- Pfaff, D. W., Arnold, A. P., Etgen, A. M., Fahrbach, S. E., & Rubni, R. T. (Eds.). (2009). *Hormones, Brain and Behavior* (Second edi.). Academic Press. p 1766-1767
- Soediono, B. (1989). *Sturkie's Avian physiology*. (C. G. Scanes, Ed.) (Sixth Edit., Vol. 53). Academic Press. doi:10.1017/CBO9781107415324.004. p 704-705
- Soma, K. K. (2006). Testosterone and Aggression: Berthold, Birds and Beyond. *J Neuroendocrinol*, 18(7), 543–551. doi:10.1210/jc.2006-0178
- Voorhuis, T. A. M., & de Kloet, E. R. (1992). Immunoreactive vasotocin in the zebra finch brain (*Taeniopygia guttata*). *Developmental Brain Research*, 69(1), 1–10.
- Young, K. A., Gobrogge, K. L., Liu, Y., & Wang, Z. (2012). The neurobiology of pair bonding: insights from a socially monogamous rodent. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 32(1), 53–69. doi:10.1016/j.yfrne.2010.07.006.THE
- Young, L. J., & Wang, Z. (2004). The neurobiology of pair bonding. *Nature Neuroscience*, 7(10), 1048–54. doi:10.1038/nn1327
- Zann, R. A. (1996). *The Zebra Finch: A Synthesis of Field and Laboratory Studies*. Oxford University Press. p 15-194

10. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném megköszönni témavezetőmnek, Zachar Gergelynek a lehetőséget, hogy részese lehettem a korábban számomra is elérhetetlennek tűnő agykutatás egy apró részletének. Hálás vagyok, hogy bevezetett ebbe a világba, és mindezt kedvesen és segítőkészen tette.

Ugyancsak hatalmas köszönettel tartozok Nyámándy Pirosnak a laborban nyújtott rengeteg segítségért és jó társaságért. Catherine Montagnese-nek szeretném megköszönni az agyterületek beazonosításában és a cikkek felkutatásában nyújtott segítségét.

Köszönet illeti Pogány Ákost, nemcsak a zebra-pintyekért, hanem jó tanácsaiért is.

Szabó Krisztiánnak belső konzulensként nyújtott segítségét és tanácsait köszönöm. Pásztory-Kovács Szilviának hatalmas köszönettel tartozok a statisztikában nyújtott rengeteg segítségért és jó ötletért.

Újfent szeretném megköszönni Gáspár Gábornak, hogy saját idejét nem sajnálva besegített a késő estig elhúzódó immunhisztokémiába.

Végül szeretném megköszönni szüleimnek, kik támogatnak utamon, és barátaimnak, kik elkísérnek azon.

HuVetA - SZIA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: Udvardy Szabina

Elérhetőség (e-mail cím): udvardy.szabina@gmail.com

A feltöltendő mű címe: Vazotocin és vazoaktív intestinalis polipeptid agyi expressziójának nemtől és szaporodási stádiumtól függő változásai zebrapintyeken

A mű megjelenési adatai: Budapest, 2016

Az átadott fájlok száma: 1

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA és a SZIA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédtett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA és a SZIA egynél több (csak a HuVetA és a SZIA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (**egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel**):

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban/SZIA-ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- a Szent István Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a SZIE Állatorvos-tudományi Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

* Jelen nyilatkozat az 5/2011. számú, *A Szent István Egyetemen folytatott tudományos publikációs tevékenységgel kapcsolatos adatbázis kialakításáról és alkalmazásáról* című rektori utasításhoz kapcsolódik, illetve annak alapján készült.

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**



Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA/SZIA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban/SZIA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2016. év 04. hó 28. nap

aláírás
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

*A **HuVetA Magyar Állatorvos-tudományi Archívum** – **Hungarian Veterinary Archive** a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.*

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- az Állatorvos-tudományi Kar és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- a nyílt hozzáférés támogatása.*

*A **SZIA Szent István Archívum** a Szent István Egyetemen keletkezett tudományos dolgozatok tára.*