

Alarmreaksjon hos karuss (*Carassius carassius L.*)

Prosessering av luktstimuli i telencephalon

Tirill Medin og Mari Sandbakken

Forord

Arbeidet med denne oppgaven ble utført ved Institutt for molekylær biovitenskap, program for fysiologi, 2004-2005.

Vi vil først og fremst takke vår veileder professor Kjell B. Døving for god oppfølging både på labben, med det skriftelige arbeidet, og dessuten for at vi har fått delta på konferanser i Sverige og Frankrike. Tusen takk til Hassan og Stine for all hjelp på labben og med skriving av oppgaven, og til Erik og Tobias for innføring i c-Fos metoden.

God hjelp har også blitt hentet utenfor IMBV og flere yrkesgrupper har bidratt til det endelige produktet: Sosialøkonomene ved Hege, norsklærerne ved Agnethe og Lars Håvard, flygelederne ved Audun og bioingeniørene ved Ingun. Tusen takk!

Sist men ikke minst har denne oppgaven vært avhengig av to ulike modellorganismer: Tirill og Mari, som ikke tidligere har vært benyttet i denne typen studier. De ble fraktet til Institutt for molekylær biovitenskap, der de ble oppholdt daglig fra kl 9-17 og foret kl 12. De ser ut til å ha trives godt under disse forholdene.

Oslo, juni 2005-06-27

Tirill Medin

Mari Sandbakken

Sammendrag

Når karuss, *Carassius carassius* L., eksponeres for substanser fra skadet skinn fra fisk av samme art, utløses en karakteristisk atferd kalt alarmreaksjon. Fisken svømmer mot bunnen og virvler opp mudder, som kan gi skjul for en predator. Tidligere studier har vist at reaksjonen formidles av spesifikke deler av lukteorganet. I denne oppgaven ble det undersøkt hvordan et høyere hjernesenter, telencephalon, er involvert i prosessering av alarmstimuli. Tre ulike metoder ble benyttet for å kartlegge hvordan alarmstimuli prosesseres i telencephalon:

- Projesjoner fra sekundærnevronene i bunten av tractus olfactorius som formidler alarmreaksjonen, mMOT (den mediale delen av den mediale bunten) og de andre buntene av traktus ble sporet anatomisk med nervefargen DiI. Studiet viste at bunten mMOT projiserte til et ventromedialt felt prekommissuralt, mens LOT (den laterale bunten) og IMOT (den laterale delen av den mediale bunten) projiserte mer basolateralt. Buntenes projesjoner overlappet i det ventrolaterale feltet prekommissuralt og i det sentrale feltet postkommissuralt.
- Tertiære og høyere ordens nevroner som ble aktivert ved stimulering med skinnekstrakt ble kartlagt immunohistokjemisk ved å farge for transkripsjonsfaktoren c-Fos, som kan brukes som en markør for nervøs aktivitet. Immunoreaktive celler ble markert i fire områder i telencephalon: det mediale området prekommissuralt, det ventrolaterale området prekommissuralt, det dorsolaterale området postkommissuralt, og det sentrale området postkommissuralt.
- Nervøs aktivitet fra nevroner i telencephalon ble registrert ekstracellulært mens lukteepitelet ble stimulert med alarm- og andre luktstimuli: gallesalt, kjønnsferomon og en aminosyreblending. Nevroner i telencephalon svarte på kjemisk stimuli 0-15 s etter at stimuli nådde lukteepitelet, med en frekvensøkning på ca. 100 % som varte i minimum 5 s. De fleste cellene var spesifikke, og svarte

kun på en type stimulus. Noen celler svarte på to eller tre stimuli, men ingen svarte på alle fire stimuli.

Eksperimentene viser at flere områder i telencephalon kan være involvert i alarmprosessering: det mediale og ventrolaterale området prekommissuralt og det dorsolaterale og sentrale området postkommissuralt. Funn fra alle tre metoder viser overensstemmelse for tre av områdene: Det ventromediale området prekommissuralt, det ventrolaterale området prekommissuralt og det sentrale området postkommissuralt. I tillegg ble aktiverte celler påvist immunohistokjemisk og elektrofysiologisk i to områder: det dorsomediale området prekommissuralt og det dorsolaterale området postkommissuralt. Disse to områdene er sannsynligvis involvert i høyere ordens prosessering av alarmstimuli. Både feltene som ble kartlagt anatomisk med DiI, og områdene som ble kartlagt immunohistokjemisk var bilaterale.

Innhold

INNLEDNING1

LUKTEORGANETS ANATOMI OG FUNKSJON.....	3
LUKTEEPITELET	4
LUKTELAPPEN.....	4
TRAKTUS	5
TELENCEPHALON.....	6
PROBLEMSTILLING	17

MATERIALE OG METODER.....18

KARUSS	18
ANATOMISK KARTLEGGING AV BUNTENES PROJEKSJONER	18
IMMUNOHISTOKJEMISK KARTLEGGING AV TERTIÆRE OG HØYERE ORDENS NEVRONER.....	14
ELEKTROFYSIOLOGISKE REGISTRERINGER.....	16
LØSNINGER.....	20

RESULTATER.....27

ANATOMISK KARTLEGGING AV BUNTENES PROJEKSJONER	21
PROJEKSJONER FOR mMOT	21
PROJEKSJONER FOR LOT/LMOT	25
PROJEKSJONER FOR mMOT OG LOT/LMOT IPSI- VERSUS KONTRALATERALT	27
EKSTRA-TELENCEPHALISKE PROJEKSJONER.....	27
IMMUNOHISTOKJEMISK KARTLEGGING AV TERTIÆRE OG HØYERE ORDENS NEVRONER.....	28
IMMUNOREAKTIVE OMRÅDER	29
IPSI- VERSUS KONTRALATERAL HEMISFÆRE	30
ELEKTROFYSIOLOGISKE REGISTRERINGER.....	33
EFFEKT AV KJEMISKE STIMULI	35
OMRÅDENES SPESIFISITET FOR ALARMSTIMULI	37
OMRÅDER I TELENCEPHALON SOM KAN VÆRE INVOLVERT I ALARMREAKSJONEN	40

DISKUSJON.....42

KONGRUENS MED TIDLIGERE FUNN.....	43
ANATOMISK KARTLEGGING AV BUNTENES PROJEKSJONER	43
PROJEKSJONER FOR DE ULIKE BUNTENE I TELENCEPHALON	43
EKSTRA-TELENCEPHALISKE PROJEKSJONER.....	45
IMMUNOHISTOKJEMISK KARTLEGGING AV TERTIÆRE OG HØYERE ORDENS NEVRONER.....	47
SUBCELLULÆR FARGING	47
TERTIÆRE OG HØYERE ORDENS OMRÅDER.....	48
ELEKTROFYSIOLOGISKE REGISTRERINGER: EFFEKT AV KJEMISKE STIMULI PÅ CELLENES FYRINGSMØNSTER.....	49

PROSESSERING AV LUKTSTIMULI I TELENCEPHALON	50
FORSLAG TIL VIDERE STUDIER.....	51
<u>KONKLUSJON</u>	<u>52</u>
<u>REFERANSER.....</u>	<u>53</u>

Innledning

Alarmreaksjon ble første gang beskrevet hos ørekyte av Karl von Frisch (von Frisch, 1941). Han observerte at substanser fra skadet fiskeskinn utløste en karakteristisk atferd hos annen fisk i stimen. Fisken svømte raskt til skjulesteder nær bunnen, en atferd som kan tolkes som en antipredatoratferd. Von Frisch viste at reaksjonen formidles av luktesansen, og at det spesielle “skrekkstoffet” er en eller flere substanser som frigis fra skadet epidermis. Alarmreaksjon har senere blitt påvist hos en rekke arter fisk, hovedsakelig i overorden Ostariophysi (Pfeiffer, 1962; Smith, 1992). Atferdsmønsteret varierer, sannsynligvis som følge av tilpasning til ulike miljøer. I denne oppgaven studeres alarmreaksjon hos karuss. Karuss har mudderbunn i sitt naturlige miljø. Alarmreaksjonen arter seg ved at fisken svømmer med raske, stakkato bevegelser mot bunnen og virvler opp mudder som skjuler den for en eventuell predator.

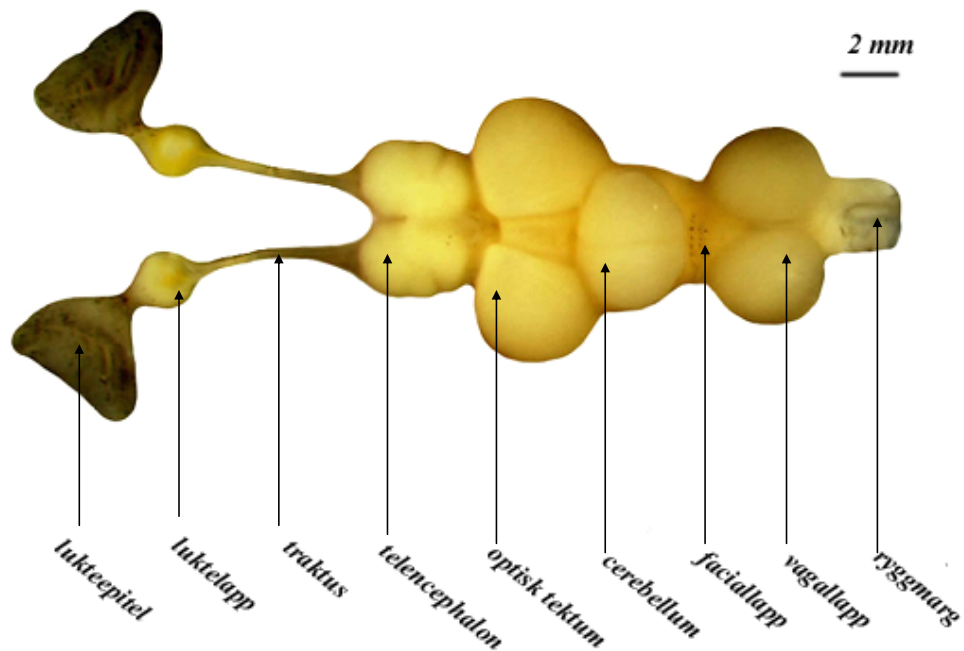
Hos karuss har senere studier vist at alarmreaksjon formidles av helt spesifikke deler av lukteorganet. Lukteorganet hos fisk kan deles inn i lukteepitel, bulbus olfactorius (luktelappen) og tractus olfactorius (traktus). Alarmreaksjonen medieres av en spesiell type sanseceller i lukteepitelet (Hamdani el & Døving, 2002). Disse sansecellene projiserer til et bestemt område i luktelappen (Hamdani el & Døving, 2003). Fra luktelappen til et høyere hjernesenter, telencephalon, formidles alarmreaksjonen av sekundære sanseceller som danner en egen bunt av traktus (Hamdani *et al.*, 2000).

Hvor de sekundære sansecellene projiserer i telencephalon, er ikke kartlagt hos karuss. Hvordan telencephalon er involvert i prosessering av alarmstimuli er heller ikke studert, verken anatomisk eller funksjonelt. Hovedmålet med denne oppgaven er å studere prosessering av alarmstimuli i telencephalon. Ved å applisere nervefargen DiI på de ulike buntene av traktus, spores sekundærnevronenes projeksjoner i telencephalon anatomisk. Videre studeres aktivering av tertiære og høyere ordens nevroner. Lukteorganet eksponeres først for alarmstimuli. Deretter farges telencephalon immunohistokjemisk for proteinet c-Fos, som kan brukes som en markør for økt nervøs aktivitet. Ekstracellulære

registreringer fra nevroner i telencephalon gjøres med utgangspunkt i resultater fra DiI- og c-Fos-eksperimentene. Nervøs aktivitet registreres mens lukteepitelet stimuleres med alarm- og andre luktstimuli: gallesalt, kjønnsferomon og en aminosyreblending.

Lukteorganets anatomi og funksjon

Fiskens lukteorgan er involvert i flere sentrale livsprosesser som matsøk, gyteatferd, migrasjon og slektsgjenkjenning. Ulike luktstimuli kan utløse karakteristiske atferdsmønstre. Aminosyrer, nukleotider og polyaminer er knyttet til matsøk, kjønnsferomoner til gyteatferd, og gallesalter til migrasjon og slektsgjenkjenning (Hamdani & Døving, 2005). Substanser som frigis fra ett individ og har spesifikk effekt på individer av samme art, kalles feromoner. Både alarmsubstans, kjønnsferomon og gallesalt er feromoner. Figur 1 viser en oversikt over lukteepitelet og hjernen hos karuss.



Figur 1: Dorsalt oversiktsbilde av lukteepitelet og hjernen hos karuss

Hos torskfisk, karpefisk og maller er traktus lang fordi luktelappen er lokalisert nær lukteepitelet. Disse artene er derfor godt egnet for å manipulere traktus eksperimentelt (foto E.H. Hamdani).

Lukteepitelet

Det perifere lukteorganet hos fisk består av to dorsalt plasserte luktegroper. I basis av hver grop er en rosett som er organisert i lameller med lukteepitel. Hver grop har en fremre og en bakre åpning. lukteepitelet eksponeres for luktstimuli ved at vann strømmer inn gjennom den fremre åpningen, og ut gjennom den bakre. I lukteepitelet finnes tre typer sanseceller:

- Cilierte sanseceller (Ichikawa & Ueda, 1977)
- Mikrovilliære sanseceller (Thommesen, 1983)
- Sanseceller kalt kryptceller (Hansen & Zeiske, 1998; Hansen & Finger, 2000)

Hos karuss er cellekroppen til hver celletype lokalisert i bestemte lag i epitelet (Fig. 2) De cilierte sansecellene har lange dendritter, og cellekroppen i dype lag av epitelet.

Mikrovilliære sanseceller har cellekroppen i midtre lag av epitelet. Kryptceller har korte dendritter og cellekroppen er lokalisert i apikale lag av lukteepitelet. De morfologiske forskjellene reflekterer trolig ulike funksjonelle egenskaper. Hos gullfisk og maller er det vist at hver av celletypene uttrykker en egen klasse av reseptorer og er sensitive for ulike typer luktstimuli (Ngai *et al.*, 1993; Hansen *et al.*, 2003; Hansen *et al.*, 2004). Sanseceller med lik morfologi og funksjon er spredt i lukteepitelet, men konvergerer til de samme områdene av luktelappen. Funksjonelle egenskaper har hos karuss blitt utledet fra projeksjonene til luktelappen. Cilierte sanseceller projiserer til mediale områder, som er sensitive for skinnestrakt. De blir derfor antatt å formidle alarmstimuli (Hamdani *et al.* & Døving, 2002). Cilierte celler er imidlertid knyttet til gallesalter hos ørret (Thommesen, 1983). De Mikrovilliære sansecellene projiserer til laterale deler av luktelappen, som er sensitive for aminosyrer, og aktiveres derfor trolig av denne typen luktstimuli (Hamdani *et al.*, 2001). Kryptcellenes funksjon er ikke kjent, men de kan være sensitive for kjønnsferomoner (Hamdani & Døving, 2005).

Luktelappen

Fra lukteepitelet projiserer de primære sansecellene via nervus olfactorius til luktelappene. Luktelappene er to ovale strukturer. I luktelappen terminerer sansecellene i

synaptiske strukturer kalt glomeruli, hvor de konvergerer på sekundærnevroner. Morfologisk like sanseceller projiserer til glomeruli i samme område av luktelappen (Fig. 2). En kjemotopisk inndeling av luktelappen hos fisk, der spesifikke deler aktiveres av bestemte luktstimuli er beskrevet i flere studier (Thommesen, 1978; Døving *et al.*, 1980; Friedrich & Korsching, 1997). Hos karuss er det vist at cilierte sanseceller projiserer til mediale områder i luktelappen, som aktiveres av alarmstimuli (Hamdani *et al.* & Døving, 2002, 2003). Laterale områder sensitive for aminosyrer (Hamdani *et al.*, 2001). Ventrale områder er trolig sensitive for kjønnsferomon (Hamdani & Døving, 2005). Fra luktelappen projiserer sekundærnevronene via traktus til telencephalon og andre høyere hjernesentere.

Traktus

Traktus forbinder luktelappen og telencephalon (Fig.1). Aksonene som danner traktus er fra sekundære og muligens tertiære nevroner. Traktus kan deles i tre ulike bunter (Sheldon, 1912) (Fig. 2):

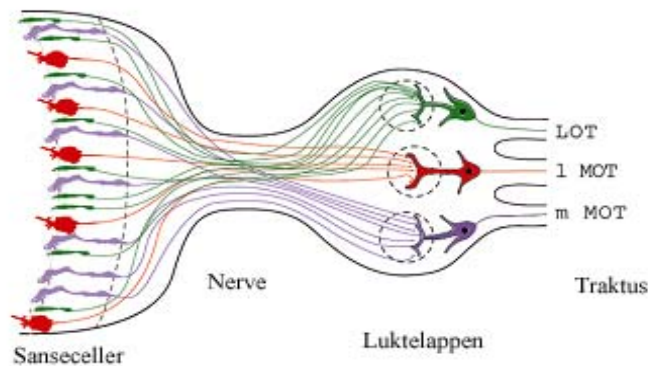
- LOT (tractus olfactorius lateralis); den laterale bunten
- IMOT (tractus olfactorius medialis, pars lateralis); den laterale delen av den mediale bunten
- mMOT (tractus olfactorius medialis, pars medialis); den mediale delen av den mediale bunten.

Buntene inneholder fibre med ulik diameter og myeliniseringsgrad (Døving & Gemne, 1966). Den anatomiske inndelingen av traktus og det faktum at traktus inneholder ulike typer aksoner, reflekterer trolig ulike funksjonelle egenskaper. Inndelingen viderefører den kjemotopiske organiseringen i luktelappen, der spesifikke deler aktiveres av ulike stimuli. Den funksjonelle inndelingen av buntene i traktus ble første gang vist hos torsk. Elektrisk stimulering av mMOT induserte en fryktsrespons. Stimulering av IMOT induserte gyteatferd, mens stimulering av LOT induserte to typer atferd knyttet til matsøk (Døving & Selset, 1980). En liknende funksjonell inndeling er beskrevet hos gullfisk, der gyteatferd har blitt knyttet til MOT (Stacey & Kyle, 1983; Demski & Dulka, 1984). Hos karuss har atferdsforsøk der en har kuttet de ulike buntene, vist at mMOT medierer

alarmreaksjonen (Hamdani *et al.*, 2000), IMOT gyteatferd (Weltzien *et al.*, 2003) og LOT matsøk (Hamdani *et al.*, 2001)

Efferente fibre

Traktus inneholder i tillegg til afferente fibre fra luktelappen, efferente fibre som projiserer til luktelappen (Sheldon, 1912). Efferente fibre fra telencephalon og høyere deler av hjernen kalles sentrifugalfibre. De to luktelappene forbindes også direkte av fibre som projiserer via traktus. Disse interbulbære fibre krysser kontralateralt i telencephalon via kommissurer (von Bartheld *et al.*, 1984). Sentrifugalfibre kan virke i prosessering av alarmstimuli og gjøre at annen type atferd, for eksempel matsøk, blir undertrykt ved alarmreaksjon (Døving, 1982).



Figur 2: Sansecellenes projeksjoner til luktelappen og videre til de ulike buntene av traktus
Skjematisk fremstilling av den ene siden av lukteorganet. Sansecellene i lukteepitelet (cilierte, mikrovilliære og kryptceller) projiserer via nervus olfactorius (nerve) til spesifikke deler av luktelappen, der de danner synapser med sekundærnevroner. Videre projiserer sekundærnevronene i tre ulike bunter av traktus: mMOT, lMOT og LOT (Hamdani & Døving, 2005).

Telencephalon

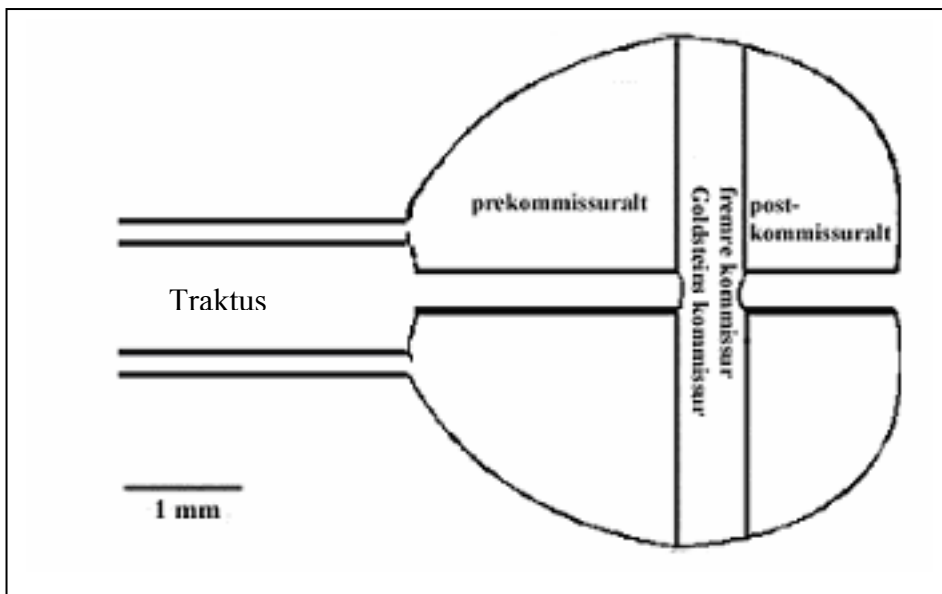
Gross morfologi

Telencephalon består av to ovale hemisfærer. Hver hemisfære er ca. 2000 µm bred, 3000 µm lang og 2000 µm dyp (hos karuss 25 – 40 g). Overflaten er noe ujevn, og ut fra gross

morfologi er en lateral fure (Ypsilliformis) synelig i den dorsale overflaten (Sheldon, 1912). De to hemisfærene forbindes ca. 2000 μm fra rostral pol av to kommissurer. Den mest rostrale er Goldsteins kommissur. Noe kaudalt for Goldsteins kommissur ligger kommissura anterior (fremre kommissur).

Med utgangspunkt i kommissurene, kan telencephalon deles i en fremre, midtre og bakre del (Y = 0 μm i det mest rostrale punktet):

- Prekommissurale telencephalon: Området fra rostral pol og kaudalt til kommissurnivå (Y = 0-2000 μm)
- Kommissurnivå: 300 μm langt område som forbinder hemisfærene ca. 2000 μm kaudalt fra rostral pol (Y= 2000–2300 μm)
- Postkommissurale telencephalon: Området fra kommissurnivå til kaudal pol (Y = 2300–3000 μm)



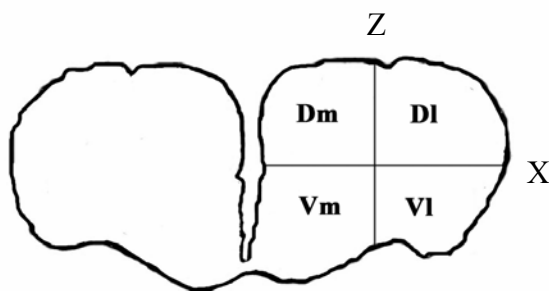
Figur 3: Skjematisk framstilling av telencephalon sett fra dorsalsiden

De to hemisfærene forbindes av Goldsteins kommissur og fremre kommissur ca. 2000 μm fra rostral pol. Telencephalon kan deles i prekommissurale, kommissurale og postkommissurale områder.

Utvikling og nomenklatur

Telencephalon hos benfisk utvikles ved evaginasjon av det embryonale nevralkrøret, i motsetning til eversjon som hos andre vertebrater. De laterale ventriklene ligger derfor overfladisk på utsiden av hemisfærene, og telencephalon er organisert annerledes enn hos andre vertebrater. En egen nomenklatur ble utviklet for å beskrive telencephalon hos benfisk (Nieuwenhuys, 1990). Telencephalons organisering varierer imidlertid også blant forskjellige arter fisk, og ventrale og dorsale områder inneholder ulike kjerner som varierer i antall og omfang (Northcutt & Davis, 1983). Luktrelaterte områder samsvarer ikke med den anatomiske inndelingen. Studier av sekundærnevronenes projeksjoner har dermed ikke brukt nomenklaturen konsekvent for å beskrive områder i telencephalon.

I denne oppgaven har vi derfor valgt å beskrive områder i telencephalon med en forenklet nomenklatur, som er mer hensiktsmessig for å beskrive luktrelaterte områder. Hver hemisfære deles i et tredimensjonalt system etter tre akser: x-aksen på tvers av fiskens lengdeakse, dvs. lateralt og mediant, y-aksen langs fisken lengdeakse, dvs. rostralt og kaudalt, og z-aksen på tvers av fiskens lengdeakse, dvs. dorsalt og ventralt. Sentrum i hver hemisfære kan brukes som skille for å definere ventrale områder i forhold til dorsale, og mediale i forhold til laterale (Fig. 4).



Figur 4: Tverrsnitt av telencephalon

Figuren viser et eksempel på inndeling i mediale versus laterale, og dorsale versus ventrale områder. Dm = det dorsomediale området, Dl = det dorsolaterale området, Vm = det ventromediale området, Vl = det ventrolaterale området.

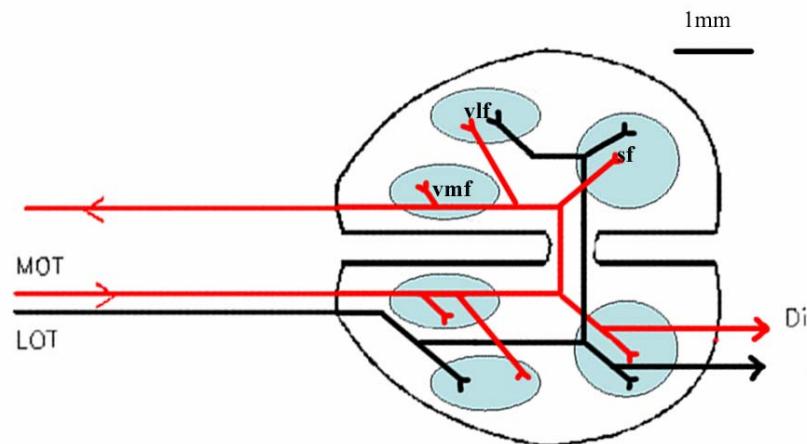
Luktprojeksjoner

De ulike buntene av traktus entrer rostrale telencephalon i forskjellige områder. Anatomiske studier av luktprojeksjoner i telencephalon har en lang tradisjon. De tidligste studiene fant projeksjoner fra sekundære fibre til hele telencephalon, og beskrev derfor telencephalon som en luktehjerne (Ariens Kappers, 1906). Alle nyere studier viser derimot at de sekundære luktfibrene projiserer til avgrensede områder, og en direkte forbindelse til dorsale områder er ikke påvist. Dorsale områder av telencephalon kan likevel være involvert i prosessering av luktstimuli, men på et høyere nivå (Northcutt & Davis, 1983).

Tidligere studier har i varierende grad skilt mellom projeksjoner fra de ulike buntene av traktus. Dette kan ha sammenheng med at man ikke kjente til den funksjonelle inndelingen av traktus. Studiene er gjort hos forskjellige arter fisk, og ulik bruk av metode og nomenklatur gjør det vanskelig å sammenligne funnene. Imidlertid går tre terminale felt i telencephalon igjen (Finger, 1975; Ichikawa, 1975; von Bartheld *et al.*, 1984; Levine & Dethier, 1985; Rooney *et al.*, 1992; Sas *et al.*, 1993; Matz, 1995)

- Det ventromediale feltet, vmf
- Det ventrolaterale feltet, vlf
- Det sentrale feltet, sf

Feltene er skjematisk framstilt i figur 5. I prekommissurale telencephalon terminerer nevroner i det ventromediale og ventrolaterale feltet. Fibre fra MOT terminerer mer medialt enn LOT, men overlapper i deler av feltene. Både MOT og LOT krysser til kontralateral hemisfære via Goldsteins kommissur og fremre kommissur. De kontralaterale feltene tilsvare de ipsilaterale. Postkommissuralt terminerer fibre fra både MOT og LOT i det sentrale feltet. Feltet mottar hoveddelen av projeksjonene fra traktus (Rooney *et al.*, 1992).



Figur 5: Terminale felt i telencephalon

Skjematisk fremstilling av telencephalon sett fra dorsalsiden viser felt som mottar fibre fra luktelappen. Buntene MOT og LOT entrer telencephalon mediallyt og laterallyt. Prekommissuralt terminerer MOT hovedsakelig i vmf: det ventromediale feltet, og LOT i vlf: det ventrolaterale feltet. På kommissurnivå forbindes de to hemisfærene, og fibre krysser kontralateralt. Fibre terminerer postkommissuralt i sf: det sentrale feltet. Buntene projiserer til både unike og overlappende felt. Fibre fra alle buntene projiserer videre til diencephalon (Di).

Ekstra-telencephaliske projeksjoner

Luktprojeksjoner til mer kaudale deler av hjernen er beskrevet i flere studier (Finger, 1975; von Bartheld *et al.*, 1984; Levine & Dethier, 1985; Rooney *et al.*, 1992). Fibre projiserer via telencephalon og terminerer i det preoptiske området, hypotalamus og optiske tektum. Telencephalon innerveres også av fibre fra optiske tektum, trigeminuskjernen, ryggmargen og cerebellum. Fibrene projiserer til store deler av telencephalon, men spesielt til dorsale områder. Anatomiske studier indikerer at sansestimuli fra både syn, hørsel og sidelinjesystemet integreres i telencephalon (Northcutt & Davis, 1983).

Problemstilling

Alarmreaksjon hos karuss formidles av cilierte celler lukteepitelet, som projiserer til mediale deler av luktelappen. De sekundære nevronene projiserer til telencephalon i en egen bunt av traktus, mMOT.

Hvor de sekundære sansecellene projiserer i telencephalon, er ikke kartlagt hos karuss. Hvordan høyere ordens nevroner er involvert i prosessering av alarm- og andre luktstimuli er heller ikke studert, verken anatomisk eller funksjonelt. Ut fra gross morfologi kan en se at de ulike buntene av traktus entrer rostrale telencephalon i ulike områder. Dette kan tyde på at den funksjonelle inndeling er reflektert på høyere nivå.

Informasjon om hvordan alarmstimuli prosesseres i telencephalon kan gi kunnskap om hvordan høyere ordens nevroner er involvert i prosessering av luktstimuli. Kartlegging av de sekundære nevronenes projeksjoner og områder som er aktive ved luktstimulering, kan også være viktig for forståelsen av telencephalons funksjon og evolusjonære utvikling.

I denne oppgaven vil telencephalon bli undersøkt både anatomisk og funksjonelt.

Følgende spørsmål vil belyses:

- Hvilke deler av telencephalon er involvert i alarmreaksjonen?
- Overlapper felt som er innervert av mMOT med felt som er innervert av de andre buntene av traktus?
- Hvordan reagerer cellene i telencephalon på ulike kjemiske stimuli med hensyn til firing og spesifisitet?
- Aktiveres noen områder i telencephalon spesifikt av alarmstimuli?

Materiale og Metoder

Karuss

Karuss, *Carassius carassius* L. (25-40 g. kroppsvekt) ble fanget i Tjernsrud, et lite predatorfritt tjern i Bærum. Fisken ble fraktet til akvarieavdelingen ved Institutt for molekylær biovitenskap, hvor de ble foret tre ganger i uka. Karuss ble brukt i tre ulike studier: anatomisk kartlegging av buntenes projeksjoner, immunohistokjemisk kartlegging av høyere ordens nevroner, og elektrofysiologiske registreringer.

Anatomisk kartlegging av buntenes projeksjoner

27 fisk (25-40g) ble brukt i anatomisk kartlegging.

Fargestoffet DiI

Det fluorescerende fargestoffet DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3', 3'-tetrametylindocarbocyanin perchlorate; Molecular Probes, Eugene OR, USA) ble benyttet for å spore sekundærnevronenes projeksjoner i telencephalon. Nervefargen DiI tilhører en familie av karbocyanine fargestoffer som er lipofile. Diffusjonen skjer i cellemembranen, og fargestoffet antes å ikke krysse synapsene. Diffusjonshastigheten er på ca. $1,2 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ved romtemperatur. Fargestoffet eksiteres i grønt lys (λ_{max} eksitasjon 550 nm) og har maksimal emisjon i det oransje - røde området (λ_{max} emisjon 565 nm).

Anestesi og fiksering

Fisken ble anestesert med benzocain (45mg/l) og plassert i en form. Den ble perfundert transkardialt med 4 % paraformaldehyd i fosfatbuffer, pH 7,4. Hodet ble kuttet på nivå med gjellebuene, og kraniebenet rett over luktelappen og traktus ble fjernet. Preparatet ble postfiksert i 4 % paraformaldehyd i to dager.

DiI-applikasjon

Preparatet ble vasket i fysiologisk saltløsning og plassert under lupe. Vevet i kraniehulen og hinnene rundt telencephalon ble fjernet forsiktig med pinsett. Traktus på den ene siden ble kuttet fri fra luktelappen. Bunten som skulle farges ble separert fra de andre buntene av traktus og løftet opp med pinsett. En flytende løsning av 2 % agar ble applisert over traktus og deler av hjernen. Etter avkjøling ble et lite snitt laget ned til nervebunten. En nål ble brukt for å plassere noen få DiI-krystaller på den avkuttete bunten, og agar ble igjen applisert. Agar hindret uønsket spredning av DiI fra applikasjonsstedet. Fargestoffet ble applisert på traktus på den ene siden, enten på høyre eller venstre bunt. Preparatet ble lagt tilbake i paraformaldehyd og plassert mørkt. Det ble lagret ved romtemperatur i ca. et halvt år, for at DiI skulle diffundere til telencephalon.

Snitting

Hjernen ble dissekert ut og lagt i 30 % sukroseløsning i to døgn ved 4 °C for å trekke ut vann og hindre skader ved frysning. Hjernen ble deretter skylt i PBS, og støpt inn i Tissue-tek (SAKURA, Nederland) ved -30 °C. Telencephalon ble snittet i 100 µm tykke tverrsnitt i cryostat. Temperaturen på preparatet var på -24 °C, og på kniven -26 °C. Snittene ble overført til objektglass (Super Frost Plus, Mentzer Glaser, Tyskland) og fikk tørke ca. en time ved romtemperatur. En dråpe Fluoromont G (Electron Microscopy Sciences, Washington) ble applisert på snittene for å forsterke fluorescensen, før dekkglass ble montert.

Avbildning

Snittene ble undersøkt i et fluorescensmikroskop (Olympus BX 50 WI) med et omega filter (550 nm eksitasjon, 565 nm emisjon). Snittene ble avbildet med et Olympus kamera (DP 50) koplet til en PC (Dell OptiPlex) med programvaren Viewfinder Lite. Bilder ble tatt umiddelbart etter snitting for å unngå diffusjon av fargestoff i snittflaten. Bildene ble senere behandlet med programvaren Photoshop, versjon 5.5. På bilder som viste mMOTs projeksjoner ble rutenett med skala montert. Projeksjonsområdene ble brukt som utgangspunkt for elektrofysiologiske registreringer.

Immunohistokjemisk kartlegging av tertiære og høyere ordens nevroner

Anestesi og immobilisering

14 fisk (25-40g) ble anestesert i benzocain (45mg/l), og deretter gitt en intraperitoneal injeksjon med Saffan (24mg/kg; 2,7 ml/kg). Saffan ble benyttet som anestesimiddel for å oppnå en langvarig anestesi, og fordi middelet sikrer god blodgjennomstrømning ved å dilatere blodårer (Ross & Ross, 1984). Fisken ble pakket inn i et vått papir for å hindre uttørking. Den ble lagt i en form, og festet på hver side av hodet med stålstaver mot orbitalbenet. For å sikre oksygenering, ble fisken tilført springvann gjennom munnen og over gjellene under hele forsøket.

Stimulering

Luktorganet ble kontinuerlig eksponert for kunstig ferskvann gjennom en polyetylenlange. Slangen ble plassert i fiskens fremre nesebor. Væskestrømmen var på ca. 1,2 ml/min. Stimuleringen ble regulert ved hjelp av en ventil. Fisken ble stimulert med skinnekstrakt i 3 min, deretter kunstig ferskvann i 3 min, osv. Kunstig ferskvann hindret uttørking av luktepitelet. Stimuleringen foregikk i en time for å sikre ekspresjon av transkripsjonsfaktoren c-Fos (Matsuoka *et al.*, 1998).

Fiksering og snitting

Umiddelbart etter stimuleringen ble fisken perfundert transkardialt med 4 % paraformaldehyd. Hodet ble kuttet av og videre behandlet for snitting, som omtalt under anatomisk kartlegging. Telencephalon ble snittet i 40 µm tykke tverrsnitt. Snittene fikk tørke ca. en time før de ble lagret i fryser.

Immunohistokjemisk farging

Dag 1

Snittene ble tint ved romtemperatur i ca. 30 min. De ble så dyppet 2 x 5 min i 0,1 % H₂O₂ (Sigma) i metanol (Merck) for å hemme eventuell endogen peroksidaseaktivitet.

Preparatene ble ringet inn med fettpenn for å hindre løsningene som ble applisert i å renne av. Objektglassene ble lagt på papir fuktet med dH₂O, i bokser med lokk for å

unngå uttørking. Snittene ble inkubert en time med kalveserum. Det primære antistoffet mot c-Fos ble så applisert, og snittene ble inkubert over natten ved 4 °C.

Dag 2

Primært antistoff ble igjen applisert i tilfelle noen preparater skulle vært utilstrekkelig dekket med løsning. Snittene ble inkubert i en time, og ble så vasket 3 x 10 min med PBS-TX og inkubert med sekundært antistoff. Deretter ble de vasket 3 x 10 min med PBS-TX, og inkubert en time med S-b-HRP for å fiksure enzymet. Snittene ble vasket 2 x 10 min med PBS-TX og 1 x 10 min i PBS før de ble inkubert med DAB i ca.10 min. Videre ble de vasket 3 x 5 min med PBS. Objektglassene ble så flyttet til små kar og vasket 2 x 5 min i PBS. De ble så dehydrert 3 min i 60 % etanol, 3 min i 70 % etanol, og til slutt 3 min i 95 % etanol. Deretter ble objektglassene dyppet 2 x 3 min i xylen (Merck), og dekkglass ble montert med Eukitt (Chemiteknik, Norge).

Kontroller

En kontrollfisk ble behandlet på samme måte som eksperimentfisk, men ble stimulert med kunstig ferskvann.

Spesifisiteten til det sekundære antistoffet ble kontrollert ved å unnlate å inkubere noen snitt fra telencephalon hos eksperimentfisk med primært antistoff.

Avbildning

Snittene ble observert i lysmikroskop (Olympus BX 50 WI). Et Olympus kamera (DP 50) ble koplet til mikroskopet og videre til en PC (Dell OptiPlex) med programmet Viewfinder Lite. Snittene ble fotografert, og bildene ble senere behandlet med programvaren Photoshop, versjon 5.5. Bilder med skala ble brukt som utgangspunkt for elektrofysiologiske registreringer. Preparatene ble lagret ved romtemperatur.

Elektrofysiologiske registreringer

Anestesi og immobilisering

13 fisk (25-40 g) ble brukt i elektrofysiologiske forsøk. Fisken ble anestesert i benzocain (45mg/l), og deretter gitt en intraperitoneal injeksjon med Saffan (24mg/kg; 2,7 ml/kg). Den ble lagt i en form og festet på hver side av hodet, med stålstaver mot orbitalbenet. For å sikre oksygenering, fikk fisken kontinuerlig tilførsel av springvann gjennom munnen og over gjellene under hele forsøket.

Preparering og stimulering

Deler av det dorsale kraniet ble fjernet, slik at telencephalon og traktus ble tilgjengelig. Først ble et rektangulært snitt i skinnet laget over de aktuelle områdene. Skinnet ble fjernet, og et lite hull ble laget med en spiss skalpell. Deler av kraniet ble fjernet med en kirurgisk benstanse. Cellepapir ble brukt for å suge bort væske. Hinnene rundt telencephalon ble forsiktig fjernet med pinsett.

Fiskens tilstand ble vurdert underveis i forsøket ved å se på blodgjennomstrømningen i årene, og ved å følge med på cellenes nervøse aktivitet i registreringene. Ut fra disse observasjonene synes fiskens tilstand å være god i minst syv timer. Ved forsøkets slutt ble fisken avlivet ved dekapitering.

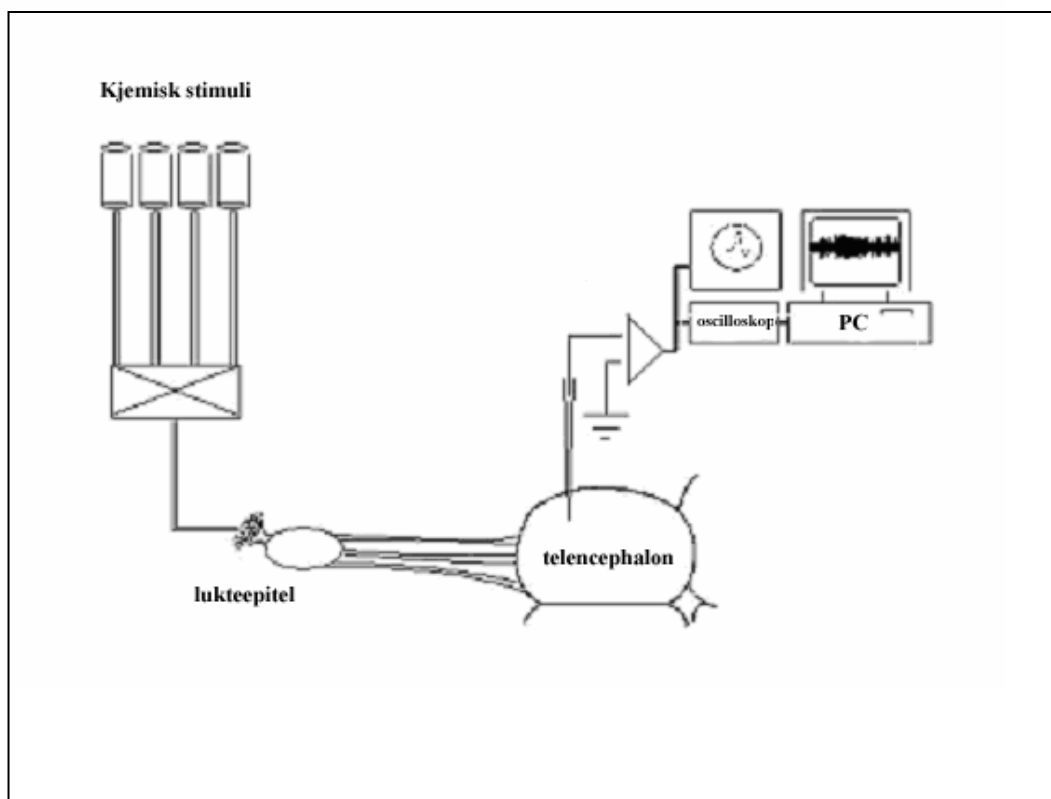
Registrering

Elektroder

Registreringselektroden ble laget av tungsten (Hubel, 1957). Tungstentråd (125 μ m diameter) ble glødet over en gassbrenner og strukket til den ble rett. Tråden ble kuttet i ca. 5 cm lange biter. Elektroden ble spisset ved elektrolyse, ved å dyppe tråden i en mettet KNO_2 løsning ved en AC-spenning på 6 V. Elektroden ble så vasket i vann og tørket. Den ble isolert ved å dyppe den i lakk to ganger (tuppen opp). Kun en liten del av tuppen forble lakkfri.

I figur 6 er oppsettet for elektrofysiologiske forsøk vist. Elektriske signaler ble forsterket 1000 ganger, ved at elektroden var koblet til en differensiell forsterker (DP 301, Warner

Instrument Corporation USA). Signalene ble filtrert mellom 30 Hz - 3 KHz, og et linjefilter på 50 Hz ble aktivert. Forsterkeren var koblet til en audiomonitor og et oscilloskop (Tektronix 565; Portland, USA). Audiomonitoren gjorde at ulike enheter kunne skilles fra hverandre som toner med forskjellig pitch. Fra oscilloskopet ble signalene sendt videre til en PC (Dell OptiPlex) via en analogdigital omformer (μ 1401; CED, UK). En referanseelektrode i sølv ble plassert like ved kraniehulen. Registreringene ble i ettertid analysert i programmet Spike 2 (versjon 4, CED, UK). Programmet markerte også åpning og lukking av ventilene for tilførsel av kjemisk stimuli.



Figur 6: Sjematisk oversikt over oppsettet brukt i elektrofysiologiske forsøk

Registreringssteder

Registreringselektroden ble festet til en holder montert på en motorisert mikromanipulator. Mikromanipulatoren anga elektrodens posisjon, og kunne beveges i et tredimensjonalt plan. Følgende akser ble brukt: x-aksen på tvers av fiskens lengdeakse, dvs. lateralt og medialt, y-aksen langs fisken lengdeakse, dvs. rostralt og kaudalt, og z-aksen på tvers av fiskens lengdeakse, dvs. dorsalt og ventralt. Ulikt origo for x-y-aksen og for z-aksen ble valgt av praktiske hensyn. Som x-y-origo ble mMOTs inngang til telencephalon valgt. Dette punktet var relativt lett å bestemme. For å unngå at elektrodetuppen skulle komme borti traktus og ødelegge fibere eller blodårer ble z-aksens origo bestemt i et eget punkt. Aksens origo ble bestemt ved den mest dorsale flaten av telencephalon i $x = 200 \mu\text{m}$ og $y = 1000 \mu\text{m}$. Alle registreringer ble utført på fiskens høyre side, dvs. ipsilateralt for stimuleringen.

Registreringsstedene ble hovedsakelig valgt på bakgrunn av områdene funnet i den anatomiske og immunohistokjemiske kartleggingen. For å unngå å ødelegge nervevevet ble registreringene startet dorsalt i hver penetreringstrasè. Elektroden ble senket langsomt ned z-aksen samtidig som den nervøse aktiviteten ble observert. Registreringer ble gjort med ca. $100 \mu\text{m}$ avstand, og i noen tilfeller i områder der spontanaktiviteten endret seg eller aksjonspotensialene var spesielt tydelige.

Kjemisk stimulering

Fisken ble eksponert for fire luktstimuli:

- Skinnekstrakt (2g/l)
- Kjønnferomonet $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20P) (10^{-5}M) (Sigma, Norge)
- Gallesaltet taurolitocholsyre (10^{-5}M) (Sigma, Norge)
- En aminosyreblending av L-alanin, arginin, glutamat og methionin (10^{-5}M) (Sigma, Norge)

Stimuli ble injisert i høyre fremre nesebord gjennom en polyetylenslange (1,2 ml/min). Tilførselen av stimuli ble regulert gjennom en serie ventiler. I hvert registreringssted ble hver stimulus injisert etter tur, men i tilfeldig rekkefølge. Spontanaktiviteten ble observert

i ca. 20 s før første stimulering. Hver stimulus ble applisert i 10 s. Lukteorganet ble eksponert for kunstig ferskvann i ca. 50 s mellom hver stimulering. Kunstig ferskvann fungerte som kontroll, skylte lukteepitelet mellom stimuleringene og beskyttet mot uttørking.

Statistiske metoder

To kji kvadrat (χ^2)-tester ble brukt for å undersøke cellenes respons på kjemisk stimuli. Kun de spesifikke cellene var gjenstand for analyse. Variabelen er kvalitativ, dvs. respons ikke respons på et gitt kjemisk stimuli, og observasjonene er binomiske fordelte. Gjennomsnittet av de forventede verdiene er fem eller mer, og den minste forventede verdien er høyere enn en. Vi har derfor nok observasjoner til å bruke normalfordelingen som en tilnærming til den binomiske, og vi kan derfor bruke χ^2 -testen for å sammenligne sannsynlighetene i de forskjellige cellene i tabellen. Først ble en χ^2 -test for "contingency tables" brukt. Denne testen sammenligner to utvalg. Det ble undersøkt om celler i de to ulike felt responderte forskjellig på de fire stimuli generelt, og på skinnekstrakt spesielt. Deretter ble "Pearsons χ^2 -test for goodness of fit" brukt. Denne testen sammenligner sannsynligheter i ett utvalg. Hvert felt ble undersøkt hver for seg for å se om cellene responderte forskjellig på de fire stimuliene innen hvert felt.

Løsninger

- Benzocain stockløsning: Benzocain 50g/l 96% etanol
- Paraformaldehyd 4 % i PBS pH 7, 4
- Fysiologisk saltløsning (g/l): NaCl (8,33), KCl (0,22), MgSO₄ x7H₂O (0,19)
- PBS: (g/l): NaH₂ PO₄ x2H₂O (2,622), Na₂ HPO₄ x2H₂O (14,418), pH justert til 7,4
- Kunstig ferskvann (g/l): NaCl (2,9 x 10⁻²), KCl (3,7 x 10⁻³), CaCl₂ (5,2 x 10⁻²), NaHCO₃ (1,6 x 10⁻²)
- Skinnestrakt: 2 g skinn ble knust i en morter og fortynnet med 100 ml dH₂O. Løsningen ble deretter sentrifugert på 4000 omdreininger pr. min i 4 min. Supernatanten ble fortynnet 1:10 i kunstig ferskvann og filtrert. Løsningen ble frosset ned, og tint for hvert forsøk
- Agar 2 % i paraformaldehyd 4 %
- KNO₂ løsning, mettet
- PBS for c-Fos (pH 7, 4) (g/l): NaCl (8, 76), KCl (0, 2), NaH₂PO₄x2H₂O (0,312), Na₂HPO₄x2H₂O (0,356)
- PBS-TX: PBS med 0,3 % Triton X-100 (Sigma). Triton X gjør cellemembranen permeabel
- Kalvserum: normalt kalveserum (MedProbe, Norge) fortynnet 1:10 i PBS-TX.
- Primært antistoff: polyklonalt kanin-antiserum (Oncogen) Fortynnes 1:10 000 i 1 % normalt kalvserum i PBS-TX
- Sekundært antistoff: biotinmerket geit antikanin serum (Dako A/S, Danmark) Fortynnet 1:200 i 1 % normalt kalveserum i PBS-TX.
- S-b-HRP: streptavidin-biotin-Horseradish peroxidase kompleks (Strept ABC complex/HRP, Dako A/S, Danmark). Fortynnet etter leverandørens instruks
- DAB: 3,3-diaminobenzidin løsning (Dako A/S, Danmark.) Laget etter leverandørens instruks
- H₂O₂ løsning: 0,1 % H₂O₂ i metanol

Om ikke annet er nevnt i den overgående listen eller i teksten er alle kjemikalier brukt fra Sigma.

Resultater

Anatomisk kartlegging av buntenes projeksjoner

Ut fra gross morfologi kan en se at de tre buntene av traktus entrer rostrale telencephalon i forskjellige områder. Buntene mMOT entrer ventromedialt, lMOT og LOT mer lateralt. Nervefargen DiI ble applisert på den buntene som formidler alarmreaksjonen, mMOT, for å undersøke hvordan fibrene projiserer i telencephalon. Fibrene fra lMOT og LOT ble også sporet for å kunne sammenligne projeksjonene, og se om de ulike buntene innnærer unike eller overlappende områder. Bilder fra 7 preparater som viste mMOTs projeksjoner og 4 preparater som viste LOT/lMOTs projeksjoner ble sammenlignet. Områdene var klart avgrenset, og er derfor kalt felt. Bildene i figur 7 og 8 er eksempler på stereotypiske felt. (Telencephalons størrelse kunne variere med et par hundre μm i de ulike preparatene).

Projeksjoner for mMOT

Prekommissurale telencephalon

Det ventromediale feltet

Et ventromedialt felt markeres der mMOT entrer telencephalon (Fig. 7A). Feltet strekker seg ca. 2000 μm kaudalt, til kommissurnivå (Fig. 7E). Ettersom fibrene projiserer, markeres feltet mer dorsalt (Fig. 7C, 7D).

Det ventrolaterale feltet

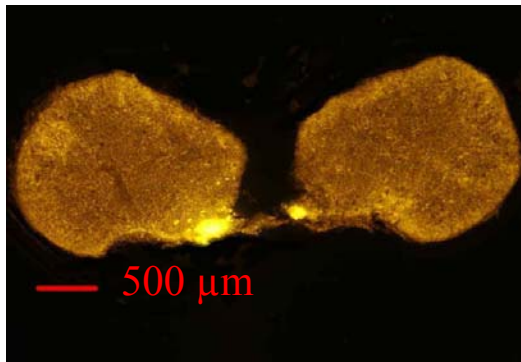
Et ventrolateralt felt markeres ca. 1000 μm fra rostral pol (Fig. 7B). Feltet strekker seg ca. 1000 μm kaudalt, til kommissurnivå. (Fig. 7E). En tynn bunt projiserer mellom det ventromediale og det ventrolaterale feltet (Fig 7C).

Kommissurnivå

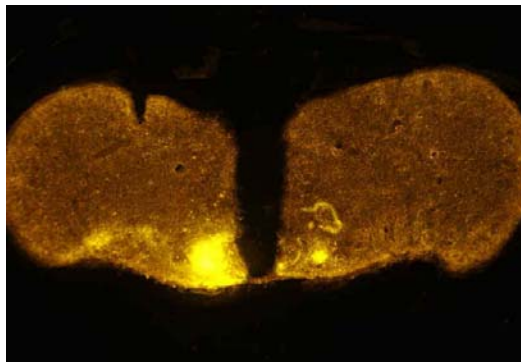
Fibere fra mMOT krysser til den kontralaterale hemisfæren i Goldsteins kommissur ca. 2000 μm fra rostral pol (Fig. 7E). Noe kaudalt for Goldsteins kommissur krysser fibere dorsalt i fremre kommissur (Fig. 7F). I den kontralaterale hemisfæren projiserer fibere både rostralt og kaudalt til felt som tilsvarende de ipsilaterale, men er mindre intenst markert.

Postkommissurale telencephalon*Det sentrale feltet*

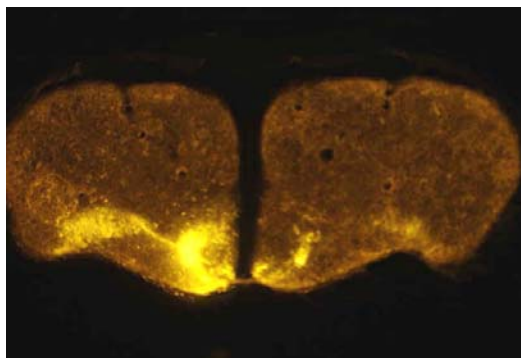
Postkommissuralt markeres et sentralt felt (Fig. 7G), som strekker fra kommissurnivå og ca. 500 μm kaudalt.



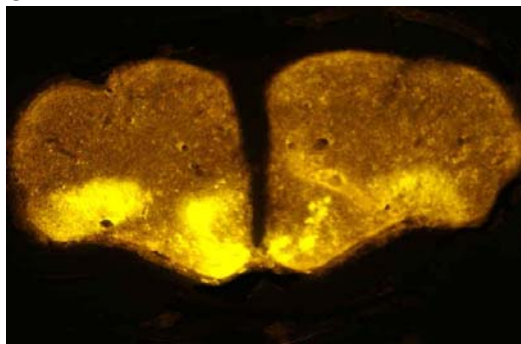
A



B



C



D

A-H: Bunten mMOTs projeksjoner

A: Det ventromediale feltet

Tverrsnitt prekommissuralt i $Y = 600 \mu\text{m}$ viser at mMOT entrer rostrale telencephalon og et ventromedialt felt markeres. Legg merke til fluorescens i kontralaterale mMOT.

B: Det ventromediale feltet og det ventrolaterale feltet

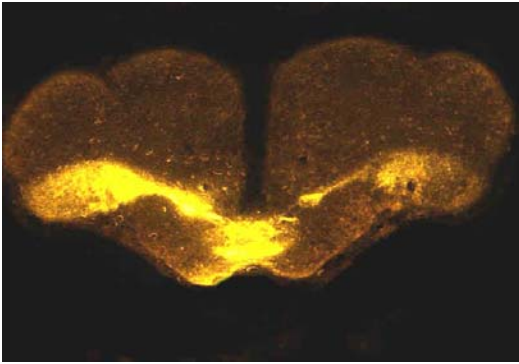
Tverrsnitt prekommissuralt i $Y = 1000 \mu\text{m}$ viser et tydelig markert felt ventrolateralt. Det ventromediale feltet markeres også i den kontralaterale hemisfæren, men svakere. Dorsalt er noe svak fluorescens.

C: Det ventromediale og det ventrolaterale feltet

Tverrsnitt prekommissuralt i $Y = 1200 \mu\text{m}$ viser at fluorescensen brer seg til mer dorsale og laterale områder. Kontralateralt er feltet svakere markert.

D: Det ventromediale og det ventrolaterale feltet

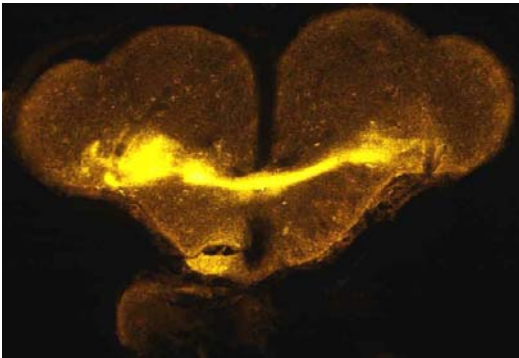
Tverrsnitt prekommissuralt i $Y = 1400 \mu\text{m}$ viser store bilaterale felt både ventromedialt og ventrolateralt



E: Buntten mMOT krysser i Goldsteins kommissur

Tverrsnitt på Goldsteins kommissurnivå i $Y = 1600 \mu\text{m}$ viser at de ventromediale feltene blir mindre. Fibere krysser i Goldsteins kommissur til den kontralaterale hemisfæren.

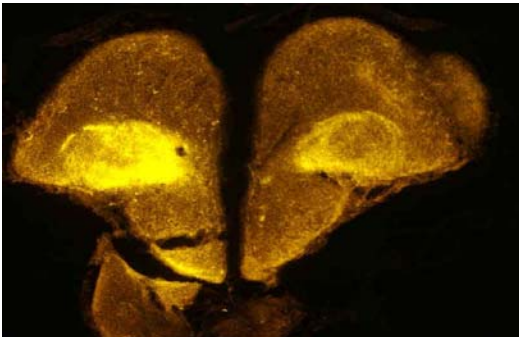
E



F: buntten mMOT krysser i fremre kommissur

Tverrsnitt på fremre kommissurnivå i $Y = 1800 \mu\text{m}$ viser fibere som krysser dorsalt i kommissuren. De fluorescerende feltene er sentrale og bilaterale.

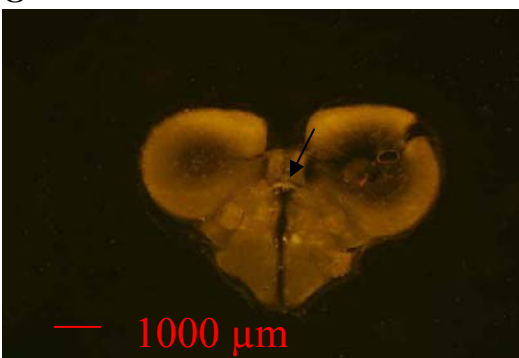
F



G: Det sentrale feltet

Tverrsnitt postkommissuralt i $Y = 2000 \mu\text{m}$ viser at de sentrale feltene brer seg mer dorsalt.

G



H: Buntten mMOT krysser i habenula kommissur

Tverrsnitt i $Y = 3200 \mu\text{m}$ viser at buntten mMOT krysser i habenula kommissur

H

Figur 7 (A-G): Buntten mMOTs projeksjoner i telencephalon, H: Buntten mMOTs projeksjoner i habenula

Projeksjoner for LOT/IMOT

Prekommissurale telencephalon

Det basolaterale feltet

I de mest rostrale delene av telencephalon projiserer fibre fra LOT/IMOT til et basolateralt felt (Fig. 8A). Feltet er markert mellom feltene som innveres av mMOT (Fig. 7B).

Det ventrolaterale feltet

Fibre fra LOT/IMOT projiserer til det ventrolaterale feltet (Fig. 8B) (Feltet mottar også projeksjoner fra mMOT (Fig.7C)).

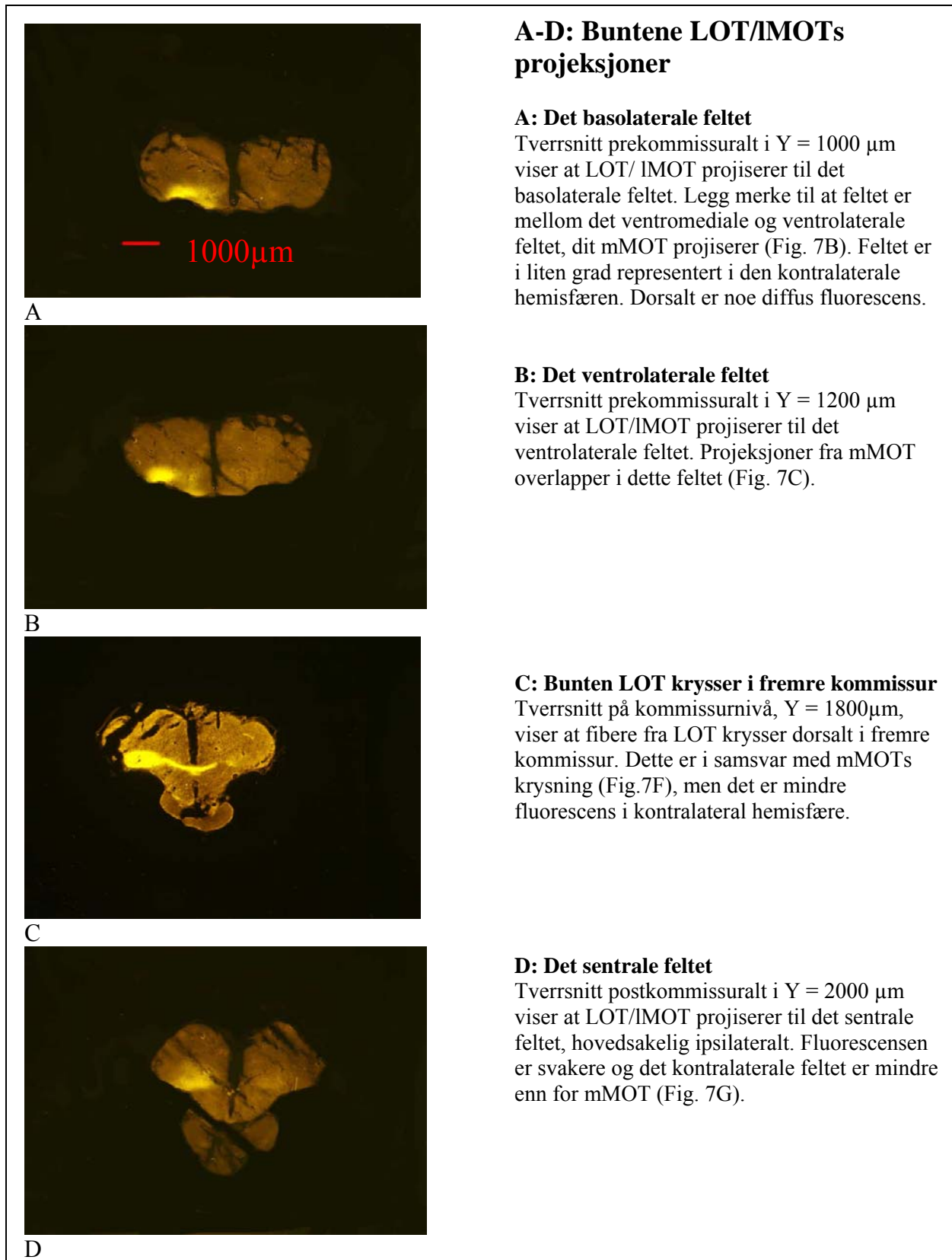
Kommissurnivå

Fibre fra LOT/IMOT krysser i både Goldsteins kommissur og i fremre kommissur. Fibrene krysser i de samme områdene av kommissurene som mMOTs fibre (Fig. 8C), men områdene er ikke like intenst fluorescerende i Goldsteins kommissur. Fibrene som krysser, projiserer både rostralt og kaudalt i den kontralaterale hemisfæren og gir opphav til svakt fluorescerende felt.

Postkommissurale telencephalon

Det sentrale feltet

Postkommissuralt projiserer fibre fra LOT/IMOT til det samme sentrale feltet som mMOT (Fig. 8D), slik at fibrene fra de ulike buntene overlapper.



Figur 8 (A-D): Buntene LOT/IMOTs projeksjoner i telencephalon

Projeksjoner for mMOT og LOT/IMOT ipsi- versus kontralateralt

Fibere fra både mMOT og LOT/IMOT krysser kontralateralt på kommissurnivå. De kontralaterale feltene tilsvarer de ipsilaterale, men er mindre og fluorescerer ikke like sterkt. Kontralaterale projeksjoner fra mMOT er mer intense enn fra LOT/IMOT.

Ekstra-telencephaliske projeksjoner

Projeksjoner til andre deler av hjernen ble observert i noen få preparater. Fordi projeksjonene er ekstra-telencephaliske, er begrenset bakgrunn gitt i innledningen, og funnene blir ikke diskutert i detalj. Likevel finner vi observasjonene så interessante at vi synes de er verdt å beskrive.

Fluorescens i den kontralaterale traktus

Etter applikasjon av DiI på mMOT på den ene siden, observeres fluorescens i kontralaterale mMOT (Fig. 7A). Fluorescens i kontralaterale traktus tyder på en direkte forbindelse mellom de to luktelappene. Kontralateral fluorescens observeres kun ved applikasjon av DiI på mMOT, og ikke ved applikasjon på de andre buntene av traktus.

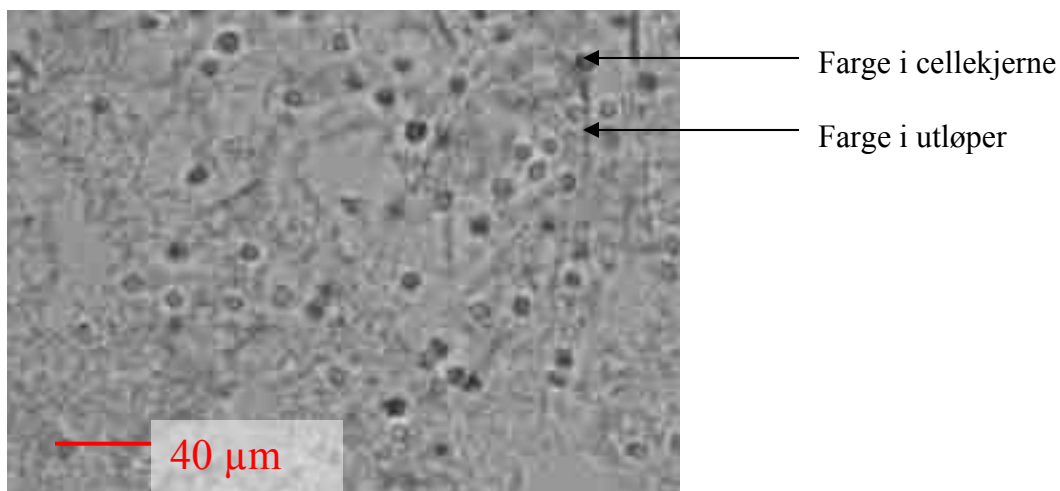
Projeksjoner til andre hjernesentre

Fibere fra mMOT projiserer via telencephalon til mer kaudale deler av hjernen. Projeksjonene er bilaterale, men tydeligere ipsilateralt enn kontralateralt. Områder markeres i optisk tektum, mest intenst i dorsomediale deler. Noen fibere fra mMOT krysser i habenula kommissur (Fig. 7H). Fibere fra LOT/IMOT innerverer de samme områdene som mMOT i optisk tektum, men projeksjoner fra LOT/IMOT i habenula kommissur ble ikke observert.

Immunohistokjemisk kartlegging av tertiære og høyere ordens nevroner

Nevroner i telencephalon som aktiveres ved eksponering for skinnekstrakt, ble påvist immunohistokjemisk. Transkripsjonsfaktoren c-Fos uttrykkes i nevroner med økt aktivitet, og kan brukes som en markør for nervøs aktivitet. Et polyklonalt antistoff beregnet for pattedyr, rettet mot konserverte domener i c-Fos proteinet, ble benyttet for å påvise c-Fos ekspresjon i aktiverte celler. Metoden har blitt brukt for å påvise nervøs aktivitet hos regnbueørret (Bosch *et al.*, 1995, 2001), men er ikke tidligere utprøvd hos karuss.

14 fisk ble brukt for å kartlegge tertiære og høyere ordens nevroner immunohistokjemisk. Lukteepitelet ble stimulert med skinnekstrakt i en time og fisken ble preparert for immunohistokjemi som beskrevet i metodekapitlet. En kontrollfisk ble stimulert med kunstig ferskvann. Som kontroll for spesifisiteten til det sekundære antistoffet ble noen snitt ikke inkubert med primært antistoff. I kontrollene observeres ikke immunoreaktive celler. I de immunoreaktive cellene er hovedsakelig cellekjernen farget. Noe farge observeres også i cytoplasma og utløpere (Fig. 9).



Figur 9: Immunoreaktive celler farget for c-Fos i telencephalon hos karuss

Immunoreaktive områder

Flere områder med immunoreaktive celler utmerker seg i telencephalon hos fisk stimulert med skinnestrakt. De immunoreaktive områdene er noe diffust avgrenset og er derfor kalt områder, og ikke felt som under den anatomiske kartleggingen. Områdenes utbredelse og størrelse varierte noe blant preparatene, men generelt er områdene på størrelse med feltene beskrevet i den anatomiske kartleggingen. Noen få immunoreaktive celler er også funnet spredt i flere andre deler av telencephalon. Snitt fra ti preparater ble sammenlignet. I teksten benevnes funnene gjort i x antall fisk som $n = x/10$. Bildene i figur 10 er eksempler hentet fra deler av de ulike immunoreaktive områdene. Bildene er tegnet som røde firkanter i de skjematiske tverrsnittene, men firkantene er forstørret i forhold til korrekt skala for å synliggjøre dem. Legg merke til at bildene til høyre markert med apostrof er kontroller fra tilsvarende områder.

Prekommissurale telencephalon

Det mediale området

Et medialt område markeres fra de mest rostrale delene av telencephalon og ca. 1000 μm kaudalt ($n = 10/10$). Området er bilateralt, og avgrenset fra sentrale områder der kun få celler markeres (Fig. 10A). Immunoreaktive celler finnes både dorsalt og ventralt i området (Fig. 10A og 10B). Av alle de immunoreaktive områdene er dette mediale området det største.

Det ventrolaterale området

Et ventrolateralt område markeres noe kaudalt for det mediale området ($n = 10/10$) (Fig. 10C). Området strekker seg ca. til kommissurnivå. Det ventrolaterale området er markert bilateralt. I ett preparat markeres en kjerne kontralateralt. Kjernen strekker seg fra 1560-1640 μm .

Kommissurnivå og postkommissurale telencephalon

Det sentrale området

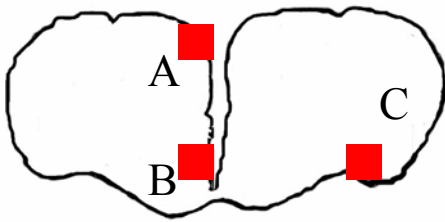
I det sentrale området markeres små immunoreaktive celler bilateralt ($n = 5/10$) (Fig.10D).

Det dorsolaterale området

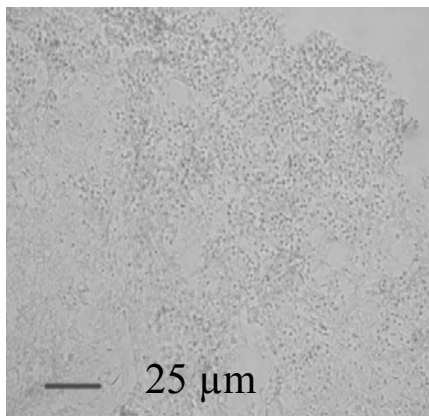
Dorsolaterale områder markeres fra kommissurnivå og videre postkommissuralt i telencephalon (n = 7/10). Et område rundt den dorsolaterale furen, Ypsiliformis, har spesielt mange immunoreaktive celler. Området markeres fra den dorsale overflaten og inn mot sentrum av hemisfæren (Fig.10E).

Ipsi- versus kontralateral hemisfære

Både det mediale og det ventrolaterale området prekommissuralt, er representert bilateralt. I det sentrale feltet postkommissuralt er immunoreaktive celler markert bilateralt. Det dorsolaterale området fra kommissurnivå og videre kaudalt, er aktivert bilateralt i de fleste preparatene (n = 5/10) men også bare ipsilateralt (n = 2/10).



Skjematisk tverrsnitt av telencephalon viser immunoreaktive områder prekommissuralt



A

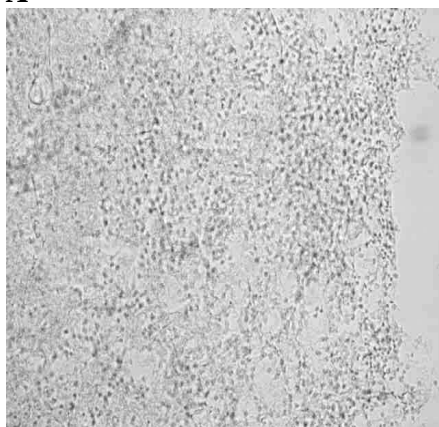


A'

A: Det dorsomediale området

Tverrsnitt prekommissuralt i Y = 1080 μm viser immunoreaktive celler dorsalt i det mediale området. Området er avgrenset fra mer sentrale områder der få celler er farget.

A': Kontroll



B



B'

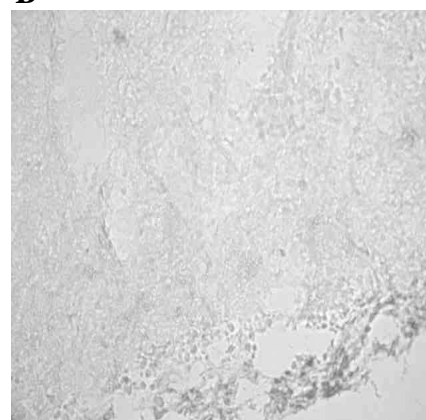
B: Det ventromediale området

Tverrsnitt prekommissuralt i Y = 1200 μm viser fargede celler ventralt i det mediale området

B': Kontroll



C

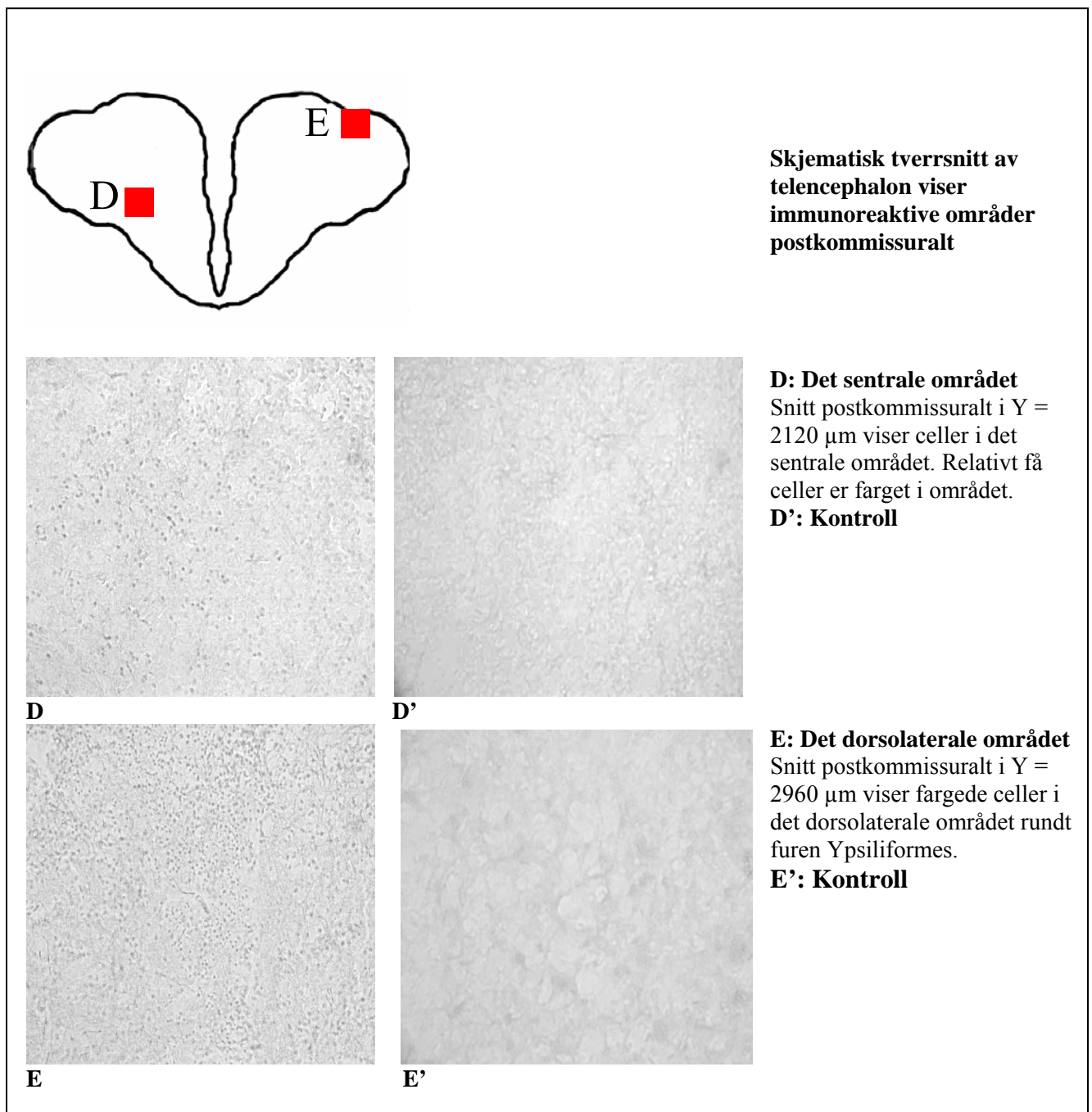


C'

C: Det ventrolaterale området

Tverrsnitt prekommissuralt i Y = 1560 μm viser fargede celler i det ventrolaterale området

C': Kontroll Noe farge av ependymale celler observeres i kontrollen.



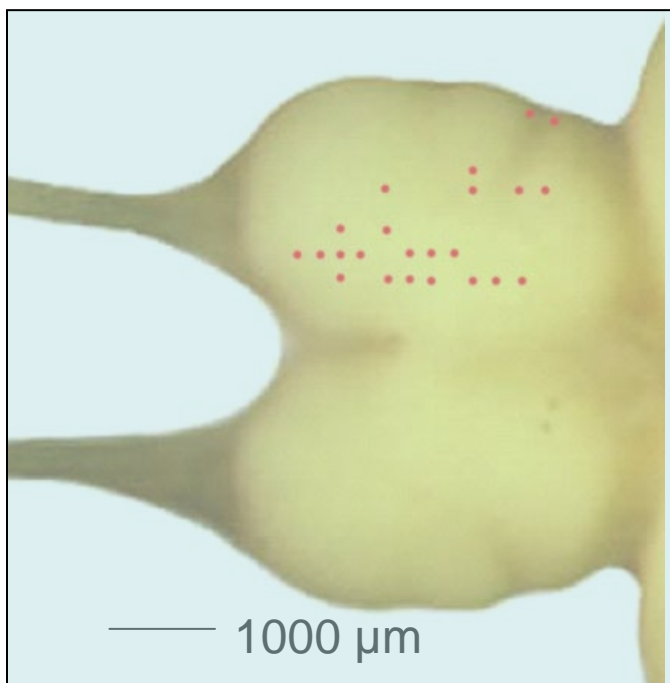
Figur 10 (A-E): Immunoreaktive celler i områder i telencephalon

Legg merke til at bilde A, B, C, D og E er illustrert som røde firkanter i de skjematiske tverrsnittene. For å synliggjøre firkantene er de forstørret i forhold til korrekt skala.

Firkantene er markert i et immunoreaktivt område der bildet ble hentet, og er kun markert på en side selv om feltet var bilateralt. Se hovedteksten for detaljer.

Elektrofysiologiske registreringer

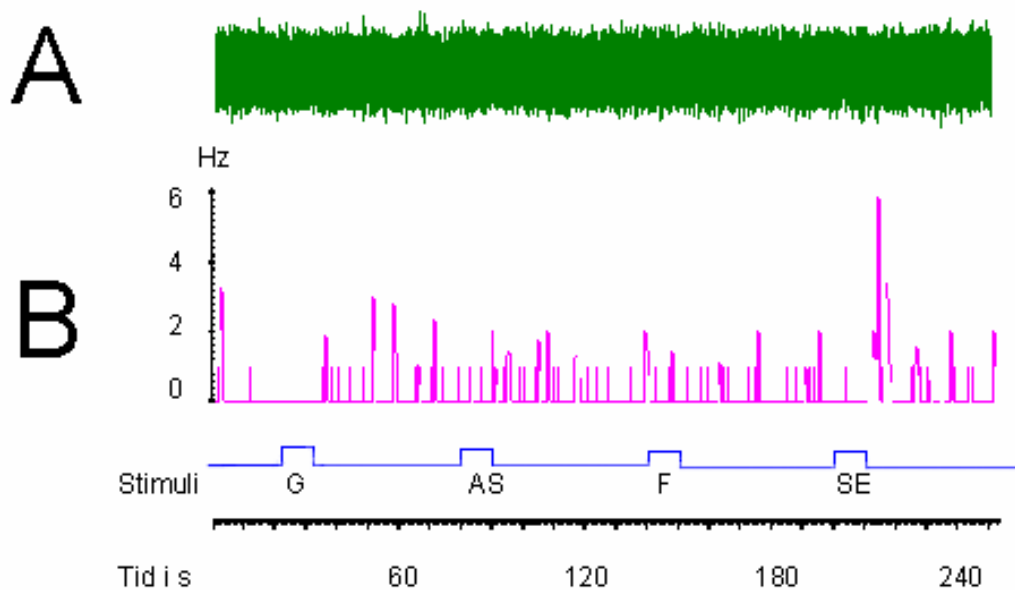
Nervøs aktivitet ble registrert ekstracellulært i telencephalon hos 13 fisk. Hensikten var å undersøke hvordan cellene reagerer på kjemisk stimuli med hensyn til firing og spesifisitet, og om noen områder aktiveres spesifikt av skinnestrakt. Registreringene ble hovedsakelig foretatt i områder som var kartlagt anatomisk og immunohistokjemisk, der vi ventet å finne celler som svarer på skinnestrakt. Totalt ble 252 registreringer gjort fra 202 ulike posisjoner i telencephalon. Flest områder medialt ble undersøkt, da det ventromediale feltet kun innerveres av mMOT av buntene i traktus, og mediale områder er immunoreaktive. Registreringene startet dorsalt i hver penetreringstrasè. Sett fra dorsalsiden, dvs. i x-y-planet, fordelte penetreringstrasèene seg som vist i Figur 11. Registreringene ble foretatt ved å føre elektroden vertikalt ned i telencephalon. Elektroden ble flyttet langsomt ned z-aksen og aktivitet ble registrert med ca. 100 μm avstand. Registreringene ble gjort i fiskens høyre hemisfære, ipsilateralt for stimuleringen.



Figur 11: Penetreringstrasèer i telencephalon

Telencephalon sett fra dorsalsiden. Posisjonene av de 23 penetreringsstedene i x-y-planet er markert.

I figur 12 vises nervøs aktivitet registrert i telencephalon når lukteepitelet ble stimulert med ulike stimuli. Om aktiviteten endres er vanskelig å observere ut fra originalregistreringen, fordi nervøs aktivitet fra mange celler med liknende aksjonspotensialer ble registrert samtidig. Originalregistreringen ble analysert i ettertid i programmet Spike2, som sorterer aksjonspotensialer etter størrelse og form. Amplituden på aksjonspotensialet avhenger både av avstanden mellom registreringselektroden og cellestrukturen, og av størrelsen på cellen. De sorterte aksjonspotensialene tilsvarer aktiviteten i en nervecelle. Fra hver registrering ble minst 4 enheter valgt ut og undersøkt i Spike. Til sammen ble aktiviteten av mer enn 1000 celler undersøkt.



Figur 12: Nervøs aktivitet registrert i telencephalon

I figur A er et eksempel fra en originalregistrering. I figur B vises samme registrering, men etter at enhetene er analysert i Spike. Etter å ha analysert originalregistreringen kan vi se at en celledyringsfrekvens øker etter injeksjon av SE. F = kjønnsferomon SE = skinnestrakt G = gallesalt AS = aminosyrer

Spontanaktiviteten til nerveceller i telencephalon varierte fra mindre enn 1 til 10 Hz. Den gjennomsnittlige spontanaktiviteten for en enkelt celle kunne variere uten noen opplagt ytre faktor. Spontanaktiviteten varierte ikke påtagelig ved de ulike registreringsposisjonene. Aksjonspotensialet til nervecellene var bifasisk og hadde en varighet på ca. 7,5 ms.

Effekt av kjemiske stimuli

I hver registreringsposisjon ble stimuliene skinnestrakt, aminosyrer, gallesalt og kjønnsferomon injisert etter tur, men i tilfeldig rekkefølge. Kjemiske stimuli ble injisert med en varighet på 10 s og separert med 50 s intervaller for at aktiviteten skulle komme tilbake til samme nivå som før stimuleringen. Om en nervecelle svarer på kjemisk stimuli ble vurdert ved å se på fyringsmønsteret. En frekvensendring ble tolket som svar om det følgende kriteriet ble oppfylt:

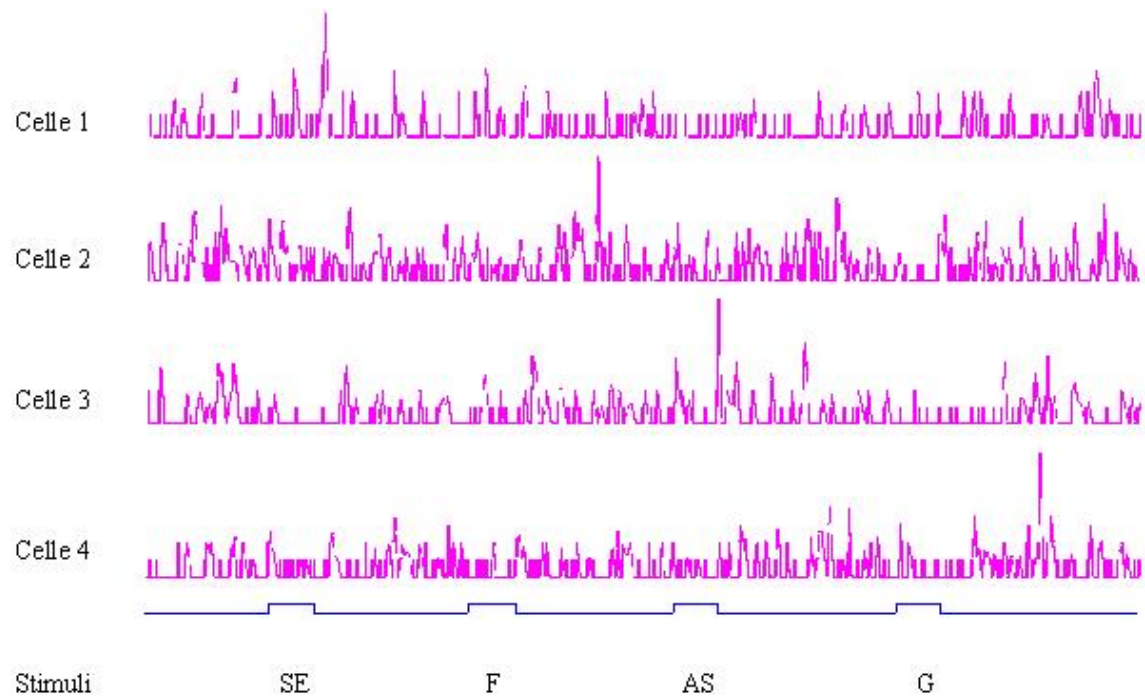
- Varighet på minimum 5 s
- Frekvensendring på minimum 100 %
- Respons 0-15 s etter at stimulus når lukteepitelet

Ut fra dette kriteriet svarte celler på en eller flere typer kjemisk stimuli med økt aktivitet i 67 % av registreringsposisjonene. Totalt ble 189 celler eksitert. 75 av cellene ble eksitert av skinnestrakt, 62 av kjønnsferomon, 58 av aminosyrer og 35 av gallesalt. Ca. 20 celler så ut til å svare med inhibisjon. Frekvensendringen varierte imidlertid mye ved inhibisjon i forhold til ved eksitasjon, og avvek ofte fra kriteriet som definerer et svar. Inhibisjon ble derfor ikke inkludert som svar i videre analyse av resultatene. I 33 % av registreringsposisjonene ble det ikke observert respons på noen av de fire kjemiske stimuliene. Celler ble eksitert av kjemiske stimuli i både ventrale og dorsale deler av telencephalon, med en rate på 2,4:1,0.

Spesifisitet

154 (81 %) av de eksiterte cellene svarte kun på en ett luktstimulus. Alle de fire stimuliene eksiterte spesifikt, slik at cellene kun ble eksitert av enten skinnestrakt, aminosyrer, gallesalt eller kjønnsferomon (Figur 13). 35 celler ble eksitert av flere luktstimuli. Tabell 1 viser antall celler som ble eksitert av ulike stimuli. 29 celler (15 %)

ble eksitert av 2 stimuli, mens 6 celler (3 %) ble eksitert av 3 stimuli. Ingen celler ble eksitert av alle fire stimuli.



Figur 13: Celler som svarte spesifikt på hver av de fire stimuli

Celle 1 svarte på SE = skinnekstrakt, celle 2 på F = kjønnsferomon, celle 3 på AS = aminosyrer og celle 4 på G = gallesalt.

Tabell 1: Celler som ble eksitert av ulike stimuli

SE = skinnestrakt, F = kjønnsferomon, AS = aminosyrer og G = gallesalt. Stimulus som eksiterte spesifikt står øverst i tabellen. Av de cellene som ble eksitert av to ulike lukkestimuli er kombinasjonen skinnestrakt og aminosyrer vanligst.

Stimuli	Antall celler
SE	50
F	42
AS	41
G	21
AS+SE	11
F+G	6
F+SE	5
AS+F	3
G+SE	3
AS+G	1
F+G+SE	4
AS+F+SE	2
AS+G+SE	0
AS+F+G	0
AS+F+G+SE	0
Sum	189

Områdenes spesifisitet for alarmstimuli

Registreringer ble hovedsakelig foretatt i områder som var kartlagt anatomisk eller immunohistokjemisk for å undersøke områdenes spesifisitet for alarmstimuli. De kartlagte områdene var det mediale området og det ventrolaterale området prekommissuralt, og det sentrale området og det dorsolaterale området postkommissuralt. Ingen av områdene skilte seg ut som spesifikke. To områder ble grundigere undersøkt vha kji kvadrat-test. Den anatomiske kartleggingen viste at både det ventromediale feltet og det sentrale feltet var klare avgrensede felt. Begge feltene hadde også immunoreaktive celler markert. De spesifikke cellene som ble eksitert innenfor hvert av de to feltene var gjenstand for analyse. Cellenes respons på de fire ulike stimuliene ble analysert. Det ventromediale feltet skiller seg fra det sentrale feltet ved at det kun er innervert av bunten mMOT, som formidler alarmreaksjon, mens det sentrale feltet innerveres av alle buntene

i traktus. Den anatomiske kartleggingen tyder på at det ventromediale feltet er spesielt viktig i prosessering av skinnestrakt. Det er interessant å undersøke om de to feltene er signifikant forskjellig, da både mediale deler av luktelappen og traktus formidler alarmstimuli. Først ble det undersøkt om cellene i de to feltene responderer forskjellig på de fire stimuliene generelt, og på skinnestrakt spesielt. Deretter ble hvert felt undersøkt hver for seg for å se om cellene responderte forskjellig på de fire stimuliene innen hvert felt. Cellenes respons på de fire ulike stimuliene i de to feltene er vist i tabell 2.

Tabell 2: Antall celler som aktiveres av ulike stimuli i det ventromediale feltet og i det sentrale feltet

SE = skinnestrakt F = kjønnsferomon AS = aminosyrer og G = gallesalt. Tallene som står i parentes er den forventede verdien i test 1 og 2. (Den forventede verdien i test 3 er 5,75 for vmf og 5 for sf.).

Stimuli	Det ventromediale feltet	Det sentrale feltet	Sum
AS	9 (8,6)	7 (7,4)	16
F	4 (5,3)	6 (4,7)	10
G	1 (2,1)	3 (1,9)	4
SE	9 (7,0)	4 (6,0)	13
Sum	23	20	43

Test 1

Det ventromediale feltet vmf, og det sentrale feltet sf, sammenlignes:

H_0 : Sannsynligheten for at en celle i hver av de to feltene aktiveres av en gitt stimulus er like stor i begge felt dvs. $p_{AS}^{vmf} = p_{AS}^{sf}$ og samtidig $p_F^{vmf} = p_F^{sf}$ og samtidig $p_G^{vmf} = p_G^{sf}$ og samtidig $p_{SE}^{vmf} = p_{SE}^{sf}$

Resultat test 1:

$p = 0,34 \Rightarrow H_0$ forkastes ikke, dvs. man kan ikke utelukke at sannsynligheten for at en celle i hver av de to feltene aktiveres av en gitt stimulus er like stor i begge felt.

Test 2

Det ventromediale feltet vmf, og det sentrale feltet sf, sammenlignes:

H_0 : Sannsynligheten for at en celle aktiveres av skinnekstrakt er like stor i begge felt dvs.

$$p_{SE}^{vmf} = p_{SE}^{sf}$$

Resultat test 2:

$p = 0,17 \Rightarrow H_0$ forkastes ikke, dvs. man kan ikke utelukke at sannsynligheten for at en celle aktiveres av skinnekstrakt er like stor i begge felt.

Test 3

Testes for det ventromediale feltet vmf og det sentrale feltet sf, uten å sammenligne feltene.

H_0 : Sannsynligheten for at en celle aktiveres av hvilken som helst av de fire stimuli er like stor dvs. H_0^{vmf} : $p_{AS}^{vmf} = p_F^{vmf} = p_G^{vmf} = p_{SE}^{vmf}$ og/eller H_0^{sf} : $p_{AS}^{sf} = p_F^{sf} = p_G^{sf} = p_{SE}^{sf}$

Resultat test 3:

I det ventromediale feltet: $p = 0,04 \Rightarrow H_0$ forkastes, dvs. at sannsynligheten for at en celle aktiveres av hvilken som helst av de fire stimuli er ikke like stor. I det sentrale feltet: $p = 0,57 \Rightarrow H_0$ forkastes ikke, dvs. man kan ikke utelukke at sannsynligheten for at en celle aktiveres av hvilken som helst av de fire stimuli er like stor.

Områder i telencephalon som kan være involvert i alarmreaksjonen

Tre ulike metoder ble benyttet for å undersøke hvordan alarmstimuli prosesseres i telencephalon. Sekundærnevronenes projeksjoner ble sporet anatomisk med nervefargen DiI, og høyere ordens nevroner ble studert funksjonelt vha immunohistokjemi og ved elektrofysiologiske registreringer. Her gis en kort oppsummering av områdene som ble kartlagt i de ulike forsøkene. Tre områder ble påvist ved bruk av alle metodene: det ventromediale og det ventrolaterale området prekommissuralt og det sentrale området postkommissuralt. I tillegg ble to områder kartlagt immunohistokjemisk og elektrofysiologisk: det dorsomediale området prekommissuralt, og det dorsolaterale området postkommissuralt.

Prekommissurale telencephalon

Det ventromediale området

Av buntene i traktus projiserer kun mMOT til det ventromediale området. Området har mange immunoreaktive celler, og hvert av de fire stimuliene eksiterte celler i området.

Det dorsomediale området

Ingen av buntene projiserer dorsomedialt, men området har mange immunoreaktive celler. Hvert av de fire stimuliene eksiterte celler i området.

Det ventrolaterale området

Det ventrolaterale området innerveres mMOT, men også av de andre buntene av traktus. Immunoreaktive celler er også markert, men cellene er færre og mer spredt enn i det mediale feltet. Hvert av de fire stimuliene eksiterte celler i området.

Postkommissuralt

Det sentrale området

Det sentrale området innerveres av mMOT, men også av de andre buntene i traktus. Immunoreaktive celler er markert. Hvert av de fire stimuliene eksiterte celler i området.

Det dorsolaterale området

Ingen av buntene projiserer til området, men immunoreaktive celler er markert. Hvert av de fire stimuliene eksiterte celler i området.

Diskusjon

Fiskens luktesans har vært en sentral modell for mange studier av den nervøse behandlingen av luktstimuli som resulterer i atferdsreaksjoner (Laberge & Hara, 2001; Døving *et al.*, 2005; Hamdani & Døving, 2005; Hansen *et al.*, 2005; Kotrschal, 2000). I løpet av de siste 20 årene har nye molekylærbiologiske metoder ført til en dypere forståelse av sansesystemers funksjon hos fisk. Imidlertid har studiene fokusert mest på perifer prosessering av luktinformasjon (Ngai *et al.*, 1993; Hansen *et al.*, 2005). Dette studiet beskriver hvordan alarmstimuli prosesseres i et høyere hjernesenter, telencephalon. Den anatomiske kartleggingen viser at bunten mMOT, som formidler alarmreaksjonen, projiserer til bestemte felt i telencephalon. Sporing av projeksjonene til de andre buntene viser at projeksjonsområdene i stor grad overlapper, men at unike felt forekommer. Immunohistokjemisk ble nevroner som aktiveres av skinnekstrakt kartlagt i fire områder i telencephalon. Ekstracellulære registreringer viser at nevroner i telencephalon reagerte på kjemisk stimuli med en relativt kortvarig og liten frekvensøkning. De fleste cellene er spesifikke og ble aktivert av enten gallesalt, kjønnsferomon, aminosyrer eller skinnekstrakt. Hvert av de fire stimuliene eksiterte celler i områdene som var kartlagt anatomisk og/eller immunohistokjemisk.

Argumenter for en spatial fordeling av luktprosessering ble første gang presentert av Døving og Selset (1980). Forskjellige typer atferd ble utløst ved stimulering de ulike buntene av traktus hos torsk. Flere studier har siden undersøkt den funksjonelle inndelingen av lukteorganet hos fisk. Studiene har vist at hver bunt av traktus formidler en type atferd (Stacey & Kyle, 1983; Demski & Dulka, 1984; Hamdani *et al.*, 2000; Hamdani *et al.*, 2001). Dette betyr at sekundærnevroner som utgjør en bunt av traktus mottar spesifikk informasjon fra de primære sansecellene i lukteepitelet.

En kombinasjon av anatomiske, fysiologiske og etologiske forsøk har vist at alarmreaksjon hos karuss formidles av spesifikke deler av lukteorganet: Alarmreaksjon hos karuss formidles av cilierte sanseceller i lukteepitelet (Hamdani *et al.* & Døving, 2002).

Videre sendes informasjonen til et mediant område i luktelappen (Hamdani *et al.* & Doving, 2003) og via en egen bunt av traktus, mMOT, til telencephalon (Hamdani *et al.*, 2000). Karuss er den fiskearten hvor komponentene involvert i alarmreaksjonen er best definert. Dette studiet av prosessering av alarmstimuli i telencephalon er en fortsettelse av en studieserie som kartlegger de forskjellige nevronale komponentene i alarmreaksjon hos karuss.

Kongruens med tidligere funn

Anatomisk kartlegging av buntenes projeksjoner

Nervefargen Dil ble applisert på den buntene av traktus som formidler alarmreaksjonen, mMOT, for å undersøke hvordan fibre projiserer i telencephalon. Områder som innerveres av mMOT er sannsynligvis involvert i prosessering av alarmstimuli. Projeksjonene fra mMOT ble sammenlignet med projeksjoner fra de andre buntene av traktus for å undersøke om buntene projiserer til unike eller overlappende områder. Våre funn viser at buntene projiserer til avgrensede felt i telencephalon. Feltene omfatter et ventromedialt og et ventrolateralt felt prekommissuralt og et sentralt felt postkommissuralt. Tilsvarende felt er beskrevet i andre arter som torsk (Doving & Gemne, 1966; Rooney *et al.*, 1992), maller (Finger, 1975), gullfisk (Ichikawa, 1975; von Bartheld *et al.*, 1984; Levine & Dethier, 1985), elektrisk ål (Sas *et al.*, 1993), bikir (Braford & Northcutt, 1974) og ørret (Matz, 1995). Felles for både karuss og andre arter er at store områder i dorsale telencephalon mottar få projeksjoner fra buntene. Tidlige anatomiske studier skiller imidlertid i varierende grad mellom de ulike buntene av traktus. Det kan skyldes at man ikke har visst at de ulike buntene i traktus formidler forskjellige atferdsmønstre.

Projeksjoner for de ulike buntene i telencephalon

Hos karuss projiserer buntene i traktus til unike og overlappende felt i telencephalon, både ipsi- og kontralateralt. Fibre fra mMOT projiserer til det ventromediale feltet

prekommissuralt. Dette feltet er ikke innervert av LOT/IMOT. Buntene LOT/IMOT projiserer også til et unikt område prekommissuralt, det basolaterale feltet, som sammenfaller med deler av det ventrolaterale feltet beskrevet i andre arter. Projesjoner fra mMOT og de andre buntene overlapper i det ventrolaterale feltet prekommissuralt og i det sentrale feltet postkommissuralt.

Prekommissurale telencephalon

Hos karuss projiserer mMOT til et unikt felt ventromedialt, mens LOT/IMOT projiserer mer basolateralt prekommissuralt. Projesjoner fra de ulike buntene overlapper i det ventrolaterale feltet. Hos gullfisk, som står svært nær karuss, er det gjort flere anatomiske studier av luktprojeksjoner: Ichikawa (Ichikawa, 1975) skiller ikke mellom mMOT og IMOT, men beskriver terminale felt for MOT medialt og for LOT lateralt i prekommissurale telencephalon. von Bartheld (1984) skiller mellom mMOT og IMOT, men hevder at IMOT hovedsakelig består av sentrifugalfibere. Metoden som ble brukt i dette studiet, HRP farging, er ikke velegnet for å farge små, myeliniserte fibere som IMOT består av (Levine & Dethier, 1985). Kun større sekundærnevroners projeksjoner er derfor blitt sporet. Prekommissuralt beskriver von Bartheld terminale felt for mMOT medialt og for LOT lateralt. Hos torsk er prekommissurale terminale felt beskrevet for mMOT medialt og for IMOT og LOT mer lateralt. Projesjoner fra alle buntene overlapper i deler av det ventrolaterale feltet, som hos karuss (Rooney *et al.*, 1992).

Kommissurnivå

Fibere fra alle buntene av traktus krysser til den kontralaterale hemisfæren i fremre kommissur hos karuss. Fibrene som projiserer kontralateralt, innerverer felt som tilsvarer de ipsilaterale. Buntene mMOT og LOT/IMOT krysser i overlappende deler av Goldsteins kommissur og fremre kommissur. Imidlertid er Goldsteins kommissur og de kontralaterale feltene mer intenst markert etter DiI applikasjon på mMOT enn på IMOT/LOT. Forskjellen i intensitet tyder på at flere fibere fra mMOT krysser til den kontralaterale hemisfæren. Studier hos andre arter viser også at fibere fra alle buntene av traktus krysser til den kontralaterale hemisfæren i fremre kommissur (Finger, 1975;

Ichikawa, 1975; Oka, 1980; von Bartheld *et al.*, 1984; Levine & Dethier, 1985; Rooney *et al.*, 1992; Matz, 1995). Flere studier har vist at LOT krysser i mindre grad enn MOT (von Bartheld *et al.*, 1984; Levine & Dethier, 1985). Funn som at LOT krysser kaudalt (von Bartheld *et al.*, 1984) og at IMOT krysser mer dorsalt enn mMOT i fremre kommissur (Levine & Dethier, 1985), bekreftes ikke i dette studiet hos karuss.

Postkommissurale telencephalon

Postkommissuralt projiserer fibre fra alle buntene i traktus til det sentrale feltet hos karuss. Feltet innerveres av en stor del av projeksjonene. Tilsvarende felt er beskrevet i flere arter: gullfisk (Ichikawa, 1975; von Bartheld *et al.*, 1984; Levine & Dethier, 1985), torsk (Rooney *et al.*, 1992) og ørret (Matz, 1995). Hoveddelen av fibre fra traktus terminerer i det sentrale feltet hos torsk (Rooney *et al.*, 1992).

Ekstra-telencephaliske projeksjoner

Fluorescens i den kontralaterale traktus, en interbulbær forbindelse

Ved DiI-applikasjon på mMOT på den ene siden observeres fluorescens i kontralaterale mMOT. Dette tyder på en direkte forbindelse mellom luktelappene. Fluorescens i kontralaterale traktus observeres ikke ved DiI-applikasjon på de andre buntene. Hos karuss krysser fibre fra alle buntene kontralateralt via Goldsteins kommissur, men fluorescensen er spesielt sterk når DiI er applisert på mMOT. Tidligere studier hos bl.a. gullfisk (von Bartheld *et al.*, 1984), maller (Finger, 1975) og ørret (Matz, 1995) har vist at fibre fra mMOT som krysser til den kontralaterale hemisfæren via Goldsteins kommissur, projiserer rostralt og via kontralaterale mMOT til luktelappen. Våre funn tyder på at en interbulbær forbindelse også er til stede hos karuss. Forbindelsen går via mMOT, siden kontralaterale mMOT bare fluorescerer ved selektiv applikasjon på denne bunten.

Projeksjoner til andre hjernesentre

Hos karuss projiserer fibre fra alle buntene av traktus til optisk tektum og hypotalamus. Projeksjoner til optisk tektum, den preoptiske kjernen og hypotalamus er beskrevet i flere tidligere studier (von Bartheld *et al.*, 1984; Rooney *et al.*, 1992; Matz, 1995)

Fibre fra mMOT krysser i habenula kommissur hos karuss. Ingen fibre fra de andre buntene krysser i denne kommissuren. Tidligere studier har gjort varierende observasjoner av projeksjoner til habenula. Hos gullfisk (von Bartheld *et al.*, 1984) og maller (Finger, 1975) er det kun funnet fibre fra LOT som krysser i habenula kommissur. Dette står i kontrast til et annet studie hos gullfisk som hevder at fibre fra MOT, men ingen fra LOT projiserer til habenula (Levine & Dethier, 1985). Hos ørret beskrives kryssende fibre fra LOT, men funnene er usikre (Matz, 1995). Hos torsk er fibre som krysser prinsipielt, men ikke utelukkende, fra LOT (Rooney *et al.*, 1992).

Sentrifugalfibre

Nervefargen DiI kan diffundere retrograd etter applikasjon på traktus. Dermed vil sentrifugalfibre til luktelappen, med cellekropp i telencephalon eller høyere hjernesentere, kunne markeres. Flere studier har påvist cellekropper i samme områder som terminale felt (Oka, 1980; Rooney *et al.*, 1992). Sannsynligvis finnes cellekropper i disse områdene også hos karuss, men ble ikke observert i våre preparater. Årsaken kan være at DiI fortynnes ved diffusjon i membranen. Nervefargen kan også diffundere i horisontalplanet etter snitting. I tillegg kan cellelegemer kamufleres av andre fibre om de overlapper og være vanskelige å oppdage pga. tykke snitt (100 µm).

Oppsummering av funn i karuss

Fibre fra mMOT og LOT/IMOT projiserer til unike felt prekommissuralt hhv. det ventromediale feltet og det basolaterale feltet. Projeksjoner fra alle buntene overlapper i det ventrolaterale feltet prekommissuralt og i det sentrale feltet postkommissuralt. Buntene mMOT og LOT/IMOT krysser i overlappende deler av Goldsteins kommissur og fremre kommissur.

Immunohistokjemisk kartlegging av tertiære og høyere ordens nevroner

Tertiære og høyere ordens nevroner i telencephalon som aktiveres ved stimulering av lukteepitelet med skinnestrakt ble påvist immunohistokjemisk vha c-Fos. Metoden er ikke tidligere utprøvd hos karuss. Dette studiet viser at c-Fos ekspresjon er velegnet som markør for nervøs aktivitet hos karuss.

Subcellulær farging

Immunoreaktive celler hos karuss farges både i cellekjernen og i cytoplasma. Dette er forskjellig fra subcellulær farging ved c-Fos immunohistokjemi hos både ørret og pattedyr. Hos pattedyr farges immunoreaktive celler hovedsakelig i cellekjernen. Forekomst av c-Fos i cytoplasma er transient, fordi c-Fos raskt transporteres til kjernen (Morgan & Curran, 1991). Hos regnbueørret farges immunoreaktive celler kun i cytoplasma. Det kan være flere årsaker til at c-Fos er lokalisert i kjernen hos pattedyr og i cytoplasma hos regnbueørret. For det første har fisk lavere metabolisme som kan føre til at c-Fos transporteres langsommere inn i cellekjernen. For det andre er aminosyresekvensen utenfor de konserverte domenene i c-Fos forskjellig. Ulik proteinstruktur resulterer i forskjellige egenskaper og påvirke den subcellulære lokaliseringen av proteinet. Det er foreslått at lokaliseringen av fargen kun i cytoplasma hos regnbueørret skyldes lavere metabolisme og/eller ulik proteinstruktur (Bosch *et al.*, 1995). Farge i både kjernen og cytoplasma hos karuss viser at lavere metabolisme ikke alene forklarer den subcellulære fargingsforskjellen mellom fisk og pattedyr. Proteinstruktur kan være en årsak. Mellom ulike vertebrater er aminosyresekvensen i de ikke-konserverte domenene i c-Fos proteinet bare 40-56% identisk. Mellom ulike fiskearter som regnbueørret, koffortfisk og karpe er kun 47-56% av aminosyrene identiske. (Matsuoka *et al.*, 1998). Ulik struktur kan gjøre at proteinet får ulike egenskaper i fisk og pattedyr. Med tanke på fiskens evolusjonære utvikling kan c-Fos strukturen godt tenkes å være forskjellig også hos ulike arter av fisk.

Tertiære og høyere ordens områder

Immunoreaktive celler ble observert i fire områder i telencephalon etter stimulering av lukteepitelet med skinnestrakt. I tillegg til de tre feltene som ble kartlagt anatomisk ble immunoreaktive celler markert i det dorsomediale området prekommissuralt og i det dorsolaterale området postkommissuralt. Celler i områdene som kun er kartlagt immunohistokjemisk er sannsynligvis ikke tertiære, men av enda høyere orden, da de ikke er direkte innervert av sekundærnevronene fra traktus. De er trolig involvert i prosessering av alarmstimuli på et høyere nivå. Om de immunoreaktive cellene i de to områdene er tertiærnevroner kan vanskeligheter med å oppdage fluorescens forklare hvorfor vi ikke har observert sekundærnevroner som innerverer cellene. Vanskeligheter med å oppdage fluorescens kan skyldes tykke snitt, eller tynne aksoner. Andre anatomiske studier av sekundære luktprojeksjoner har imidlertid heller ikke beskrevet projeksjoner i disse områdene (Finger, 1975; Ichikawa, 1975; von Bartheld *et al.*, 1984; Levine & Dethier, 1985; Rooney *et al.*, 1992; Sas *et al.*, 1993; Matz, 1995). En nærliggende forklaring er derfor at de immunoreaktive cellene i det dorsomediale området prekommissuralt og i det dorsolaterale området postkommissuralt er involvert i alarmprosessering på et høyere nivå. Dorsale områder er antakeligvis viktigere i prosessering av luktstimuli enn anatomiske studier av sekundære luktprojeksjoner har antydnet. Områdene har sannsynligvis også en funksjon i prosessering av annen type sansestimuli. Fibere fra andre deler av hjernen som bl.a. optiske tektum, trigeminuskjerner, ryggmargen og cerebellum, projiserer til store deler av telencephalon, men i større grad til dorsale områder. Fibrene formidler lyd-, sidelinje-, somatosensorisk- og visuelle stimuli (Northcutt & Davis, 1983).

Elektrofysiologiske registreringer: effekt av kjemiske stimuli på cellenes fyringsmønster

Nervøs aktivitet ble registrert ekstracellulært i telencephalon mens lukteepitelet ble stimulert med skinnekstrakt, aminosyrer, kjønnsferomon og gallesalt, for å undersøke hvordan nevroner i telencephalon svarer på kjemiske stimuli med hensyn på firing og spesifisitet.

Fyringsmønsteret til nevroner i telencephalon ved eksponering til ulike typer luktstimuli er ikke tidligere studert hos fisk. Et sammenligningsgrunnlag for hvordan nevronene i telencephalon svarer på luktstimuli finnes derfor ikke. Et foreløpig studie (abstract) som beskriver luktprosessering hos maller har nylig blitt publisert, men cellenes fyringsmønster ble ikke beskrevet (Nikonov & Caprio, 2005). I vårt studie ble kriteriet for å tolke frekvensendringer som svar valgt etter analyse av registreringene, og syntes å gå igjen i flere registreringer. Nevronene i telencephalon svarte på kjemisk stimuli 0-15 s etter at stimuli nådde lukteepitelet, med en frekvensøkning på ca. 100 % som varte i minimum 5 s. Cellene hadde høy spontanaktivitet som varierte uten noen opplagt ytre faktor. I noen registreringer ble stimuli injisert to ganger. Celler som svarte med en liknende frekvensøkning når stimulus ble injisert for andre gang, verifiserte at frekvensøkningen faktisk var svar på kjemisk stimuli. Det kan likevel ikke utelukkes at frekvensendringer som har blitt tolket som svar kan skyldes tilfeldige variasjoner i spontanaktivitet.

Cellene i telencephalon svarte på kjemisk stimuli med en kortvarig og relativt liten frekvensendring sammenlignet med sekundærnevroner i luktelappen (Hamdani el & Doving, 2003). Sentrale mekanismer i telencephalon kan tenkes å ha virket inn og modulert cellenes aktivitet, og gjort at cellene svarte annerledes på luktstimuli enn sekundærnevronene i luktelappen.

Prosessering av luktstimuli i telencephalon

Den anatomiske kartleggingen viste at de ulike buntene av traktus i stor grad overlapper i telencephalon, og elektrofysiologiske registreringer viste at større områder aktiveres av alle fire stimuli. Resultatene fra våre eksperimenter tyder på at luktstimuli prosesseres i mange områder og eventuelt på en annen måte i telencephalon enn i luktelappen. En kjemotopisk inndeling av luktelappen hos fisk, der spesifikke deler aktiveres av bestemte luktstimuli er beskrevet i flere studier (Thommesen, 1978; Doving *et al.*, 1980; Friedrich & Korsching, 1997). Et foreløpig studie (abstract) som beskriver luktprosessering i telencephalon hos maller hevder at kjemotopien i luktelappen er reflektert i telencephalon (Nikonov & Caprio, 2005). Forfatterne sier at ekstracellulære registreringene viser at gallesalt, som er et feromon, prosesseres medialt og aminosyrer lateralt. Våre elektrofysiologiske registreringer hos karuss bekrefter ikke dette utsagnet.

Den anatomiske kartleggingen av buntenes projeksjoner hos karuss tyder på at det ventromediale feltet er spesielt viktig i prosessering av skinnekstrakt, fordi feltet er unikt ved at det kun er innervert av bunten mMOT, som formidler alarmreaksjon. De elektrofysiologiske registreringer fra celler i telencephalon viser imidlertid at områder som ble kartlagt anatomisk og/eller immunohistokjemisk ikke var spesifikke for skinnekstrakt. Spesifikke områder i telencephalon kan finnes, men områdene er trolig mindre eller i andre områder enn der de ekstracellulære registreringene ble gjort. For å undersøke om det ventromediale feltet aktiveres ulikt i forhold til andre felt ble feltet sammenlignet med det sentrale feltet som er innervert av alle buntene i traktus. Det ble testet om cellene i de to feltene responderte signifikant forskjellig på de fire stimuli generelt, og på skinnekstrakt spesielt. De to feltene var ikke signifikant forskjellig. Resultatet tyder på at begge feltene trolig er like viktige i prosessering av de ulike luktstimuliene.

Det ventromediale og det sentrale feltet ble videre testet statistisk hver for seg for å se om cellene responderte forskjellig på de fire stimuliene innen hvert felt. Testen gav en signifikant forskjell i respons for de fire stimuliene i det ventromediale feltet. Noe overraskende aktiverte både skinnekstrakt og aminosyrer like mange celler i det

ventromediale feltet. De elektrofysiologiske registreringene hos karuss tyder dermed på at lukt prosesseres annerledes i telencephalon enn i luktelappen. Buntenes projeksjoner indikerer også at informasjon som prosesseres i atskilte områder av luktelappen divergerer til flere områder i telencephalon, som både er unike og overlapper. Studier hos pattedyr har vist at luktstimuli som aktiverer spatiaalt atskilte deler i luktelappen divergerer til spesifikke, men delvis overlappende områder i cortex (Zou *et al.*, 2001). Studier av telencephalon hos fisk og cortex hos pattedyr kan imidlertid vanskelig sammenlignes rent anatomisk, da den embryonale utviklingen er ulik, og homologien til ulike strukturer er omdiskutert (Northcutt & Davis, 1983). Prosesseringsmekanismene kan likevel tenkes å være sammenlignbare. En konsekvens av at buntene fra traktus divergerer er at de innerverer flere områder i telencephalon. Fra forskjellige områder av telencephalon hos fisk projiserer ulike fibere til andre deler av hjernen (Northcutt & Davis, 1983). Informasjonen fra et luktstimulus kan derfor overføres til flere regioner. Dette resulterer i at luktstimuli kan videresendes til mange områder med ulik funksjon. I dette studiet ble flere områder i telencephalon som er involvert i alarmreaksjonen kartlagt. Fiberprojeksjoner fra mMOT til andre deler av hjernen ble også observert, og sannsynliggjør at flere hjerneområder er involvert i alarmreaksjonen.

Forslag til videre studier

I dette studiet er flere områder i telencephalon som kan være involvert i prosessering av luktstimuli kartlagt. Hvert av de fire stimuliene eksiterte celler i alle de kartlagte områdene, slik at ingen av områdene er spesifikke for alarmstimuli. Innen hvert av områdene kan det likevel tenkes å være spesifikke kjerner, men for å undersøke dette kreves tettere registreringer. Om mindre områder er spesifikke for skinnestrakt kan være et tema for videre studier. Et annet interessant spørsmål er hvilke områder som er involvert i prosessering av andre typer luktstimuli. Det kan det være nyttig å gjøre immunohistokjemiske forsøk med flere luktstimuli. Aktiverte områder kan påvises vha av c-Fos, som synes å fungere godt som en nervøs aktivitetsmarkør i karuss. I denne oppgaven har vi påvist fibere fra mMOT som projiserer via telencephalon til andre hjernesentre som bl.a. habenula. Andre hjernesentre kan derfor være viktig i prosessering av alarmstimuli, men disse funnene krever nøyere ettersyn.

Konklusjon

I denne oppgaven ble områder i telencephalon hos fisk som kan være involvert i prosessering av alarmstimuli forsøkt kartlagt vha av tre metoder: buntenes projeksjoner ble kartlagt anatomisk med nervefargen DiI. Tertiære og høyere ordens nevroner ble kartlagt immunohistokjemisk vha farging for proteinet c-Fos som kan brukes som en markør for nervøs aktivitet. Ekstracellulære registreringer ble foretatt mens lukteepitelet ble stimulert med skinnestrakt, aminosyrer, gallesalt og kjønnsferomon.

- Områder som kan være involvert i alarmreaksjonen er det mediale og det ventrolaterale området prekommissuralt, og det dorsolaterale og det sentrale området postkommissuralt.
- Kun mMOT projiserer til det ventromediale feltet prekommissuralt, mens LOT/IMOT projiserer til det basolaterale feltet prekommissuralt. Alle buntene i traktus innerverer det ventrolaterale feltet prekommissuralt og det sentrale feltet postkommissuralt.
- Nevroner i telencephalon svarer på kjemisk stimuli 0-15 s etter at stimuli når lukteepitelet, med en frekvensøkning på ca. 100 % som varer i minimum 5 s. Ut fra kriteriet som definerer svar, er de fleste cellene spesifikke og svarer kun på én type stimulus. Noen celler svarer på to eller tre stimuli, men ingen svarer på fire stimuli.
- Ingen av områdene som ble kartlagt anatomisk eller immunohistokjemisk aktiveres spesifikt av alarmstimuli.

Referanser

- ARIENS KAPPERS CU. (1906). The structure of the teleostean and selachian brain. *J Comp Neurol* **16**, 1-112.
- BOSCH TJ, MASLAM S & ROBERTS BL. (1995). A polyclonal antibody against mammalian FOS can be used as a cytoplasmic neuronal activity marker in a teleost fish. *J Neurosci Methods* **58**, 173-179.
- BOSCH TJ, MASLAM S & ROBERTS BL. (2001). Fos-like immunohistochemical identification of neurons active during the startle response of the rainbow trout. *J Comp Neurol* **439**, 306-314.
- BRAFORD MR, JR. & NORTHCUTT RG. (1974). Olfactory bulb projections in the bichir, *Polypterus*. *J Comp Neurol* **156**, 165-178.
- DEMSKI LS & DULKA JG. (1984). Functional-anatomical studies on sperm release evoked by electrical stimulation of the olfactory tract in goldfish. *Brain Res* **291**, 241-247.
- DOVING KB & GEMNE G. (1966). An electrophysiological study of the efferent olfactory system in the burbot. *J Neurophysiol* **29**, 665-674.
- DOVING KB & SELSET R. (1980). Behavior patterns in cod released by electrical stimulation of olfactory tract bundlets. *Science* **207**, 559-560.
- DOVING KB, SELSET R & THOMMESEN G. (1980). Olfactory sensitivity to bile acids in salmonid fishes. *Acta Physiol Scand* **108**, 123-131.
- DØVING K, HAMDANI E, HØGLUND E, KASUMYAN A & TUVIKENE A. (2005). A review on the chemical and physiological basis of alarm reactions in cyprinids. In *Fish Chemosenses*. ed. BG KAPOOR KR, pp. 133-163. Printers House.
- DØVING KB. (1982). Olfactory induced behaviour in fish and the role of centrifugal fibers in the olfactory pathways. In *The determination of behaviour by chemical stimuli*. ed. STEINER JE, pp. 105-114. IRL Press, London.
- FINGER TE. (1975). The distribution of the olfactory tracts in the bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus*. *J Comp Neurol* **161**, 125-141.
- FRIEDRICH RW & KORSCHING SI. (1997). Combinatorial and chemotopic odorant coding in the zebrafish olfactory bulb visualized by optical imaging. *Neuron* **18**, 737-752.

- HAMDANI EH, ALEXANDER G & DOVING KB. (2001). Projection of sensory neurons with microvilli to the lateral olfactory tract indicates their participation in feeding behaviour in crucian carp. *Chem Senses* **26**, 1139-1144.
- HAMDANI EH & DØVING KB. (2005). Functional organization of the olfactory system in fish. In *Fish Communication*. ed. COLLIN. FLAS.
- HAMDANI EH, KASUMYAN A & DOVING KB. (2001). Is feeding behaviour in crucian carp mediated by the lateral olfactory tract? *Chem Senses* **26**, 1133-1138.
- HAMDANI EH, STABELL OB, ALEXANDER G & DOVING KB. (2000). Alarm reaction in the crucian carp is mediated by the medial bundle of the medial olfactory tract. *Chem Senses* **25**, 103-109.
- HAMDANI EL H & DOVING KB. (2002). The alarm reaction in crucian carp is mediated by olfactory neurons with long dendrites. *Chem Senses* **27**, 395-398.
- HAMDANI EL H & DOVING KB. (2003). Sensitivity and selectivity of neurons in the medial region of the olfactory bulb to skin extract from conspecifics in crucian carp, *Carassius carassius*. *Chem Senses* **28**, 181-189.
- HANSEN A, ANDERSON KT & FINGER TE. (2004). Differential distribution of olfactory receptor neurons in goldfish: structural and molecular correlates. *J Comp Neurol* **477**, 347-359.
- HANSEN A & FINGER TE. (2000). Phyletic distribution of crypt-type olfactory receptor neurons in fishes. *Brain Behav Evol* **55**, 100-110.
- HANSEN A, ROLEN SH, ANDERSON K, MORITA Y, CAPRIO J & FINGER TE. (2003). Correlation between olfactory receptor cell type and function in the channel catfish. *J Neurosci* **23**, 9328-9339.
- HANSEN A, ROLEN SH, ANDERSON K, MORITA Y, CAPRIO J & FINGER TE. (2005). Olfactory receptor neurons in fish: structural, molecular and functional correlates. *Chem Senses* **30**, i311.
- HANSEN A & ZEISKE E. (1998). The peripheral olfactory organ of the zebrafish, *Danio rerio*: an ultrastructural study. *Chem Senses* **23**, 39-48.
- HUBEL D. (1957). Tungsten microelectrode for recording from single units. *Science* **125**, 549-550.
- ICHIKAWA M. (1975). The sentral projections of the Olfactory Tract in the Goldfish, *Carassius auratus*. In *JFacSciUnivTokyo*, vol. 13, pp. 13:254-263.

- ICHIKAWA M & UEDA K. (1977). Fine structure of the olfactory epithelium in the goldfish, *Carassius auratus*. A study of retrograde degeneration. *Cell Tissue Res* **183**, 445-455.
- KOTRSCHAL K. (2000). Taste(s) and olfaction(s) in fish: a review of specialized sub-systems and central integration. *Pflugers Arch*, R178-180.
- LABERGE F & HARA TJ. (2001). Neurobiology of fish olfaction: a review. *Brain Res Brain Res Rev* **36**, 46-59.
- LEVINE RL & DETHIER S. (1985). The connections between the olfactory bulb and the brain in the goldfish. *J Comp Neurol* **237**, 427-444.
- MATSUOKA I, FUYUKI K, SHOJI T & KURIHARA K. (1998). Identification of c-fos related genes and their induction by neural activation in rainbow trout brain. *Biochim Biophys Acta* **1395**, 220-227.
- MATZ SP. (1995). Connections of the olfactory bulb in the chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Brain Behav Evol* **46**, 108-120.
- MORGAN JI & CURRAN T. (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* **14**, 421-451.
- NGAI J, DOWLING MM, BUCK L, AXEL R & CHESSE A. (1993). The family of genes encoding odorant receptors in the channel catfish. *Cell* **72**, 657-666.
- NIEUWENHUYNS RM, J. (1990). *The telencephalon of actinopterygian fishes*, vol. 8A, New York.
- NIKONOV AA & CAPRIO J. (2005). Processing of odor information in the olfactory bulb and cerebral lobes. *Chem Senses* **30**, i317-i318.
- NORTHCUTT RG & DAVIS RE. (1983). *Fish Neurobiology*, vol. 2. Ann Arbor: The University of Michigan Press.
- OKA Y. (1980). The origins of the centrifugal fibers to the olfactory bulb in the goldfish, *Carassius auratus*: an experimental study using the fluorescent dye primuline as a retrograde tracer. *Brain Res* **185**, 215-225.
- PFEIFFER W. (1962). The fright reaction of fish. *Biol Rev Camb Philos Soc* **37**, 495-511.
- ROONEY D, DOVING KB, RAVAILLE-VERON M & SZABO T. (1992). The central connections of the olfactory bulbs in cod, *Gadus morhua* L. *J Hirnforsch* **33**, 63-75.

- ROSS LG & ROSS B. (1984). *Anaesthetic and sedative techniques for fish*. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland.
- SAS E, MALER L & WELD M. (1993). Connections of the olfactory bulb in the gymnotiform fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *J Comp Neurol* **335**, 486-507.
- SHELDON RE. (1912). The Olfactory tracts and centers in teleosts. *J Comp Neurol*, *22*, 177-339.
- SMITH R. (1992). Alarm signals in fishes. *Reviews in fish biology and fisheries* **2**, 33-63.
- STACEY NE & KYLE AL. (1983). Effects of olfactory tract lesions on sexual and feeding behavior in the goldfish. *Physiol Behav* **30**, 621-628.
- THOMMESEN G. (1978). The spatial distribution of odour induced potentials in the olfactory bulb of char and trout (Salmonidae). *Acta Physiol Scand* **102**, 205-217.
- THOMMESEN G. (1983). Morphology, distribution, and specificity of olfactory receptor cells in salmonid fishes. *Acta Physiol Scand* **117**, 241-249.
- VON BARTHELD CS, MEYER DL, FIEBIG E & EBBESSON SO. (1984). Central connections of the olfactory bulb in the goldfish, *Carassius auratus*. *Cell Tissue Res* **238**, 475-487.
- VON FRISCH K. (1941). Über einen Sreckstoff der Fischhaut und seine biologische Bedeutung. *ZvergPhysiol* **29**, 46-145.
- WELTZIEN FA, HOGLUND E, HAMDANI EL H & DOVING KB. (2003). Does the lateral bundle of the medial olfactory tract mediate reproductive behavior in male crucian carp? *Chem Senses* **28**, 293-300.
- ZOU Z, HOROWITZ LF, MONTMAYEUR JP, SNAPPER S & BUCK LB. (2001). Genetic tracing reveals a stereotyped sensory map in the olfactory cortex. *Nature* **414**, 173-179.