UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

Neža Grgurevič

GENETSKO POGOJENE RAZLIKE MED OBNAŠANJEM SAMCEV IN SAMIC PRI MIŠIH BREZ GENA ZA STEROIDOGENI FAKTOR 1

Doktorska disertacija

Ljubljana 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 575.11:591.5:612.8.05:612.6.057:599.323(043.3)

Neža Grgurevič, dr. vet. med.

GENETSKO POGOJENE RAZLIKE MED OBNAŠANJEM SAMCEV IN SAMIC PRI MIŠIH BREZ GENA ZA STEROIDOGENI FAKTOR 1

Doktorska disertacija

GENE DEPENDENT DIFFERENCES IN BEHAVIOR BETWEEN MALE AND FEMALE STEROIDOGENIC FACTOR 1 KNOCKOUT MICE

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2011

Neža Grgurevič

GENETSKO POGOJENE RAZLIKE MED OBNAŠANJEM SAMCEV IN SAMIC PRI MIŠIH BREZ GENA ZA STEROIDOGENI FAKTOR 1

Delo je bilo opravljeno v Centru za genomiko živali Veterinarske fakultete v Ljubljani.

Predstojnik: prof. dr. Gregor Majdič

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentor: prof. dr. Gregor Majdič

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

prof. dr. Robert Frangež – predsednik

prof. dr. Vojteh Cestnik – član

prof. dr. Marko Živin – član

Vsebina

Izvleček ***12***

Abstract ***14***

1 Uvod ***16***

1.1 Namen dela in hipoteze **18**

2 Pregled literature ***20***

2.1 Primarna spolna diferenciacija in razvoj spolnih žlez **20**

2.1.1 Razvoj moških spolnih žlez 20

2.1.2 Razvoj ženskih spolnih žlez 21

2.2 Genetsko uravnavanje razvoja spolnih žlez **21**

2.3 Sekundarna spolna diferenciacija živčnega sistema **23**

2.3.1 Spolno različna področja v hrbtenjači 24

2.3.2 Spolno različna področja v možganih 25

2.4 Steroidogeni faktor 1 ..... **27**

2.4.1 Izražanje steroidogenega faktorja 1 28

2.4.2 Miši brez gena za steroidogeni faktor 1 29

2.5 Obnašanje **31**

2.5.1 Splošno o proučevanju obnašanja 31

2.5.2 Proučevanje obnašanja miši 33

2.5.2.1 Vpliv splošnega zdravstvenega stanja na obnašanje miši 33

2.5.2.2 Vloga gibalnega sistema pri proučevanju obnašanja miši 33

2.5.2.3 Čutilni sistem pri miših 34

2.5.2.4 Proučevanje delovanja vohalnega sistema pri miših 34

2.5.3 Izražanje različnih kategorij obnašanja pri miših 38

2.5.3.1 Spolno obnašanje 38

2.5.3.1.1 Moško spolno obnašanje 38

2.5.3.1.2 Žensko spolno obnašanje 41

2.5.3.2 Starševsko obnašanje 43

2.5.3.2.1 Materinsko obnašanje 44

2.5.3.2.2 Očetovsko obnašanje 46

2.5.3.3 Socialno in agresivno obnašanje 47

2.5.3.3.1 Socialno obnašanje 48

2.5.3.3.2 Agresivno obnašanje 49

2.5.4 Modeli miši za proučevanje vplivov spolnih hormonov na spolno diferenciacijo in obnašanje 53

2.5.4.1 Miši z neobčutljivostjo androgenskih receptorjev in miši brez gena za androgeni receptor ……53
2.5.4.2 Miši brez gena za estrogenski receptor 54
2.5.4.3 Miši brez gena za progestinski receptor 56
2.5.4.4 Miši brez gena za encim aromatazo 57
2.5.5 Model miši za proučevanje genetskih vplivov na spolno diferenciacijo in obnašanje..... 58
2.5.5.1 Model miši štirih različnih genotipov (angl. four core genotypes, FCG)..... 58
2.5.6 Proučevanje vzorcev obnašanja miši, ki so podobni simptomom duševnih motenj pri človeku ……...59
2.5.6.1 Proučevanje vzorcev obnašanja miši, ki so podobna tesnobi pri človeku..... 60

3 Materiali in metode..... 62

3.1 Poskusne živali in načrtovanje poskusov..... 62
3.1.1 Vzreja živali..... 63
3.1.2 Pridobivanje in priprava živali za poskus 63
3.1.2.1 Določanje genotipa živali..... 64
3.1.2.2 Odstranitev spolnih žlez pri živalih divjega tipa in operacije gensko spremenjenih živali ……..64

3.2 Hormoni in njihova priprava..... 65
3.2.1 Priprava kortikosteroidnih hormonov..... 65
3.2.2 Priprava testosteronskih vsadkov..... 65
3.2.3 Priprava estradiol benzoata..... 66
3.2.4 Priprava progesterona 66

3.3 Dodajanje spolnih hormonov..... 66
3.3.1 Dodajanje estradiol benzoata in progesterona 66
3.3.2 Dodajanje kristaliničnega testosterona v obliki vsadkov..... 67

3.4 Priprava stimulusnih živali..... 67
3.4.1 Priprava stimulusnih samic..... 67
3.4.2 Priprava stimulusnih spolno izkušenih samcev 67
3.4.3 Priprava stimulusnih samcev z odstranjenimi vohalnimi betiči..... 68

3.5 Poskusi obnašanja..... 68
3.5.1 Izvedba poskusa v dvignjenem labirintu 69
3.5.2 Izvedba poskusa socialnega prepoznavanja..... 70
3.5.3 Izvedba poskusa v labirintu Y 70
3.5.4 Izvedba poskusa vohalnega prepoznavanja 71
3.5.5 Izvedba poskusa ženskega spolnega obnašanja 72
3.5.6 Izvedba poskusa moškega spolnega obnašanja..... 74
3.5.7 Izvedba poskusa starševskega obnašanja..... 75
3.5.8 Izvedba poskusa agresivnega obnašanja..... 76

3.6 Žrtvovanja..... 77

3.7 Statistična obdelava podatkov 77

4 Rezultati 79

4.1 Obnašanje miši brez dodanih spolnih hormonov 79

4.1.1 Obnašanje miši brez dodanih spolnih hormonov v dvignjenem labirintu 79

4.1.2 Obnašanje miši brez dodanih spolnih hormonov v poskusu vohalnega prepoznavanja 79

4.1.3 Obnašanje miši brez dodanih spolnih hormonov v labirintu Y 81

4.1.4 Obnašanje miši brez dodanih spolnih hormonov v poskusu socialnega prepoznavanja 81

4.1.5 Obnašanje miši brez dodanih spolnih hormonov v poskusu moškega spolnega obnašanja 82

4.1.6 Obnašanje miši brez dodanih spolnih hormonov v poskusu agresivnosti do samcev brez vohalnih betičev 82

4.2 Obnašanje miši po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu 84

4.2.1 Obnašanje miši po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu v poskusu vohalnega prepoznavanja 84

4.2.2 Obnašanje miši po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu v labirintu Y 85

4.2.3 Obnašanje miši po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu v poskusu socialnega prepoznavanja 85

4.2.4 Obnašanje miši po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu v poskusu ženskega spolnega obnašanja 86

4.3 Obnašanje miši po dodanem testosteronskem vsadku 88

4.3.1 Obnašanje miši po dodanem testosteronskem vsadku v poskusu vohalnega prepoznavanja 88

4.3.2 Obnašanje miši po dodanem testosteronskem vsadku v poskusu v labirintu Y 89

4.3.3 Obnašanje miši po dodanem testosteronskem vsadku v poskusu socialnega prepoznavanja 90

4.3.4 Obnašanje miši po dodanem testosteronskem vsadku v poskusu moškega spolnega obnašanja 90

4.3.5 Obnašanje miši (tretja skupina) po dodanem testosteronskem vsadku v poskusu agresivnosti do samcev brez vohalnih betičev 92

4.4 Obnašanje miši brez dodanih spolnih hormonov in po dodanem testosteronskem vsadku 94

4.4.1 Obnašanje miši brez dodanih spolnih hormonov v poskusu starševskega obnašanja 94

4.4.2 Obnašanje miši (četrta skupina) po dodanem testosteronskem vsadku v poskusu agresivnosti do samcev brez vohalnih betičev 97

5 Razprava 99

5.1 Obnašanje miši v dvignjenem labirintu brez dodanih spolnih hormonov 99

5.2 Obnašanje miši v poskusu vohalnega prepoznavanja in v labirintu Y 102

5.2.1 Obnašanje miši v poskusu vohalnega prepoznavanja in v labirintu Y brez dodanih spolnih hormonov 102

5.2.2 Obnašanje miši v poskusu vohalnega prepoznavanja in v labirintu Y po dodanem testosteronu 103

5.2.3 Obnašanje miši v poskusu vohalnega prepoznavanja in v labirintu Y po dodajanju estradiol benzoata in progesterona 105

5.3 Obnašanje miši v poskusu socialnega prepoznavanja brez dodanih spolnih hormonov, po dodanem estradiol benzoatu, progesteronu in testosteronu 106

5.4 Starševsko obnašanje miši brez dodanih spolnih hormonov 108

5.5 Agresivno obnašanje miši brez dodanih spolnih hormonov in po dodanem testosteronu..... 111

5.6 Spolno obnašanje miši 114

5.6.1 Moško spolno obnašanje miši po dodanem testosteronu 114

5.6.2 Žensko spolno obnašanje miši po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu 116

5.7 Genetski in hormonalni dejavniki, ki bi lahko uravnavali nastanek spolnih razlik v obnašanju..... 118

5.8 Dejavniki, ki bi lahko dodatno vplivali na rezultate vseh poskusov 121

6 Povzetek..... 123

7 Summary..... 126

8 Zaključki 129

9 Reference..... 131

Kazalo slik

*Slika 1: Grafični prikaz obnašanja miši v dvignjenem labirintu brez dodanih spolnih hormonov. Statistično značilne razlike med genotipoma so prikazane kot *p < 0,05.* 79

*Slika 2: Grafični prikaz obnašanja miši brez dodanih spolnih hormonov v poskusu vohalnega prepoznavanja. Statistične razlike so prikazane kot *p < 0,05 in ***p < 0,001.* 80

*Slika 3: Grafični prikaz agresivnega obnašanja miši brez dodanih spolnih hormonov v poskusu s samcem brez vohalnih betičev. Statistično značilne razlike med genotipoma so prikazane kot **p < 0,01. A: Število agresivnih aktivnosti pri posameznih skupinah miši. B: Čas do začetka agresivnega negovanja in napada pri posameznih skupinah miši. C: Trajanje agresivnega negovanja pri posameznih skupinah miši.* 84

*Slika 4: Grafični prikaz obnašanja miši v poskusu vohalnega prepoznavanja po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu. Statistično značilne razlike so prikazane kot *p < 0,05 in ***p < 0,001.* 85

Slika 5: Grafični prikaz obnašanja miši v poskusu ženskega spolnega obnašanja po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu. A: Število poskusov naskoka in naskokov stimulusnih samcev. Statistično značilne razlike med spoloma so označene kot $^{a}p < 0,01$. B: Količnik lordoze (LQ) pri poskusnih miših. Statistično značilne razlike med spoloma so označene kot $^{a}p < 0,001$, med samicami WT in ostalimi skupinami miši kot $^{*}p < 0,05$. 87

*Slika 6: Grafični prikaz obnašanja miši po dodanem testosteronskem vsadku v poskusu vohalnega prepoznavanja. Statistično značilne razlike so prikazane kot *p < 0,05.* 89

*Slika 7: Grafični prikaz obnašanja miši po dodanem testosteronskem vsadku v labirintu Y. Statistično značilne razlike so prikazane kot *p < 0,05 in **p < 0,01.* 90

Slika 8: Grafični prikaz obnašanja miši po dodanem testosteronskem vsadku v poskusu moškega spolnega obnašanja s stimulusnimi samicami. Statistično značilnih razlik med skupinami miši ni bilo. 91

*Slika 9: Grafični prikaz obnašanja miši po dodanem testosteronskem vsadku v poskusu moškega spolnega obnašanja s stimulusnimi samicami. Statistično značilne razlike med genotipoma so prikazane kot *p < 0,05 in **p < 0,01. A: Število ugrizov in napadov. B: Čas do prvega ugriza in napada.* 92

*Slika 10: Grafični prikaz agresivnega obnašanja miši (tretja skupina) po dodanem testosteronskem vsadku v poskusu s samcem z odstranjenimi vohalnimi betiči. Statistično značilne razlike med spoloma so prikazane kot $^{a}p < 0,05$, med genotipoma kot *p < 0,05, **p < 0,01 in ***p < 0,001. A: Število ugrizov in napadov. B: Čas do začetka ugriza, napada in agresivnega negovanja.* 93

*Slika 11: Grafični prikaz starševskega obnašanja miši brez dodanih spolnih hormonov. Statistično značilne razlike med genotipoma so prikazane kot *p < 0,05 in **p < 0,01.* 95

*Slika 12: Grafični prikaz starševskega obnašanja miši brez dodanih spolnih hormonov. Statistično značilne razlike med spoloma so prikazane kot $^{a}p < 0,05$, med genotipoma so prikazane kot $^{\#}p < 0,01$ in med samicami WT in ostalimi skupinami miši kot *p < 0,05.* 95

*Slika 13: Grafični prikaz starševskega obnašanja miši brez dodanih spolnih hormonov. Statistične razlike med samicami WT in ostalimi skupinami miši so prikazane kot *p < 0,05.* 96

Slika 14: Grafični prikaz agresivnega obnašanja miši (četrta skupina) po dodanem vsadku s testosteronom, v poskusu s samci brez vohalnih betičev. A: Število ugrizov, napadov in začetkov agresivnega negovanja. Samice SF-1KO so se statistično značilno razlikovale od samcev SF-1KO in samic WT $^{c}p < 0,05$, samci WT so se statistično značilno razlikovali od samic WT $^{d}p < 0,05$. B: Trajanje agresivnega negovanja miši. Samice SF-1KO so se statistično značilno razlikovale od samcev SF-1KO in samic WT $^{c}p < 0,05$. 98

Kazalo tabel

*Tabela 1: Prikaz obnašanja miši brez dodanih spolnih hormonov v poskusu vohalnega prepoznavanja. Statistično značilna razlika med spoloma je prikazana kot *p < 0,05. ..... 80*

*Tabela 2: Prikaz obnašanja miši brez dodanih spolnih hormonov v labirintu Y. Statistično značilne razlike med spoloma so prikazane kot *p < 0,05. ..... 81*

*Tabela 3: Prikaz obnašanja miši brez dodanih spolnih hormonov v poskusu socialnega prepoznavanja. Statistično značilne razlike med genotipoma so prikazane kot *p < 0,05. ..... 81*

*Tabela 4: Prikaz obnašanja miši po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu v poskusu socialnega prepoznavanja. Statistično značilne razlike med genotipoma so prikazane kot *p < 0,05. ..... 86*

Tabela 5: Prikaz števila ejakulacij stimulusnih samcev v poskusu ženskega spolnega obnašanja miši po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu. Statistično značilne razlike med spoloma so označene kot $^{a}p < 0,001$, med samicami WT in ostalimi skupinami miši kot $^{b}p < 0,05$. 88

*Tabela 6: Prikaz starševskega obnašanja miši brez dodanih spolnih hormonov. Statistično značilne razlike med genotipoma so prikazane kot ***p < 0,001 ..... 96*

Tabela 7: Prikaz ugotovljenih statistično značilnih razlik med spoloma ne glede na genotip miši. Hormonsko stanje je označeno kot estradiol benzoat in progesteron (EB+P), brez dodanih spolnih hormonov (/), testosteron (T). Samice so označene kot (f) in samci kot (m). 119

Okrajšave

ACTH	.....	kortikotropin; adrenocorticotropic hormone
AHC	.....	prirojena hiperplazija nadledvičnih žlez; adrenal hyperplasia congenita
AR	.....	androgenski receptor
AVPV	.....	anteroventralni del periventrikularnega jedra; *nucleus periventricularis ventralis*; anteroventral periventricular nucleus
BDNF	.....	nevrotrofični dejavnik možganov; brain derived neurotrophic factor
BNST	.....	spodnje jedro končne strije; *nucleus stria terminalis*; bed nucleus of stria terminalis
DAX1	.....	DSS-AHC kritično področje na kromosomu X; DSS-AHC critical region on the X chromosome
DMH	.....	dorzomedialno jedro hipotalamusa; *nucleus dorsomedialis hypothalami*; dorsomedial hypothalamic nucleus
DNK	.....	deoksiribonukleinska kislina
DSS	.....	sprememba spola odvisna od koncentracije; dosage sensitive sex reversal
ERα	.....	estrogenski receptor α
ERβ	.....	estrogenski receptor β
FSH	.....	folikel stimulirajoči hormon; follicle stimulating hormone
GnRH	.....	sproščajoči hormon gonadotropinov; gonadotrophin releasing factor
5-HT	.....	5-hidroksitriptamin; serotonin
INAH	.....	intersticialno jedro sprednjega hipotalamusa; *nuclei interstitiales hypothalami anteriores*; intersticial nucleus of anterior hypothalamus
LH	.....	luteinizirajoči hormon; luteinising hormone
LQ	.....	količnik lordoze; lordosis quotient
MeA	.....	medialno jedro amigdale; medial amygdaloid nucleus
miš ArKO	.....	miš brez gena za encim aromatazo (Ar knockout)
miš ARKO	.....	miš brez gena za androgenski receptor (AR knockout)
miš CNS SF-1KO	.....	miši brez gena za SF-1 v centralnem živčnem sistemu; central nervous system (CNS) specific SF-1 knockout
miš ERαKO	.....	miš brez gena za estrogenski receptor α (ER α knockout)
miš ERαβKO	.....	miš brez gena za estrogenski receptor α in β (ER αβ knockout)

miš ERβKO	.....	miš brez gena za estrogenski receptor β (ER β knockout)
miši FCG	.....	miši štirih različnih genotipov, four core genotypes
miš PRKO	.....	miš brez gena za progestinski receptor (PR knockout)
miš SF-1KO	.....	miš brez gena za steroidogeni faktor 1 (SF-1 knockout), samec **SF-1KO (KOm)**, samica **SF-1KO (KOf)**
miš Tfm	.....	miš z neobčutljivostjo androgenskega receptorja; testicular feminization mutation
MPO	.....	medialno predoptično jedro; *nucleus preopticus medialis*; medial preoptic nucleus
MPOA	.....	medialni del predoptičnega področja; *nucleus preopticus medialis*; medial preoptic area
PBS	.....	fosfatni pufer z NaCl; phosphate buffered saline
PCR	.....	verižna reakcija s polimerazo; polymerase chain reaction
POA	.....	predoptično področje; preoptic area; MPOA – medialno predoptično področje; medial preoptic area
PR	.....	progestinski receptor
SDN-POA	.....	spolno dimorfno jedro v predoptičnem področju; sexually dimorphic nucleus of the preoptic area
SOX9, Sox9	.....	SRY-sorodna beljakovina s homeo-zaporedjem; SRY-related HMG box
Sry	.....	spol določujoče področje na kromosomu Y; sex determining region on Y chromosome
V1, V2	.....	receptor za arginin vazopresin
VMH	.....	ventromedialno jedro hipotalamusa; *nucleus ventromedialis hypothalami*; ventromedial nucleus of hypothalamus
VNO	.....	vomeronazalni organ
Wnt4	.....	član družine wingless mesta vključitve MMTV; wingless type MMTV integration site family member 4
Wt1	.....	prepisovalni dejavnik wilmsovega tumorja 1; wilms tumor 1

GENETSKO POGOJENE RAZLIKE MED OBNAŠANJEM SAMCEV IN SAMIC PRI MIŠIH BREZ GENA ZA STEROIDOGENI FAKTOR 1

Izvleček

Ključne besede: genetika, vedenjska; nevroendokrinologija; genitalije – embriologija; spolne značilnosti – genetika; spolno vedenje živali – fiziologija; določanje spola; gensko izražanje; miši z odstranjenim genom; steroidogeni faktor 1

Proces spolne diferenciacije omogoča spolno različen razvoj nevroendokrinega sistema, kar je osnova za različno obnašanje pri ženskem in moškem spolu. Ta proces uravnavajo predvsem hormonalni dejavniki in poleg njih tudi genetski dejavniki, o katerih je veliko manj znanega. Steroidogeni faktor 1 (SF-1) je nujno potreben pri razvoju spolnih žlez, nadledvičnih žlez in ventromedialnega hipotalamusa (VMH). Miši brez gena za SF-1 (SF-1KO) se rodijo brez spolnih žlez. Kljub temu da so vse miši SF-1KO fenotipsko samice, imajo še vedno prisotne spolne kromosome XX ali XY in so zato lahko genetsko ženskega ali moškega spola. Zaradi zgodnjega propada zametkov spolnih žlez se te miši razvijajo v odsotnosti spolnih hormonov in predstavljajo edinstven model za proučevanje genetskih vplivov, neodvisno od spolnih hormonov, na spolno različen razvoj obnašanja. V naši raziskavi smo uporabili miši, ki so se razlikovale glede na prisotnost različnih spolnih kromosomov (XX, XY) in glede na prisotnost ali odsotnost spolnih hormonov med fetalnim razvojem: samce SF-1KO (XY, brez spolnih hormonov), samice SF-1KO (XX, brez spolnih hormonov), samce divjega tipa (XY, prisotnost testosterona), samice divjega tipa (XX, brez spolnih hormonov). Samce in samice miši SF-1KO in miši divjega tipa (WT), s predhodno odstranjenimi spolnimi žlezami, smo opazovali v različnih poskusih obnašanja, v treh različnih hormonskih stanjih (brez dodanih spolnih hormonov, po dodanem testosteronu in po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu). Obnašanje podobno tesnobi smo proučevali v dvignjenem labirintu, vohalno obnašanje v poskusu vohalnega prepoznavanja in labirintu Y, socialno obnašanje v poskusu socialnega prepoznavanja, moško in žensko spolno obnašanje s stimulusnimi samicami in samci, starševsko obnašanje pa smo vzpodbudili z mladiči. Zanimalo nas je tudi, ali nedelujoči SF-1 oziroma spremenjena struktura VMH vpliva na te vzorce obnašanja pri miših SF-1KO. V odsotnosti spolnih hormonov se je pri večini vzorcev obnašanja pokazal vpliv

genotipa. Miši SF-1KO so izražale spremenjeno socialno obnašanje, povečano agresivnost in tesnobo ter zmanjšano starševsko obnašanje v primerjavi z divjim tipom. Po dodanem testosteronu samci SF-1KO, podobno kot samci WT, niso prepoznavali vonja samice in so slabše izražali agresivno obnašanje kot samice obeh genotipov. Predvidevamo, da sta odstranitev mod pred puberteto pri samcih WT in pomanjkanje spolnih hormonov v obdobju pred rojstvom pri samcih SF-1KO vplivala na slabše izražanje teh vzorcev. Samice obeh genotipov so po dodanem testosteronu za razliko od samcev izražale privlačnost do vonja samic, agresivno obnašanje in del moškega spolnega obnašanja. To dokazuje, da ti vzorci pri samicah niso demaskulinizirani in niso odvisni od izpostavitve testosteronu med fetalnim obdobjem. Po dodanima estradiol benzoatu in progesteronu smo ugotovili razlike med spoloma, ki so pokazale boljše izražanje ženskega spolnega obnašanja pri samicah v primerjavi s samci obeh genotipov, pri čemer so samice WT najbolje izražale te vzorce obnašanja. Predpostavljamo, da smo dobili razlike med samicami WT in mišmi SF-1KO zaradi vpliva spremenjenega VMH, razlike med spoloma pa so verjetno posledica delovanja genetskih dejavnikov skupaj s spolnimi hormoni. Podobne razlike med spoloma smo dobili tudi pri starševskem obnašanju, kjer so v odsotnosti spolnih hormonov samice nekatere vzorce obnašanja bolje izražale od samcev obeh genotipov. V naši raziskavi nismo dobili razlik med samci in samicami SF-1KO, ki bi dokazovale, da genetski dejavniki delujejo neodvisno od spolnih hormonov. Kljub vsemu menimo, da nekatere razlike med spoloma (starševsko in žensko spolno obnašanje) to nakazujejo. Miši SF-1KO so se izkazale kot zelo kompleksen model za proučevanje obnašanja, vendar je zaenkrat to edini model, pri katerem je možno proučevati procese spolne diferenciacije neodvisno od spolnih hormonov.

GENE DEPENDENT DIFFERENCES IN BEHAVIOR BETWEEN MALE AND FEMALE STEROIDOGENIC FACTOR 1 KNOCKOUT MICE

Abstract

Keywords: genetic, behavioral; neuroendocrinology; genitalia – embriology; sex characteristics – genetics; sexual behavior, animal – physiology; sex determination; gene exspression; mice, knockout; steroidogenic factor 1

During the process of sexual differentiation differences in behavior of male and female develop. Sexual differentiation is mainly regulated by hormonal factors, although less known sex chromosome effects have also been implicated in this process. Steroidogenic factor 1 (SF-1) is essential for gonadal, adrenal and hypothalamic development. Namely, steroidogenic factor 1 knockout mice (SF-1KO) are born without gonads. Although all SF-1KO mice are phenotypically females, they still possess either XX or XY sex chromosome complement which determines their genetic sex. In SF-1KO mice gonads disappear early during gonadal differentiation. Therefore, these mice develop in the absence of sex hormones, providing a unique model to study hormone-independent sexual differentiation. Altered structure of the ventromedial hypothalamus also provides an opportunity to use SF-1KO mice in studies of VMH-dependent behaviors.

In our studies we tested SF-1KO and control mice of both sexes for different types of behaviors in three different hormonal conditions. In the absence of sex hormones, differences in behaviors were mostly observed as VMH-dependent. Steroidogenic factor 1 knockout mice showed differences in social behavior, increased aggression and increased anxiety-like behavior. Results with testosterone treated mice revealed that some typical male behaviors are most likely regulated by hormonal and genetic factors both prenatally and during puberty. Wild type and SF-1 KO males failed to show olfactory preference for females and expressed lower aggression than females of both genotypes. We predict that castration of control males before puberty and absence of gonadal hormones prenatally in SF-1KO males caused poorer expression of these behaviors. Besides that, our study showed that many of typical male behaviors (male sex behavior, aggression and olfactory preference) are not demasculinized in females and could be expressed in adult females after appropriate hormone treatment. In parental behavior in hormonally naive mice and in

sexual behavior following treatment with estradiol benzoate and progesterone, sex differences were found that had been likely caused by chromosomal factors together with sex hormones. Behaviors such as nest building, crouching and female sex behavior (lordosis) are likely regulated also by genetic/chromosomal factors in females and suppressed by hormonal and genetic factors in males. In conclusion, our study showed that sex differences in behavior are influenced by both hormonal and genetic/sex chromosome factors. Since sex differences were not observed in SF-1KO mice we can not conclude that genetic factors influence sexual differentiation independent of gonadal hormones as it was predicted in the hypotheses. However, SF-1KO mice are a very complex model for studying behavior and so far also the only one, where we can study the processes of sexual differentiation independent of sex hormones.

1 Uvod

Razlike med spoloma so predmet vsakodnevnih pogovorov, polemik in pogosto tudi tema znanstvenih raziskav. Pri številnih živalskih vrstah in človeku lahko že na prvi pogled ločimo oba spola. Tako se na primer moški spol loči od ženskega po velikosti in obliki telesa, mišični masi ter prisotnosti različnih zunanjih spolnih znakov, kot so: barva dlake, perja, poraščenost, prisotnost razvitih mlečnih žlez in nenazadnje tudi po obnašanju. Razlikam, ki določajo ženski ali moški fenotip, pravimo tudi sekundarni spolni znaki. Za razliko od spolnih organov za druge notranje organe težko rečemo, ali pripadajo ženskemu ali moškemu spolu oziroma je to nemogoče. To velja tudi za možgane. Med vsemi organi so najverjetneje prav možgani tisti, katerih razlike med spoloma so ena najzanimivejših in hkrati najobčutljivejših tem. Tu so spolne razlike ali dimorfizmi prisotni na skoraj vseh ravneh zgradbe in delovanja. Pri nekaterih lastnostih pa vseeno ni jasne meje med spoloma in se velikokrat med seboj prekrivajo. Lastnostim, ki so delno izražene pri obeh spolih, pravimo alomorfizmi.

Razlike med spoloma nastanejo med procesom, ki ga imenujemo spolna diferenciacija. Pri sesalcih imajo moški organizmi spolna kromosoma XY in ženski XX. Spolna diferenciacija se prične kmalu po oploditvi. Par spolnih kromosomov določa ali se bo oplojena jajčna celica razvila v plod moškega ali ženskega spola. Pod vplivom gena *Sry* (*angl.* sex determining region on Y chromosome), ki leži na kromosomu Y, se v plodu moškega spola razvijejo moda. Če gen *Sry* ni prisoten ali ne deluje pravilno, se v plodu razvijejo jajčniki. Ko so moške ali ženske spolne žleze razvite, je primarna spolna diferenciacija organizma končana. Od tu naprej se razvoj nadaljuje pod vplivom spolnih hormonov. Ta proces imenujemo tudi sekundarna spolna diferenciacija in poleg razvoja sekundarnih spolnih znakov vključuje tudi spolno različen razvoj živčnega sistema (1).

Razlike v zgradbi so prisotne na ravni celotnih možganov in hrbtenjače ter se izražajo glede na posamezna področja kot razlike v prostornini, številu celic in položaju strukturnih elementov v teh področjih ali pa se izražajo na ravni celice kot razlike v velikosti celičnega telesa, jedra, jedrca, razlike v številu in vrsti sinaptičnih povezav, morfologiji celičnih podaljškov ter izražanju različnih bioloških molekul (2, 3, 4). Na tem mestu se v nevroznanosti pojavi vprašanje, kako povezati razlike v zgradbi z razlikami v delovanju. Razlike v zgradbi so lahko vzrok, niso pa pogoj, za razlike v delovanju. Delovanje je lahko

različno, kljub temu da razlik v zgradbi ni, in obratno, razlike v zgradbi so, medtem ko jih v delovanju ni (5). Razlike v delovanju možganov tudi povzročijo razlike v njihovi zgradbi, saj so možgani plastični in živčne povezave med delovanjem vedno znova nastajajo in izginjajo. Nekateri celo menijo, da razlike v zgradbi preprečujejo razlike v delovanju–obnašanju, ki bi lahko nastale zaradi nekaterih sprememb fizioloških parametrov. Tako na primer predvidevajo, da samci monogamnih vrst rovk ne bi mogli skrbeti za zarod tako kot samice, če ne bi bilo ustreznih razlik v možganih, saj je njihov hormonalni status drugačen kot pri samicah (6).

Razlike v delovanju se kažejo na različnih ravneh živčnega sistema, na ravni celotnega organizma pa jih lahko opazujemo kot razlike v obnašanju. Drugo vprašanje, na katero si želi odgovoriti nevroznanost, je, kdaj in kako te razlike nastanejo. Kot smo že omenili, se s procesom sekundarne spolne diferenciacije, pod vplivom spolnih hormonov, začne tudi spolno različen razvoj živčnega sistema in s tem tudi obnašanja. Barthold je bil eden prvih, ki je začel raziskovati vpliv spolnih hormonov na obnašanje. Leta 1849 je ugotovil, da se petelini po odstranitvi mod prenehajo značilno oglašati in ne kažejo agresivnega obnašanja. Če jim je moda ponovno vsadil, se je njihovo značilno obnašanje povrnilo (7). Več kot sto let kasneje so Young in njegovi sodelavci hipotezo o vplivu spolnih hormonov na obnašanje prenesli na obdobje fetalnega razvoja. Predpostavljali so, da so spolni hormoni v tem obdobju ključnega pomena za razvoj moških in ženskih vzorcev obnašanja. Ugotovili so, da dodajanje testosterona v času fetalnega razvoja povzroči maskulinizacijo (razvoj nevroendokrinega sistema in izražanje oblik obnašanja, ki so značilne za moški spol) in zavre proces feminizacije (razvoj nevroendokrinega sistema in izražanje oblik obnašanja, ki so značilne za ženski spol). Predpostavili so tudi, da spolni hormoni vplivajo na razvoj živčnega sistema preko organizacijskih in aktivacijskih učinkov. Organizacijski učinki povzročijo trajne spremembe v živčnem sistemu predvsem v zgodnjih obdobjih razvoja in predstavljajo osnovo za spolno različno obnašanje. Aktivacijski učinki pa so prisotni predvsem v odraslem obdobju in predstavljajo prehodne spremembe, ki nastanejo ob vsakokratnem izločanju hormonov (8). MacLusky in Naftolin (9) sta hipotezi o različnih učinkih dodala še hipotezo o aromatizaciji testosterona. Ta je natančneje razložila vlogo testosterona pri spolni diferenciaciji živčnega sistema. Predpostavila sta, da testosteron, ki se izloča iz plodov moškega spola, prehaja v možgane in se tam aromatizira v estradiol. Tako je pri glodavcih estradiol glavni hormon, ki povzroči maskulinizacijo in defeminizacijo živčnega sistema pri samcih. Pri plodovih ženskega spola testosterona ni,

zato predpostavljajo, da se razvijajo v odsotnosti spolnih hormonov. Ta hipoteza je danes splošno sprejeta, čeprav še vedno ni točno znano, ali tudi pri organizmih ženskega spola poteče aktiven proces feminizacije in/ali demaskulinizacije. Nekatere raziskave kažejo na to, da bi bili lahko za popolno feminizacijo potrebni spolni hormoni. Predpostavljajo, da bi se lahko proces aktivne feminizacije, vsaj pri miših, odvijal pod vplivom estradiola v obdobju med rojstvom in puberteto (10).

Celoten proces spolne diferenciacije pa ne poteka samo pod vplivom spolnih hormonov, ampak nanj lahko neposredno vplivajo tudi spolno različni genetski dejavniki. V zadnjih desetih letih se povečuje število raziskav, ki potrjujejo neposredni vpliv genetskih dejavnikov na možgane in obnašanje (11). Ugotovili so, da se pojavijo razlike med spoloma v izraženosti genov v možganih že pred razvojem spolnih žlez, neodvisno od spolnih hormonov (12). Pri učenju navad (13), socialnem (14) in starševskem obnašanju (15) in pri poteku imunskih bolezni (16) so odkrili spolne razlike, ki bi lahko nastale prav zaradi neposrednega delovanja različnih genov. Predpostavljajo, da so to geni, ki ležijo na različnih spolnih kromosomih (11). Miši brez gena za steroidogeni faktor 1 (SF-1) se rodijo brez spolnih žlez. Zaradi zgodnjega propada zametkov spolnih žlez te miši nikoli niso izpostavljene spolnim hormonom. Kljub temu da so vse miši brez gena za SF-1 fenotipsko samice, imajo še vedno spolna kromosoma XX ali XY in so zato lahko genetsko ženskega ali moškega spola. Zaradi nedelujočega gena za SF-1 imajo spremenjeno tudi strukturo ventromedialnega jedra hipotalamusa (VMH) (17). To jedro možganov ima pomembno vlogo pri uravnavanju vzorcev obnašanja, kot so: fizična aktivnost, prehranjevanje, socialno, agresivno in žensko spolno obnašanje (18). Zaradi vseh teh lastnosti (odsotnost spolnih žlez in spremenjenega VMH) so miši brez gena za SF-1 edinstven model za proučevanje hormonsko neodvisne spolne diferenciacije in za proučevanje vloge VMH v obnašanju.

1.1 Namen dela in hipoteze

Namen našega dela je bil ugotoviti, ali vplivajo genetski dejavniki, neodvisno od spolnih hormonov, na razvoj različnih vzorcev obnašanja.

V naši raziskavi smo uporabili miši brez gena za SF-1 (*angl.* knockout, SF-1KO), ki zaradi odsotnosti spolnih žlez niso izpostavljene spolnim hormonom in s tem procesu spolne diferenciacije. Za kontrolne živali smo uporabili divji tip (*angl.* wild type, WT) miši, z

normalno prisotnim genom za SF-1 in normalno razvitimi spolnimi žlezami, ki so bile izpostavljene procesu spolne diferenciacije (organizacijski učinki spolnih hormonov). Spolne žleze smo jim odstranili pred začetkom pubertete in s tem prekinili vpliv spolnih hormonov v drugem kritičnem obdobju spolne diferenciacije (aktivacijski učinki spolonih hormonov). Vse miši smo opazovali za različne vzorce obnašanja, v treh različnih hormonskih stanjih: brez dodanih spolnih hormonov, po dodanem testosteronu ter po dodajanju estrogenih hormonov in progesterona.

S tem smo želeli odgovoriti na naslednja vprašanja:

- *Ali so razlike v obnašanju nastale že v obdobju pred rojstvom, neodvisno ali odvisno od spolnih hormonov?*
- *Ali z dodajanjem različnih spolnih hormonov v odraslem obdobju lahko vplivamo na te razlike?*
- *Ali pa razlik v obnašanju ni in nastanejo šele po dodajanju spolnih hormonov v odraslem obdobju?*

V naši raziskavi smo postavili naslednje hipoteze:

- *V primeru da nedelujoči gen za SF-1 vpliva na obnašanje, se bodo miši SF-1KO obnašale drugače kot miši WT. Predvidevamo, da bi te razlike lahko nastale zaradi spremenjenega ventromedialnega jedra hipotalamusa pri miših SF-1KO.*
- *V primeru da vplivajo spolni hormoni v fetalnem obdobju na obnašanje, bodo razlike med spoloma prisotne samo pri miših WT, miši SF-KO pa se bodo obnašale podobno, kot samice WT.*
- *V primeru da genetski dejavniki vplivajo na obnašanje neodvisno od spolnih hormonov, bodo razlike med spoloma prisotne pri miših WT in pri miših SF-1KO. Samci SF-1KO se bodo obnašali podobno kot samci WT in samice SF-1KO se bodo obnašale podobno kot samice WT.*

2 Pregled literature

2.1 Primarna spolna diferenciacija in razvoj spolnih žlez

Pri sesalcih se prične spolna diferenciacija kmalu po oploditvi. Med oploditvijo se zrela jajčna celica, ki nosi kromosom X, združi s semenčico, ki nosi kromosom X ali Y. V oplojeni jajčni celici sta tako lahko prisotna spolna kromosoma XY, ki določata moški spol, ali spolna kromosoma XX, ki določata ženski spol zarodka. Čeprav je spol zarodka določen kmalu po oploditvi, se razvoj spolnih žlez prične kasneje med organogenezo. Spolne žleze se začnejo razvijati iz zametkov spolnih žlez, katerih celice so nediferencirane oziroma bipotentne. To pomeni, da se lahko razvijejo v dva različna organa, modo ali jajčnik. Razvoj spolnih žlez se začne na ventralnem delu primitivne ledvice (mezonefrosa) kot par spolnih grebenov. Celice epitelija spolnega grebena se začnejo razmnoževati in vedno bolj segajo v rahlo vezivno tkivo nad spolnim grebenom. Tam oblikujejo primitivne spolne niti, ki bodo obdajale zarodne oziroma bodoče spolne celice. Do oblikovanja primitivnih spolnih niti so spolne žleze pri obeh spolih enako oblikovane. Takrat sta v rahlem vezivnem tkivu vidna tudi wolffov in müllerjev vod, iz katerih se bodo razvili ostali deli spolnega aparata (1).

2.1.1 Razvoj moških spolnih žlez

Kritično obdobje diferenciacije spolnih žlez, ki določa, ali se bodo razvila moda ali jajčniki, je pri miših med 10,5 in 12,5 starosti zarodka (19, 20) in pri človeku med 41. in 44. dnevom starosti zarodka (21). Takrat se pri zarodku moškega spola začne v celicah spolnega grebena izražati gen *Sry* (*angl.* sex determining region on Y chromosome), odločilen gen, ki določa začetek razvoja mod. Pod vplivom gena *Sry* se v spolnem grebenu diferencirajo sertolijeve celice, ki obkrožajo zarodne celice. Sertolijeve celice začnejo izločati antimüllerjev hormon, ki povzroči pri plodu moškega spola propad müllerjevega voda, ohrani pa se wolffov vod. Spolne niti se daljšajo in potujejo vedno globlje v vezivno tkivo. Tam se med sabo spojijo in tvorijo mrežo mod, *rete testis*. Ko se podaljšujejo se vedno bolj oddaljujejo od epitelija in se na koncu tudi od njega oddvojijo. Iz površinskega epitelija se izoblikuje ovojnica mod, *tunica albuginea*. Razvoj mod se nadaljuje med puberteto. Takrat se niti razvijajo naprej v semenske kanalčke, v katerih začnejo dozorevati semenčice. Semenski kanalčki so povezani s semenovodom, ki je naprej povezan z

wolffovim vodom. Za ohranitev wolffovega voda je potreben testosteron, ki ga izločajo leydigove celice. Te se razvijejo takoj po pojavu sertolijevih celic. V plodu moškega spola se iz wolffovega voda razvijejo del nadmodka, semenovod in semenski mešički (1).

2.1.2 Razvoj ženskih spolnih žlez

V nasprotju z zarodki moškega spola pa pri zarodkih ženskega spola primitivne spolne niti, ki so se na začetku razvile, propadejo. Takoj se začnejo razvijati nove spolne niti, ki ne potujejo globoko v vezivno tkivo, ampak ostanejo blizu bodoče skorje in se zato imenujejo spolne niti skorje. Spolne niti skorje se oblikujejo v otočke. Vsak otoček obdaja po eno zarodno celico. Celice spolnih niti, ki obdajajo zarodno celico, se diferencirajo v celice granuloze. Celice mezenhimskega veziva, ki obdajajo spolne niti, pa se diferencirajo v celice teke. Celice granuloze in teke tvorijo folikel, v katerem bodo zorele jajčne celice. Pri plodovih ženskega spola müllerjevi vodi ostanejo in se naprej razvijejo v jajcevoda in maternico (1)

2.2 Genetsko uravnavanje razvoja spolnih žlez

Spolna diferenciacija je natančno uravnavan in zapleten proces. Uporaba metod za proučevanje delovanja genov ter primerjava genotipov in fenotipov z različnimi motnjami v spolni diferenciaciji je omogočila natančno odkrivanje tega procesa. Nemoteno izražanje gena *Sry* je nujno potrebno za začetek razvoja mod, vendar še ni zadosten pogoj, da se bodo moda tudi dokončno razvila. Za to so potrebni še številni drugi dejavniki (1).

Nekateri geni, kot so gen wilmsovega tumorja 1 (*angl*. wilms tumour suppressor gene 1, Wt1) in gen za steroidogeni faktor 1 (*angl*. steroidogenic factor 1, SF-1) so potrebni že pred spolno diferenciacijo, za nastanek spolnega grebena pri obeh spolih (22, 23). Beljakovina Wt1, poleg proteina Gata4 (*angl*. Gata binding protein 4) verjetno vpliva neposredno tudi na izražanje gena *Sry* (24). Najverjetneje gre za dve ključni točki uravnavanja. Na začetku SF-1, Gata4 in krajša oblika Wt1(Wt1-KTS), uravnavajo začetek prepisovanja gena *Sry*, v nadaljevanju pa druga oblika Wt1 (Wt1+KTS) uravnava pravo koncentracijo produkta gena *Sry* (25).

Tudi gen *Sox9* (*angl*. SRY-related HMG box) je nujno potreben za razvoj mod. Majhne količine Sox9 se začnejo izražati že v začetni fazi razvoja spolnih žlez, pri obeh spolih. To začetno fazo uravnava SF-1, ki spodbuja izražanje Sox9. Kasneje se SF-1 pridruži še Sry in

skupaj pri moških zarodkih povečata izražanje Sox9. V zadnji fazi, po spolni determinaciji, ostane izražanje Sox9 na določeni ravni. Ta faza je pod vplivom samouravnavanja preko produkta gena *Sox9* (26).

Na povečanje izražanja Sox9 vplivajo še nekateri drugi geni, kot sta gen *Dax* (*angl*. dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita (AHC) critical region on gene 1 of the X chromosome) in gen *Wnt4* (*angl*. wingless- type MMTV integration site family, member 4) (27, 28, 29). Produkta DAX1 in WNT4 sta bila na začetku opisana kot dejavnika, ki zavirata razvoj mod, saj so ob prevelikem izražanju poročali o motenem razvoju mod in o spremembi moškega fenotipa proti ženskemu. Pri moških z nepopolno razvitimi spolnimi žlezami in ženskim fenotipom, vendar brez sprememb gena *Sry*, so odkrili delno podvojitev krajše roke kromosoma X (30), ki so ga poimenovali DSS (*angl*. dosage-sensitive sex reversal). Kandidatni gen znotraj področja DSS so poimenovali *Dax 1*. Tudi preveliko izražanje gena *Wnt4* povzroči moten razvoj mod, vendar ne povzroči popolne spremembe moškega spola v ženskega (31, 32). Prav tako kot prekomerno izražanje tudi neaktivnost obeh genov, *Dax1* in *Wnt4*, pomeni moten razvoj moškega spola. Ničelne mutacije povzročijo spremembo moškega spola v ženskega. To se zgodi zaradi premajhnega izražanja Sox9, kljub temu da izražanje Sry ostane nespremenjeno (27, 28, 29). Zanimivo je, da samice (XX) z mutiranim genom *Dax1* niso prizadete, medtem ko se pri samcih (XY) zaradi neaktivnosti *Dax1* razvijejo jajčniki, ki nimajo sposobnosti nastanka rumenega telesa (33).

Pri razvoju ženskega spola naj bi imel glavno vlogo R-spondin1, ki stabilizira protein β katenin. Gen *Sry* se mora pri moškem spolu izražati ob pravem času in v dovolj visoki koncentraciji, da skupaj z ostalimi dejavniki zavre delovanje β katenina (34). Očitno je, da je kar nekaj dejavnikov, ki uravnavajo te procese, prisotnih v bodočih spolnih žlezah pri obeh spolih. Med razvojem spolnih žlez mora zato priti do usklajenega spodbujanja ene poti in do istočasnega zaviranja druge poti razvoja. Gre za kvalitativen in kvantitativen proces, pri katerem igrajo odločilno vlogo intenzivnost izražanja različnih genov, količina produkta in časovna usklajenost pojavljanja produktov na različnih mestih razvijajoče se spolne žleze (35).

2.3 Sekundarna spolna diferenciacija živčnega sistema

Primarna spolna diferenciacija je končana, ko se iz zasnove za spolne žleze razvijejo moda ali jajčniki. Od tu naprej se razvoj organizma nadaljuje pod vplivom spolnih hormonov, izločenih iz spolnih žlez. Ta proces imenujemo tudi sekundarna spolna diferenciacija, med katero se razvijejo sekundarni spolni znaki, ki določajo moški ali ženski fenotip organizma. Glavna hormona sekundarne spolne diferenciacije sta antimüllerjev hormon in testosteron. Oba usmerjata razvoj sekundarnih spolnih znakov v moški fenotip (1). Proces sekundarne spolne diferenciacije vključuje tudi spolno različen razvoj živčnega sistema. Že Young in sod. (8) so predpostavljali, da se pod vplivom spolnih hormonov, poleg spolnih organov, tudi živčni sistem pri ženskem spolu razvija drugače kot pri moškem spolu. Hormoni iz spolnih žlez vplivajo na živčni sistem v času razvoja in kasneje v odraslem obdobju organizma. Vplivi se kažejo na vseh ravneh zgradbe in delovanja živčnega sistema. Tako se lahko spolne razlike kažejo znotraj posameznega področja možganov ali hrbtenjače v prostornini, številu celic in položaju strukturnih elementov, ali pa se spolne razlike kažejo v lastnostih samih celic, kot so na primer: velikost celičnega telesa, jedra, jedrca, razlike v številu in vrsti sinaptičnih povezav, morfologija celičnih podaljškov ter izražanju različnih bioloških molekul (3, 4). Glede na vrsto sprememb, ki jih hormoni povzročijo, delimo njihove učinke na organizacijske in aktivacijske učinke. Hipotezo o organizacijskih in aktivacijskih učinkih so s poskusom na morskih prašičkih potrdili Phoenix in sod. (8). Brejim samicam morskih prašičkov so dodajali testosteron propionat v dveh različnih koncentracijah. Pri višjih odmerkih so opazili, da so imeli mladiči ženskega spola zunanje spolne organe podobne mladičem moškega spola (povečane *labia vulvae* in *clitoris*). Pri mladičih, ki so bili izpostavljeni nižjim odmerkom testosteron propionata, pa tega niso opazili. Vse mladiče moškega in ženskega spola so v odraslem obdobju opazovali v dveh poskusih. V prvem poskusu so jim dodali estrogene hormone in progesteron ter jih opazovali za žensko spolno obnašanje, v drugem poskusu pa so jih po dodanih androgenih hormonih opazovali še za moško spolno obnašanje. Vse samice, ne glede na zunanje spolne znake (zunanji spolni organi), so imele zmanjšano sposobnost ženskega spolnega obnašanja (lordoze) in povečano sposobnost moškega spolnega obnašanja. Pri samcih podobnih sprememb niso odkrili. Predvidevali so, da so bili androgeni hormoni v zgodnjem obdobju razvoja ključnega pomena pri organizaciji živčnega sistema. V tem poskusu je to pomenilo, da je testosteron propionat v fetalnem obdobju povzročil

maskulinizacijo in defeminizacijo živčnega sistema in obnašanja samic (8). Naslednji velik korak pri odkrivanju mehanizma spolne diferenciacije živčnega sistema je bila postavitev hipoteze o aromatizaciji testosterona v možganih (9). Pri plodovih moškega spola začnejo moda izločati testosteron že v času fetalnega življenja. Pri miših doseže izločanje testosterona dva vrha. Prvi se zgodi približno 17. dan brejosti in drugi takoj po rojstvu (36, 37). Testosteron, ki se izloča iz mod, prehaja preko krvi v možgane plodu. MacLusky in Naftolin (9) sta predpostavila, da se testosteron v možganih pod vplivom encima aromataze spremeni v estradiol. Po aromatizaciji je torej estradiol, in ne testosteron, glavni hormon, ki vpliva na spolno diferenciacijo živčnega sistema. Pri samcih tako estradiol vzpodbudi razvoj nevroendokrinega sistema in obnašanja, ki je značilen za moški spol (maskulinizira) in zavre razvoj nevroendokrinega sistema in obnašanja, ki je značilen za ženski spol (defeminizira). Poleg estradiola, ki nastaja z aromatizacijo testosterona v možganih, so v krvnem obtoku plodu prisotni tudi estrogeni hormoni, izločeni preko matere in posteljice. Glede na njuno hipotezo, bi lahko ti estrogeni hormoni maskulinizirali plodove ženskega spola. Jetra plodov izločajo α-feto protein, ki močno veže estrogene hormone. Dokazano je bilo, da prav α-feto protein zaščiti plodove ženskega spola pred maskulinizacijskim učinkom estrogenov matere in posteljice. Ker α-feto protein slabo veže testosteron, ta lahko normalno maskulinizira plodove moškega spola (9, 38). Steroidni hormoni, ki bi lahko vplivali na razvoj plodov, pa lahko izvirajo še iz drugih virov. Nastajajo v nadledvični žlezi (39), v centralnem živčnem sistemu (40, 41) ali pridejo v telo od sosednjih plodov (42) ali preko hrane in vode (fitoestrogeni ali kemične snovi, ki posnemajo hormone) (43, 44).

2.3.1 Spolno različna področja v hrbtenjači

Spolni dimorfizem živčnega sistema je zelo dobro raziskan pri glodavcih. Področja, ki se razlikujejo pri samcih in samicah ležijo tako v hrbtenjači kot tudi v možganih. V ledvenem delu hrbtenjače ležijo motorični živci, ki oživčujejo mišice, pritrjene na penis. Samci podgane imajo vsaj trikrat toliko živčnih celic v čebulno-brecilnih motoričnih jedrih kot samice. Te živčne celice so pri samicah polovico manjše kot pri samcih (45). Na spolne razlike v teh jedrih vpliva v glavnem testosteron. Pri samcih, ki so zaradi spontane mutacije v genu za androgenski receptor neobčutljivi na testosteron (testikularna feminizacija samcev, Tfm; *angl.* testicular feminization mutation), so ta jedra manjša in bolj podobna jedrom samic (46, 47). Poleg testosterona verjetno vplivajo na razvoj

motoričnih jeder tudi estrogeni hormoni. Če so samicam podgane v obdobju po rojstvu dodali estradiol, ni prišlo do povečanja jeder z motoričnimi živci, medtem ko je v fetalnem obdobju estradiol imel ta učinek in jedra z motoričnimi živci maskuliniziral. Jedra so se še bolj povečala, če so samicam poleg estradiola dodali še testosteron (48).

2.3.2 Spolno različna področja v možganih

Predoptično področje je verjetno eno najbolj raziskanih spolno dimorfnih področij v možganih. Leži med sprednjo komisuro in križiščem optičnih živcev, v rostralno-ventralnem delu možganov. Medialni del predoptičnega področja (*angl*. Medial preoptic area, MPOA) ima pomembno vlogo pri uravnavanju razmnoževanja. Pri samcih uravnava kopulatorno obnašanje (49, 50), pri samicah pa materinsko obnašanje in lordozo ter sodeluje pri izločanju gonadotropinov (51, 52). Znotraj področja MPOA je področje gosto naseljenih in temno obarvanih celic, ki se zelo razlikuje med spoloma in so ga pri podganah poimenovali spolno dimorfno jedro predoptičnega področja (SDN-POA; *angl.* sexually dimorphic nucleus of the POA). Pri samcih podgane je SDN-POA dva in pol do petkrat večji kot pri samicah (53). To področje oziroma temu ustrezna jedra so bila opisana kot spolno dimorfna pri številnih vrstah vključno s človekom (3, 54, 55). Pri človeku so to jedro poimenovali intersticialno jedro sprednjega hipotalamusa (*angl.* interstitial nucleus of anterior hypothalamus 1; INAH 1) in pripada skupini intersticialnih jeder 2, 3 in 4 v predoptičnem področju (INAH 2, 3, 4). Jedro INAH 1 naj bi bilo večje in naj bi vsebovalo več celic pri moških kot pri ženskah (55, 56). Zanimivo je, da v tem področju z obarvanjem po Nisslu niso ugotovili spolnih razlik pri miših (57). Z drugimi tehnikami, kot je barvanje celic, ki izražajo androgenski receptor in kalbindin, so vseeno uspeli tudi pri miših določiti mejo, kjer naj bi ležalo podobno spolno dimorfno jedro kot pri podganah (58). Mehanizem nastanka razlik med spoloma v SDN-POA je dober primer organizacijskega učinka aromatiziranega testosterona. Dodajanje testosterona samicam v zgodnjem obdobju razvoja je maskuliniziralo to področje, vendar so imeli estrogeni hormoni še večji učinek kot sam testosteron (53, 59, 60). Pri samcih poškodbe SDN-POA niso povzročile večjih motenj v kopulatornem obnašanju (61, 62). Pri samicah je uničenje MPOA zavrlo materinsko obnašanje, medtem ko poškodbe manjšega SDN-POA niso povzročile večjih sprememb v materinskem obnašanju (63).

Tudi v hipotalamusu so spolno dimorfna področja. Eno izmed teh je ventromedialni del hipotalamusa (VMH), ki je pomemben pri uravnavanju razmnoževanja, predvsem

materinskega obnašanja in lordoze (51). Sprva so bile v VMH ugotovljene spolne razlike v velikosti jeder živčnih celic. Pri samicah podgane so imele celice večja jedra kot pri samcih. Nasprotno pa je celotna prostornina VMH pri samcih večja kot pri samicah. Odstranitev mod prvi dan po rojstvu povzroči feminizacijo tega področja in takšni samci po dodanih estrogenih hormonih in progesteronu pogosteje kažejo lordozo (64). V ventrolateralnem delu VMH tvorijo celice pri samcih več sinaps kot pri samicah. Fenotip je odvisen od izpostavljenosti hormonom med fetalnim razvojem. V dorzomedialnem delu VMH podobnih razlik niso našli (65).

Pri miših je bilo narejenih veliko raziskav, s katerimi so skušali razložiti spolne razlike v izraženosti arginin vazopresina v stranskem pretinu. Stranski pretin je sestavni del mreže živčnega sistema, ki sodeluje pri socialnem obnašanju (66). Gostota aksonov, ki vsebujejo arginin vazopresin je veliko večja pri samcih kot pri samicah, kar naj bi bilo pogojeno s spolnimi hormoni (67) kot tudi s prisotnostjo spolnih kromosomov XX ali XY (68).

Spolno dimorfna področja niso vedno večja pri samcih kot pri samicah. Anteroventralni del periventrikularnega jedra (AVPV) sestavlja manjša skupina celic, ki se nahaja na začetku razširitve tretje možganske kletke v predoptičnem področju. To področje uravnava ovulatorni ciklus in je pri samicah večje kot pri samcih (69). Spolne razlike so pogojene z izpostavljenostjo testosteronu v razvoju. Dodajanje testosterona pri samicah zmanjša število celic, medtem ko odstranitev mod pri samcih poveča število celic. Pri samicah ima to jedro tudi več celic, ki izražajo encim tirozinsko hidroksilazo, ki je pomemben pri proizvodnji dopamina (70). Nasprotno je pri samcih več celic, ki izražajo enkefalin (69).

Vohalni sitem je pri glodavcih izrednega pomena za izražanje številnih oblik obnašanja. Po zgradbi in delovanju se deli na glavni in pomožni vohalni sistem. Glavni vohalni sistem leži v nosni votlini, medtem ko pomožni vohalni sistem predstavlja vomeronazalni organ (VNO). Spolne razlike so našli v samem vohalnem sistemu kot tudi v področjih živčnega sistema, s katerimi se povezuje. V vomeronazalnem organu imajo samci podgane več bipolarnih celic kot samice. Te bipolarne celice imajo pri samicah večja jedra kot pri samcih (71). Bipolarne celice VNO se povezujejo s pomožnim vohalnim betičem, čigar celotna prostornina in število celic je pri samcih podgane večje kot pri samicah (72). Vohalni sistem se povezuje z velikim številom spolno dimorfnih področij živčnega sistema. Čutilne celice iz glavnega in pomožnega vohalnega sistema pošiljajo sporočila v

vohalne betiče, ki se naprej povezujejo z amigdalo, spodnjim jedrom končne strije, POA, AVPV in VMH (73).

Amigdala se nahaja pod rostralno-medialnim delom možganske skorje, rostralno od hipokampusa. Medialni del amigdale (MeA) je udeležen pri uravnavanju spolnega obnašanja, erekcije (74), lordoze, izločanju prolaktina in luteinizirajočega hormona (75), agresivnega obnašanja (76) in igre mladičev moškega spola (77). Celotna prostornina MeA je pri samcih večja kot pri samicah, predvsem na račun kavdo-dorzalnega dela. V temu delu imajo samci tudi večja telesa živčnih celic kot samice (78). V kavdo-ventralnem delu, v nasprotju s kavdo-dorzalnim delom, podobnih razlik niso našli. Pri miših linije C57BL/6J podobnih spolnih razlik v prostornini niso našli (3) Novejše raziskave pa poročajo o podobnih spolnih razlikah tudi pri miših, vendar pri liniji BALB/c (79). Najverjetneje na nastanek spolnih razlik v tem področju vplivata testosteron in estradiol, saj imajo samci podgan Tfm to področje feminizirano (3), pri samicah pa je to področje mogoče maskulinizirati z dodajanjem estradiola (80).

Spodnje jedro končne strije (*angl.* bed nucleus of stria terminalis, BNST) je še eno spolno različno področje, ki se vključuje v vohalni sistem. Snop vlaken (*angl.* stria terminalis) predstavlja eno glavnih povezav MeA s hipotalamusom in ostalimi bazalnimi deli sprednjih možganov. V jedru končne strije se končujejo povezave iz MeA. Celotna prostornina BNST se ne razlikuje med spoloma, medtem ko je njen medialno-kavdalni del pri samcih večji in ima tudi večje število celic kot pri samicah (81). Podobne razlike so našli tudi pri ljudeh (82). Nasprotne razlike med spoloma se vidne v lateralno-rostralnem in medialno-rostralnem delu, kjer imajo samice več živčnih celic kot samci (52).

2.4 Steroidogeni faktor 1

Steroidogeni faktor 1 (SF-1), uradno imenovan NR5A1, spada v družino jedrnih receptorjev, kamor uvrščamo tudi protein vinske mušice FTZ-F1 (*angl*. Fushi tarazu factor 1) in homolog jetrnega receptorja LRH-1 (*angl.* liver receptor homolog) pri vretenčarjih (83). Jedrni receptorji te skupine v celici delujejo kot prepisovalni dejavniki. Vežejo se kot monomeri na urejevalna mesta v molekuli deoksiribonukleinske kisline (DNK) in s tem urejajo številne procese med razvojem in v odraslem življenju organizma. Steroidogeni faktor 1 je bil prvotno odkrit kot urejevalec izražanja citokromov P450 hidroksilaz (83). Kasneje, z raziskovanjem miši brez gena za SF-1, pa so ugotovili, da je pomemben pri

delovanju celotne osi, ki povezuje hipotalamus, hipofizo in organe, ki proizvajajo steroidne hormone (84). Tudi pri ljudeh poročajo o različnih mutacijah gena za SF-1, ki so zelo redke. Povzročijo različne kombinacije motenj razvoja spolnih žlez, spremembo spola in motenega delovanja nadledvične žleze. Od vrste mutacije je odvisno, ali se razvijejo spolne žleze ali ne in ali je moteno tudi delovanje nadledvične žleze (85).

Do nedavnega je SF-1 spadal v skupino jedrnih receptorjev sirot (*angl.* orphan), za katere ni točno znano, ali je za njihovo delovanje potrebna vezava z neko drugo molekulo ali pa so v celici aktivni sami. Po novejših raziskavah naj bi se na SF-1 vezali fosfolipidi. Od dolžine njihovih stranskih verig iz maščobnih kislin je odvisno, ali bo SF-1 pospeševal ali zaviral izražanje genov (86).

2.4.1 Izražanje steroidogenega faktorja 1

Steroidogeni faktor 1 ima pomembno vlogo pri razvoju in delovanju endokrinega sistema in je nujno potreben pri spolni diferenciaciji zarodka. Pri mišjih zarodkih starih devet dni se SF-1 prvič pojavi v celicah urogenitalnega grebena, iz katerega se razvijejo spolne žleze, ledvici in skorja nadledvičnih žlez. Kasneje, vendar pred spolno diferenciacijo, se izražanje pri obeh spolih omeji na celice, ki se bodo razvile v skorjo nadledvičnih žlez in celice spolnega grebena (87).

Pri samicah ostane SF-1 izražen v spolnem grebenu do dneva 12,5 embrionalnega razvoja. Takrat se preneha izražati in razvoj spolnega grebena se nadaljuje v smeri razvoja jajčnikov. Raven izražanja se rahlo zviša pri plodovih v času pozne brejosti, ko se začne razvoj foliklov. Na nizki ravni ostane do pubertete (87). V jajčniku se raven izraženosti SF-1 ponovno zviša med zorenjem foliklov, v preantralni fazi. V celicah teke in granuloze folikla ureja izraženost genov pomembnih za steroidogenezo v jajčniku (17, 88).

Pri samcih ostane SF-1 izražen v spolnem grebenu tudi po dvanajstem dnevu in pol embrionalnega razvoja in usmerja razvoj spolnega grebena v razvoj mod. Po diferenciaciji je prisoten v leydigovih celicah, ki izločajo androgene hormone, in v sertolijevih celicah, ki izločajo antimüllerjev hormon (87, 89). V sertolijevih celicah najverjetneje ureja izraženost gena za antimüllerjev hormon (90) in morda tudi gena za aromatazo, ki naj bi jo sertolijeve celice izražale pred puberteto (91). V odraslem obdobju ostane izražen v leydigovih celicah (17).

V nevralni plošči se SF-1 začne izražati deveti dan in kasneje v diencefalonu 11. dan embrionalnega razvoja. V diencefalonu ostane izražen do rojstva (87). V odraslih možganih je izražanje SF-1 omejeno le na ventromedialni del hipotalamusa (VMH) (87). Pri obeh spolih ostane SF-1 izražen v odraslem obdobju tudi v celicah skorje nadledvičnih žlez in tudi v nekaterih nesteroidogenih tkivih, kot so: adenohipofiza (92), vranica, posteljica, kostni mozeg in prebavna cev (93, 94). Poleg številnih steroidogenih encimov uravnava SF-1 v adenohipofizi izražanje gena za receptor gonadotropin sproščujočega hormona (GnRH) in genov, ki nosijo zapis za različne podenote nesteroidnih hormonov luteinizirajočega hormona (LH) in folikel stimulirajočega hormona (FSH) (95, 96, 97). Tudi pri človeku je v embrionalnem obdobju vzorec izražanja SF-1 podoben kot pri zarodku miši (88).

2.4.2 Miši brez gena za steroidogeni faktor 1

Miši brez gena za SF-1 (*angl.* SF-1 knockout mouse, SF-1KO) se rodijo brez nadledvičnih in spolnih žlez. Zaradi pomanjkanja mineralokortikoidov poginejo v 12 urah oziroma najkasneje v osmih dneh po rojstvu (17). Razvoj spolnega grebena pri teh miših poteka normalno do desetega dneva in pol po oploditvi. Po tem času začnejo celice propadati v procesu apoptoze ali uravnavane celične smrti. Vsi zametki spolnih in nadledvičnih žlez propadejo do dvanajstega dneva in pol po oploditvi. Vse miši SF-1KO so fenotipsko samice. Ne glede na to ali imajo prisotna spolna kromosoma XY (genetsko samec) ali XX (genetsko samica), imajo v trebušni votlini razvito maternico, jajcevode in zunanje ženske spolne organe (23, 92).

Gonadotropne celice adenohipofize pri novorojenih miših SF-1KO ne izražajo LH, FSH in receptorjev za GnRH (17, 92), medtem ko ostali del adenohipofize normalno izraža rastni hormon, prolaktin, ščitnico stimulirajoči hormon (TSH) in adrenokortikotropni hormon (ACTH) (92). Količina pro-opiomelanokortina (POMC), predhodnika ACTH, je pri miših SF-1KO v krvi do trikrat višja. To je razumljivo, saj zaradi nerazvite nadledvične žleze in s tem pomanjkanja glukokortikoidov ne deluje povratna zanka, ki bi zavirala nastajanje in izločanje ACTH. Glede na to, da gonadotropne celice adenohipofize ne izražajo LH in FSH, bi pričakovali, da bo izločanja GnRH povečano zaradi nedelujoče povratne zanke. Dinamika izražanja in izločanja GnRH, LH in FSH pri miših SF-1KO še ni popolnoma pojasnjena. Dokazali so, da so živčne celice, ki izločajo GnRH normalno prisotne v hipotalamusu (98) in da je GnRH tam normalno izražen. Tudi njegovo izločanje v področju

središčne štrline hipotalamusa naj bi bilo normalno (17). Tudi izražanje LH in FSH v hipofizi miši SF-1KO so uspeli vzpostaviti po dodajanju GnRH (98). S tehniko presaditve nadledvične žleze je miši SF-1KO mogoče proučevati tudi v odraslem obdobju (99). Najnovejši rezultati nakazujejo, da je celo pri odraslih miših SF-1KO (brez dodanih spolnih hormonov) FSH, ne pa tudi LH, izražen v hipofizi (Büdefeld, neobjavljeno).

Z metodo *in-situ* hibridizacije so ugotovili, da je SF-1 izražen v celicah centralnega in dorzomedialnega dela VMH (92). Pri miših SF-1KO je zgradba VMH popolnoma spremenjena. Spremembe so še posebej vidne v dorzomedialnem delu, kjer celice manjkajo. Sprva so mislili, da celice manjkajo, ker so propadle v procesu apoptoze. Kasnejše raziskave so pokazale, da predhodniki celic sicer potujejo v smeri VMH, vendar ne uspejo pripotovati na pravo mesto. Ugotovili so, da se izgubijo med 18. dnevom fetalnega razvoja in prvim dnevom po rojstvu (98, 100, 101). Ugotovili so, da je pri novorojenih miših SF-1KO večina celic, ki izražajo različne proteine, v VMH prisotnih, vendar je spremenjena njihova razporeditev. Razporeditev živčnih vlaken v VMH je bila pri miših SF-1KO podobna kot pri miših brez spremenjenega genotipa, zato je SF-1 najverjetneje potreben za normalno razporeditev teles živčnih celic ne pa tudi živčnih vlaken (102). Tudi v dorzomedialnem jedru hipotalamusa so vidne manjše spremembe, čeprav v tem delu SF-1 ni izražen. Te spremembe so najverjetneje nastale sekundarno, saj VMH tvori številne povezave z dorzomedialnim jedrom hipotalamusa. Ostala jedra z barvanjem možganov po Nisslu niso vidno spremenjena (98, 102).

Ventromedialno področje hipotalamusa je izredno pomembno pri uravnavanju procesov homeostaze v telesu. Poleg uravnavanja hranjenja sodeluje tudi pri izražanju drugih vzorcev obnašanja, kot so: gibanje, spolno, socialno in starševsko obnašanje (18, 103). Z injiciranjem kortikosteroidov in presaditvijo nadledvične žleze je možno miši SF-1KO raziskovati tudi v odraslem obdobju (99). Raziskave so pokazale, da miši SF-1KO postanejo v odraslem obdobju skoraj dvakrat težje kot kontrolne živali. Ugotovili so, da pozna debelost pri miših SF-1KO ni posledica večjega vnosa hrane, saj so pojedle podobno količino hrane kot miši brez spremenjenega genotipa. Nasprotno pa so pri merjenju spontane aktivnosti na kolesu ugotovili, da je ta pri miših SF-1KO močno zmanjšana, kar posledično pomeni povečanje telesne mase. Eden glavnih hormonov, ki uravnava vnos in porabo energije, je hormon leptin. Nastaja v celicah bele tolšče in je običajno povišan pri prekomerni masi ljudi in živali. V skladu s povečano količino bele tolšče je pri miših

SF-1KO povišana tudi količina leptina v krvi. Prav tako je bila povišana tudi količina inzulina, čeprav je bila količina glukoze v krvi normalna (99). Omenjene spremembe v krvi bi lahko nastale sekundarno zaradi debelosti. Primarni vzroki za debelost pri miših SF-1KO pa bi lahko bili: spremenjena struktura VMH, spremenjeno izražanje bioloških molekul, delovanje in povezava VMH z drugimi področji v možganih. Tako imajo miši SF-1KO spremenjeno izražanje gena *Tubby* (99), čigar mutacije so že v preteklosti povezali z debelostjo (104), spremenjeno izražanje proteinov, ki uravnavajo hranjenje: agutiju podoben protein (*angl.* agouti related peptide, AgRP), nevropeptid Y (*angl.* nevropeptide Y, NPY) in presnovni peptid povezan s kokainom in z amfetaminom (*angl.* cocaine and amphetamine related trascript, CART) (105) ter zmanjšano število nevronov v ventrolateralnem delu VMH (106).

2.5 Obnašanje

2.5.1 Splošno o proučevanju obnašanja

Prve sistematične raziskave obnašanja živali so se začele pred približno 100 leti z Darwinovim proučevanjem obnašanja ptičev na Galapaških otokih. Pomembne izsledke v zvezi z obnašanjem živali so ugotovili von Frish, Lorenz in Tinbergen, ki so leta 1973 za svoje delo dobili Nobelovo nagrado. Čeprav so proučevali različne pojave na področju obnašanja predvsem v naravi, se danes velik delež teh raziskav opravi tudi v laboratorijih. Na obnašanje živali ali človeka vplivajo številni zunanji in notranji dejavniki. Iz tega vidika je proučevanje v laboratorijih bolj natančno, saj pogoje opazovanja lahko veliko bolj nadzorujemo kot v naravi. Vendar se prav zaradi laboratorijskih pogojev nekateri naravni vzorci obnašanja lahko izražajo drugače ali celo izginejo. Ker je obnašanje zelo kompleksen pojav, je pri raziskovanju potreben interdisciplinaren pristop. V raziskave obnašanja se zato vedno bolj vključujejo različne znanosti, kot so: genetika, biokemija, farmakologija, anatomija, fiziologija, okoljske znanosti, pri človeku pa še družboslovno-humanistične znanosti, kot so sociologija, filozofija in psihologija.

Raziskave obnašanja proučujejo probleme na treh različnih ravneh, ki jih v teoriji lahko ločimo, v praksi pa se med seboj povezujejo in prekrivajo. S trenutkom, ko začnemo opazovati obnašanje, vključimo (opazujemo) en del aktivnosti in izključimo drugi del aktivnosti organizma. Če na primer opazujemo usločenje hrbta živali med parjenjem, bomo mogoče v istem trenutku izključili oglašanje med parjenjem. Pomembno je, katere

aktivnosti opazujemo in katere bomo zanemarili. Prva raven proučevanja je vzorčna analiza, pri kateri želimo opazovane aktivnosti opredeliti in ugotoviti, kako si sledijo ter kako so med seboj vzročno povezane. Vzrok in posledica se velikokrat lahko prepletata. Aktivnost, ki jo izvaja organizem, vpliva na njega samega in na njegovo okolje. Aktivnost torej lahko postane vzrok za spremembo obnašanja. Tako na primer s ponavljanjem poskusov spolnega obnašanja žival vedno bolje usloči hrbet in s tem omogoči boljše parjenje. Druga pomembna raven, ki se tesno navezuje z vzročno analizo, je razvoj ali ontogenija obnašanja. Ugotoviti želimo, kako se obnašanje spreminja s časom, z razvojem oziroma odraščanjem organizma in kako deluje nanj okolje. Tu se moramo zavedati, da je obnašanje dinamičen proces in da so aktivnosti lahko bolj ali manj reverzibilne ali ireverzibilne in zelo odvisne od dolžine obdobja, v katerem jih opazujemo. Tretja pomembna raven proučevanja obnašanja je ugotavljanje/raziskovanje pomena obnašanja in njegova vloga v naravni selekciji. Tu želimo ugotoviti, kako so nastale razlike v obnašanju med vrstami in katere oblike obnašanja so pripomogle k boljšemu preživetju in razmnoževanju vrste (107).

Če želimo raziskovati obnašanje, ga moramo definirati. Na splošno si obnašanje predstavljamo kot spremembe organizma, ki jih zaznamo in opišemo. Ker so mišice največkrat tisti organ, ki povzroča to spreminjanje, obnašanje največkrat opisujemo kot koordinirano gibanje. Opis gibanja oziroma obnašanja lahko opredelimo kot krčenje samo določenih mišic, na primer dvig repa ali usločenje hrbta, ali kot opis določene aktivnosti: prinašanje mladičev, ovohavanje itd. Opis aktivnosti je bolj kompleksen in zajema hkrati delovanje več vrst mišic, žlez ali spremembo kakšnega drugega fiziološkega parametra (107). Glede na pomen lahko obnašanje razdelimo v različne kategorije: spolno, socialno, starševsko, teritorialno itd. Če proučujemo pomen posameznih organskih sistemov, lahko razdelimo obnašanje na: gibalno, čutno, prehranjevalno, izločevalno, razmnoževalno itd. (108). Pri živalih in človeku lahko proučujemo tudi procese, ki zahtevajo višjo organizacijo živčnega sistema in so najbolj razviti pri primatih in človeku. Sem spadajo tri velike skupine procesov: miselni, čustveni in motivacijski procesi. Vse tri skupine so med seboj tesno povezane in vplivajo ena na drugo. Čustveni procesi se raziskujejo na različnih modelih miši, ki bolj intenzivno kažejo obnašanja podobna simptomom duševnih motenj pri ljudeh, kot so: anksioznost, avtizem, shizofrenija (109). Med miselnimi procesi se pri živalih največkrat proučujeta spomin in učenje (110). Pri proučevanju motivacijskih procesov gre predvsem za proučevanje sistema v možganih, ki mu pravimo tudi sistem za

nagrajevanje. Motivacijski procesi usmerjajo in spodbujajo določeno obnašanje. Eden glavnih nevrotransmiterjev, ki uravnava motivacijske procese, je dopamin. Sistem je vključen v obnašanja, kot so hranjenje, pitje, spolno obnašanje pa tudi v obnašanja, ki so povezana z različnimi motnjami, kot na primer odvisnost od drog in alkohola pri ljudeh (111). Raziskave na področju miselnih, motivacijskih in čustvenih procesov želijo te procese razložiti na ravni delovanja možganov in nevrotransmiterjev, kar je osnova za farmakološke raziskave na tem področju.

2.5.2 Proučevanje obnašanja miši

2.5.2.1 Vpliv splošnega zdravstvenega stanja na obnašanje miši

Če želimo opazovati obnašanje miši, se moramo na začetku seznaniti z njenim splošnim zdravstvenim stanjem in izgledom. Še posebno pri miših s spremenjenim genotipom lahko pride do motnje v delovanju kateregakoli organskega sistema. To lahko omeji ali celo onemogoči miši, da bi opravila določen poskus. Zaradi motnje lahko dobimo napačno negativen kot tudi napačno pozitiven rezultat. Pri oceni splošnega zdravstvenega stanja in delovanja posameznih organskih sistemov je pomemben videz živali, telesna masa, hranjenje, pitje, izločanje, drža telesa, vzorci gibanja, normalno in nenormalno spontano obnašanje ter nevrološki refleksi (112).

2.5.2.2 Vloga gibalnega sistema pri proučevanju obnašanja miši

Skoraj vsako izvajanje obnašanja zahteva gibanje. Za normalno gibanje je pomembna usklajenost delovanja kosti, mišic in tudi živčevja. Če so gibalne funkcije živali okrnjene, bo težko prišla do hrane, ne bo imela normalnih stikov z vrstniki in bo nezmožna opraviti poskus, ki zahteva intenzivno gibanje npr. plavanje. Pri nekaterih modelih miši za ataksijo, degenerativnih bolezni živčevja, z motnjami v delovanju malih možganov, hrbtenjače ali ravnotežnega sistema so motnje gibalnega sistema pričakovane in so tudi poskusi temu prilagojeni. Najbolj standardiziran poskus gibalnega sistema je poskus spontane aktivnosti v odprtem polju. Miši se opazuje v okroglih ali pravokotnih prostorih, različnih velikosti – od 40 x 40 cm pa do enega kvadratnega metra. Pri večjih poljih so rezultati uporabni tudi za oceno stanj podobnih tesnobi. Ostali poskusi, v katerih ugotavljamo stanje gibalnega sistema, so še: tekoči krožni trak, poskus ravnotežja, visenja na rešetkah, vrtenje kolesa in odtis vzorca hoje. Že med samo nastanitvijo miši se lahko pojavijo pomembne

motnje telesne drže ali različne oblike stereotipij, ki prav tako lahko vplivajo na rezultate opazovanj (113).

2.5.2.3 Čutilni sistem pri miših

Vid, sluh, voh, okus in tip predstavljajo pet čutov, ki so razviti tudi pri miših. Čutilo za vonj je pri glodavcih najbolj razvito in ga zato omenjamo v posebnem poglavju o vohalnem sistemu. Vid je pri glodavcih razvit relativno dobro, vendar je v primerjavi z vidom večine ptic ali človeka precej slabši. Sluh je pri glodavcih zelo dobro razvit. Miši slišijo tudi zvočne frekvence, ki jih človeško uho ne zaznava. Ultrazvočno sporazumevanje preko visoko frekvenčnih zvokov ima velik pomen pri starševskem, socialnem in spolnem obnašanju (114).

Glodavci, tako kot ljudje, okušajo sladko, slano, kislo in grenko. Razlikovanje okusa je zelo pomembno pri ugotavljanju, ali je hrana, ki jo uživajo, varna ali ne. Miši se raje hranijo s hrano, ki jo poznajo, kot pa s hrano, ki je ne poznajo. Temu pojavu pravimo tudi strah pred novo hrano (*angl.* food neophobia). Že z opazovanjem hranjenja vrstnikov, ovohavanjem in negovanjem brkov vrstnikov dobi miš ustrezne informacije o kakovosti hrane, s katero se hrani cela kolonija. Največji tipalni organ pri miši so brki. Posebni deli skorje možganov so odgovorni za predelavo dražljajev, ki jih dobivajo od vsake brčice posebej. Miš se zato zelo hitro odzove že na majhno spremembo v gibanju zraka, ki jo zaznavajo brki (114).

2.5.2.4 Proučevanje delovanja vohalnega sistema pri miših

Čutilo za vonj je najbolj razvito čutilo pri glodavcih. Preko čutila za vonj dobivajo sporočila iz okolja in jim omogoča celo vrsto aktivnosti od iskanja hrane, prepoznavanja vrstnikov, uspešne vzreje mladičev, do prepoznavanja in obrambe pred plenilci. Feromoni spadajo med najpomembnejše snovi, ki preko vohalnega sistema uravnavajo te vzorce obnašanja. To so različne kemične snovi, ki jih živali izločajo v okolje. Teoretično lahko feromone izloča katerikoli del telesa, vendar feromone največkrat omenjamo, ko gre za zaznavanje vonja urina, včasih tudi iztrebkov, sline in nekaterih drugih žlez (115). Pri glodavcih so feromoni izredno pomembni za spolno, socialno, agresivno in starševsko obnašanje. Zaznavanje vonjev omogoča pri spolnem obnašanju ustrezno izbiro partnerjev, kar imenujemo tudi socialna privlačnost ali preferenca (116).

Vohalni sistem je sestavljen iz vohalne sluznice in dela možganov, kjer ležita vohalna betiča. Pri številnih kopenskih vretenčarjih, kot tudi pri glodavcih, je celotni vohalni sistem organiziran v dva vzporedna sistema, glavnega in pomožnega, ki se razlikujeta tako v morfologiji kot tudi v delovanju. Glavni vohalni sistem sestavljata vohalni epitelij v nosni sluznici in glavni del vohalnega betiča. Pomožni vohalni sistem je sestavljen iz vomeronazalnega organa (VNO), kjer je vohalni epitelij drugače organiziran kot v nosni votlini in iz pomožnega vohalnega betiča (116, 117). Bipolarne živčne celice v nosni sluznici zaznavajo predvsem hlapne vonjave, ki lahko izvirajo iz feromonov (npr. urin) ali iz ne-feromonskih snovi iz okolja (npr. hrana). Ko se vzdražijo, dražljaj potuje po možganskem živcu (*n. olfactorius*) do glavnega vohalnega betiča in v druge predele možganov. Vomeronazalni organ zaznava predvsem nehlapne vonjave različnih feromonov iz urina in izločkov zunanjih solznih žlez. Izjemoma zaznava tudi nekatere hlapne snovi in nehlapne proteine, ki služijo za vezavo molekul MHC razreda I (*angl.* major histocompatibility complex class I molecules). Snovi, ki jih VNO zaznava, se raztopijo v izločku nosne sluznice in se aktivno črpajo v lumen VNO, kjer se vežejo na receptorje, sklopljene z beljakovino G, in s tem sprožijo nastanek akcijskega potenciala (117). Dražljaji iz VNO potujejo po vomeronazalnih živcih v pomožni vohalni betič, ki se naprej povezuje z različnimi področji možganov, predvsem z deli limbičnega sistema, kot so: amigdala, hipotalamus in jedro končne strije ter z drugimi področji možganov. Vomeronazalni organ je pri glodavcih zelo dobro razvit, medtem ko je pri nekaterih živalskih vrstah (primati, morski sesalci in človek) zakrnel ali ga sploh ni (118).

Čeprav največkrat opisujejo VNO kot spolno različen del vohalnega sistema, to še ne pomeni, da samo VNO uravnava spolno različna obnašanja. Za zdaj velja, da pri uravnavanju socialnega prepoznavanja, izbire spolnih partnerjev in izražanja spolnega obnašanja sodeluje celoten vohalni sistem, tudi vohalna sluznica v nosni votlini (117). Halem in sod. (119) so ugotavljali, kako se področja VNO aktivirajo glede na spol živali, vrsto vonja in v odvisnosti od spolnih hormonov. V raziskavi so imeli tri skupine miši: samce in samice, ki so jim dodali estradiol bezoat in progesteron in samce, ki so jim dodali testosteron propionat. Vse tri skupine so izpostavili vonju samcev ali vonju samic. Na splošno je vonj samcev pri obeh spolih aktiviral bolj bazalni del VNO, medtem ko je vonj samic aktiviral oba, bazalni in apikalni del VNO. Bazalni del je po izpostavljenosti vonju samcev kazal večjo aktivnost pri samicah, ki so jim dodali estradiol benzoat in progesteron kot pri samcih, ne glede na vrsto dodanega hormona (estradiol benzoat in progesteron ali

testosteron propionat). Nasprotno se je po izpostavitvi vonju samic najbolj aktiviral VNO samcev, ki so jim dodali testosteron propionat. Različni deli pomožnega vohalnega betiča so se prav tako različno odzvali glede na vonj, hormonsko stanje in spol miši, vendar te razlike niso bile tako očitne kot v samem VNO (119). Pri miših in podganah so v različnih področjih živčnega epitelija VNO odkrili dve veliki družini feromonskih receptorjev, imenovanih V1Rs in V2Rs. Z mutacijami različnih genov, ki nosijo zapise za te receptorje ali druge proteine, ki so pomembni za zaznavanje vonja, so danes na voljo različne gensko spremenjene miši. Te miši kažejo različne motnje v kakovosti in intenzivnosti obnašanja (117, 120). Verjetno so najzanimivejše odkritje miši brez gena, ki nosi zapis za kationski kanal TRPc2. Gen je izražen samo v VNO in je pomemben pri prenosu živčnega dražljaja. Miši brez TRPc2 v poskusih različnih vzorcev obnašanja (agresivno, spolno, označevanje z urinom, ultrazvočno oglašanje) ne razlikujejo samcev od samic (121). Sposobnost razlikovanja vonjev lahko proučujemo tudi z bolj usmerjenimi vohalnimi poskusi, kot sta labirint Y in poskus socialnega prepoznavanja (izbira lončkov z nastilom različnih vonjev). Z ovohavanjem nastila v lončkih žival lahko pride v stik z nehlapnimi snovmi, ki izzovejo ustrezni dražljaj, zato s tem poskusom ugotavljamo predvsem delovanje pomožnega vohalnega sistema. V labirintu Y do živali prihajajo le hlapne vonjave po zraku in je poskus uporaben predvsem za ugotavljanje delovanja glavnega vohalnega sistema (116).

Tako kot na ostale vzorce obnašanja, tudi na razlikovanje vonjev vplivajo spolni hormoni med fetalnim razvojem in zgodaj po rojstvu. Na splošno samci raje ovohavajo vonj samic, medtem ko samice raje ovohavajo vonj samcev (116). Samci miši brez gena za estrogenski receptor α (ERαKO) ne razlikujejo vonja samic od vonja samcev oziroma ne kažejo privlačnosti do vonja samic. Prav tako je skupni čas ovohavanja krajši kot pri samcih divjega tipa (*angl.* wild type, WT). Samo zaznavanje vonja ni bilo prizadeto, saj so se tako pri ERαKO kot pri samcih WT aktivirala področja v VNO in v glavnem vohalnem sistemu. Po izpostavitvi vonju samice se je dvignila tudi raven luteinizirajočega hormona v krvi, kar še dodatno dokazuje, da so samci ERαKO vonj zaznali. Po dodanem apomorfinu agonistu dopamina se je ponovno vzpostavila privlačnost do vonja samic. Vse to dokazuje, da ERα ni neposredno potreben za samo zaznavanje vonja, ampak da njegovo pomanjkanje verjetno vpliva na druge procese (motivacija), ki sodelujejo pri uravnavanju vohalnega obnašanja (122, 123). Tudi samci brez gena za encim aromatazo (ArKO) v labirintu Y ne kažejo privlačnosti do vonja samic. Skupen čas ovohavanja je prav tako krajši v primerjavi s samci WT. Kljub nezmožnosti socialnega razlikovanja v labirintu Y pa samci ArKO

kažejo privlačnost do samic v poskusu z lončki z nastilom različnih vonjev, kar nakazuje, da delovanje VNO ni prizadeto (124). Po dodajanju estradiol benzoata pri samcih ArKO niso uspeli vzpodbuditi ustreznega obnašanja v labirintu Y. To pomeni, da je verjetno za popolno delovanje glavnega vohalnega sistema pri samcih pomembna izpostavitev estrogenim hormonom med fetalnim razvojem (116). Čeprav imajo samice ArKO po odstranitvi jajčnikov in dodajanju testosterona skupen čas ovohavanja v labirintu Y krajši od samic WT, pa vseeno kažejo privlačnost do vonja samic tako v labirintu Y kot tudi v poskusu z različnim nastilom. To pomeni, da pri samicah za ustrezno razlikovanje vonjev ni potreben estradiol v času fetalnega razvoja (125). Tudi androgenski receptor vpliva na delovanje vohalnega sistema. Samci z neobčutljivostjo androgenskega receptorja (*angl.* testicular feminization mutation, Tfm) kažejo obratno socialno privlačnost kot samci WT. Obnašajo se kot samice WT in ovohavajo dlje časa vonj samcev kot vonj samic. Treba je poudariti, da so samcem Tfm predhodno odstranili moda in jim dodali estradiol benzoat, saj testosteron ne more delovati preko mutiranih androgenskih receptorjev. Očitno je, da je delovanje testosterona preko androgenskih receptorjev pomembno za normalno socialno razlikovanje pri samcih. Obratno socialno privlačnost so ugotovili tudi pri samicah WT, ki so jim prvi dan po rojstvu dodali dihidrotestosteron, ki prav tako deluje preko androgenskih receptorjev. Take samice so ovohavale vonj samic dlje od vonja samcev (126). Spolni hormoni, kot je estradiol, med razvojem vplivajo na delovanje vohalnega sistema, vendar pomanjkanje estradiola v tem obdobju očitno ne spremeni vohalnega sistema v celoti. Miši ArKO kažejo delno socialno prepoznavanje in tudi pri samcih ERαKO se po dodajanju apomorfina socialna privlačnost do samic ponovno vzpostavi. To dokazuje, da je verjetno bolj prizadet živčni sistem odgovoren za motivacijo kot pa samo zaznavanje vonja. Težko je točno opredeliti, v katerih delih živčnega sistema pride do sprememb zaradi pomanjkanja spolnih hormonov med fetalnim razvojem, saj se vohalni sistem povezuje s številnimi področji v možganih. Poleg tega je pri modelih miši ERαKO in Tfm nemogoče ločiti, ali motnje v delovanju nastanejo zaradi motenj v razvoju ali v odraslem obdobju, saj so mutirani receptorji prisotni skozi vse življenje.

2.5.3 Izražanje različnih kategorij obnašanja pri miših

2.5.3.1 Spolno obnašanje

Pri laboratorijski miši se začetek pubertete, spolni ciklus, uspešnost parjenja, dolžina brejosti in velikost gnezda razlikujejo med različnimi linijami miši (127). Pri samicah se začne puberteta okoli 15. do 20. dneva in se konča z odprtjem nožnice okoli 35. dneva starosti. Pri samcih se začne puberteta okoli 25. do 30. dneva in se konča med 50. in 60. dnevom (128). Pri samici se spolni ciklus ponavlja ciklično, vsake štiri do šest dni, in brejost traja od 18 do 22 dni (127).

Estrogeni, gestageni in androgeni hormoni so steroidni hormoni, ki se izločajo iz spolnih žlez. So lipofilni in prehajajo skozi krvno možgansko prepreko v možgane, kjer vplivajo na njihovo delovanje. Spolno različna področja možganov: predoptično področje, arkvatno jedro, spodnje jedro končne strije, ventromedialno in paraventrikularno jedro hipotalamusa so še posebej bogata z receptorji za steroidne hormone. Ta področja so izrednega pomena za vzorce obnašanja, ki se razlikujejo med spoloma in omogočajo uspešno spolno obnašanje ter v širšem pomenu uspešno razmnoževanje (127).

2.5.3.1.1 Moško spolno obnašanje

Moško spolno obnašanje lahko razdelimo na fazo dvorjenja ali fazo pred kopulacijo (prekopulatorno) ter fazo paritve ali kopulatorno fazo. Za dvorjenje je značilna močna motivacija priti do spolnega partnerja, samice. Med dvorjenjem samci intenzivno iščejo samice in na različne načine tekmujejo z ostalimi samci. Za to fazo je pri glodavcih značilno ultrazvočno oglašanje, označevanje z uriniranjem in močna privlačnost do vonjev, ki jih izločajo samice. V naslednji fazi paritve pride do kopulacije. Med kopulacijo se pri podgani in miši pojavljajo trije vzorci obnašanja: vzpenjanje (naskok), vstop penisa v nožnico, potiski in ejakulacija (36, 118). Samec samico pred vzpenjanjem neguje in jo ovohava okoli analnega in genitalnega področja (127). Čas, ki poteče do začetka vzpenjanja, nam pove, kako močna je motivacija samca, da začne akt parjenja. Neizkušeni samci se lahko na začetku vzpenjajo napačno, na boku ali pri glavi samice. Neuspešno vzpenjanje je lahko posledica tudi zmanjšane motivacije. Ko se samec uspešno vzpne na samico, začne s potiskanjem medenice in s penisom vstopi v nožnico. Pri miših in podganah pride do ejakulacije šele po večkratnih naskokih in vstopih penisa v nožnico. Po ejakulaciji ostane v nožnici samice prisoten čepek (plug), ki pri nekaterih glodavcih

aktivno preprečuje kopulacijo drugim samcem. Ejakulacijo spremlja spazmično krčenje različnih mišic na telesu, posebej na zadnjih nogah, ledvenem delu, mišic področja ob zadnjiku, sednično-prisilne mišice (*m. ischiocavernosus*), čebulno-brecilne mišice (*m. bulbospongiosusa*) in zapiralke zadnjika (*m. sfincter ani*). Obnašanje po ejakulaciji spremljajo povečano čiščenje genitalnega področja in neaktivnost (118, 129).

Prisotnost moškega spolnega obnašanja je odvisna od spolnih hormonov testosterona, dihidrotestosterona in estradiola, ki delujejo centralno na živčni sistem in periferno, predvsem na moške spolne organe. Dihidrotestosteron je nearomatizirajoči, medtem ko je testosteron aromatizirajoči androgeni hormon. V možganih se testosteron lahko pod vplivom encima aromataze spremeni v estradiol, ki v nadaljevanju lahko vpliva na moško spolno obnašanje (118). Mišja moda izločajo predvsem testosteron in tudi dihidrotestosteron (127). Večino časa imajo samci nizko, osnovno koncentracijo testosterona v krvi okoli 1 ng/mL, ki se z vmesnimi pulzativnimi izločanji poviša tudi do 15-krat. Pulzativno izločanje lahko nastane spontano, nekajkrat na dan, ali pa refleksivno, ob različnih zunanjih dražljajih. Tako lahko ob prisotnosti samice refleksno izločanje testosterona v zelo kratkem času vzpodbudi vzorce moškega spolnega obnašanja (130). Vzorce spolnega obnašanja lahko vzpodbudi neposredno ali posredno preko spodbujanja ali zaviranja drugih procesov, kot so: motivacija, učenje, tesnoba, občutljivost na bolečino (131). Različne linije miši se razlikujejo v izražanju moškega spolnega obnašanja. Pri večini linij se po odstranitvi mod spolno obnašanje popolnoma prekine, z izjemo miši B6D2F1 (iz linije C57BL/6J in DBA/2J). Ta linija še leto po odstranitvi mod brez prisotnosti hormonov kaže normalno spolno obnašanje, vključno z ejakulacijo (132). Prekopulatorno obnašanje: ultrazvočno oglašanje, označevanje z uriniranjem in privlačnost do vonja samic, je pri samcih s predhodno odstranjenimi modi (skoraj vseh linij) mogoče povrniti z dodajanjem testosterona. Dihidrotestosteron in estradiol nista tako učinkovita. Podobno velja tudi za kopulatorno obnašanje. Vzpenjanje in vstope penisa v nožnico so pri samcih po odstranitvi mod uspeli povrniti s testosteronom, medtem ko pri določenih linijah testosteron ni uspel povrniti sposobnosti ejakulatornega refleksa (36).

Predoptično področje (POA), posebej njegov medialni del (MPOA), je najpomembnejše področje v možganih, ki uravnava spolno obnašanje samcev. Poškodbe POA prekinejo izražanje moških oblik spolnega obnašanja (49, 50). Raziskave so pokazale, da ima v tem področju dopamin pomembno vlogo pri uravnavanju moškega spolnega obnašanja.

Podganjim samcem s poškodovanim POA se je po dodajanju lisurida, ki po delovanju kemično posnema dopamin, spolno obnašanje povrnilo (133). V drugi raziskavi so pokazali, da tudi okolje lahko dramatično vpliva na spolno obnašanje po poškodbah MPOA. Če so samci podgane s poškodovanim področjem MPOA pred puberteto živeli v skupinah, so kazali v odraslem obdobju nemoteno kopulacijo. Skupina izoliranih samcev, z enakimi poškodbami, pa v odraslem obdobju ni bila sposobna kopulacije (134). Po odstranitvi mod podganjim samcem so testosteronski vsadki, vstavljeni v MPOA, popolnoma povrnili moško spolno obnašanje. Če so istim samcem poleg testosterona dodajali še zaviralce aromatizacije testosterona, se je intenzivnost spolnega obnašanja zmanjšala. Moško spolno obnašanje so povrnili tudi z vsadki z estrogenimi hormoni, ob istočasnem dodajanju dihidrotestosterona. Očitno je, da pri podganah poleg testosterona tudi estradiol uravnava v tem področju moško spolno obnašanje (118). Z razliko od podgan se je pri samcih miši (linije C57BL/6J X ARK/J) po odstranitvi mod z vsadkom testosterona ali estradiol benzoata v MPOA ponovno vzpostavilo le prekopulatorno obnašanje. Za kopulatorno obnašanje pa se je izkazalo, da testosteron v MPOA povrne le vzpenjanje na samice ne pa tudi vstopov penisa v nožnico in ejakulacije (135, 136). Tudi ostala področja možganov sodelujejo pri uravnavanju moškega spolnega obnašanja. Po parjenju je bil protein C-FOS, ki je pokazatelj aktivnosti živčnih celic, izražen poleg MPOA tudi v delu amigdale, delu jedra končne strije in delu talamusa (137). Vsadki z različnimi hormoni (testosteron in estradiol benzoat) so delno delovali tudi na medialni pretin, rostralni in ventromedialni del hipotalamusa, amigdalo in področje ventralnega dela krova srednjih možganov. Hormoni v vsadkih, vstavljenih v ta področja, so vzpodbudili le nekatere vzorce prekopulatornega obnašanja ne pa tudi kopulatornega obnašanja (135, 136). Očitno tudi ta področja sodelujejo pri uravnavanju moškega spolnega obnašanja, vendar pri kopulatornem obnašanju niso tako pomembna kot področje POA.

Pri razlagi rezultatov raziskovanj spolnega obnašanja v laboratorijih je potrebna pazljivost. Pogoji, v katerih opazovalec proučuje parjenje, so drugačni in največkrat veliko revnejši od pogojev v naravi. V bogatejšem okolju in ob prisotnosti večjega števila samic se podganji samci obnašajo drugače. V laboratorijskih poskusih, kjer so delno posnemali pogoje v naravi, je bil ritem parjenja veliko počasnejši in so ga narekovale samice. Kadar so opazovali parjenje v manjših kletkah, so ritem parjenja narekovali samci (118, 138). Izbira samice lahko prav tako vpliva na moško spolno obnašanje. Pri podganah in nekaterih ostalih vrstah je znan Coolidgov učinek, ko se ob prisotnosti nove samice izboljša spolno

obnašanje samca (118). Tudi hormonsko stanje samice lahko različno intenzivno spodbudi spolno obnašanje samca. V raziskavi Perkins in sod. (139) so primerjali podganje samce s poškodovanim kortikomedialnim delom amigdale in podganje samce brez poškodb. Ko so jim v kletke dodali samice, katerim so dodali samo estrogene hormone, so se samci s poškodbami amigdale odzvali kasneje kot samci brez poškodb. Ko so samicam dodali poleg estrogenih hormonov še progesteron, pa razlik med samci ni bilo.

2.5.3.1.2 Žensko spolno obnašanje

V naravi živijo miši in podgane v posameznih, med sabo povezanih skupnostih. Navadna miš (*Mus musculus*) živi v manjših skupinah, sestavljenih iz enega samca in ene do dveh samic z mladiči. Samice, ki živijo skupaj, vstopijo v estrus istočasno in se v naravi tudi parijo istočasno (115, 127). Tak vzorec parjenja je še posebno značilen za podgane in ga je delno mogoče posnemati tudi v laboratoriju. Kot je bilo že omenjeno v poglavju o moškem spolnem obnašanju, je v obogatenem okolju ritem parjenja počasnejši in ga v večji kletki narekuje samica (115, 138). Tudi pri miših je v obogatenem okolju, ko je v kletki po več samic skupaj, ritem parjenja drugačen. Samec se v takem okolju pari z večjim številom samic, vendar ima določene samice raje kot druge. V eni od redkih raziskav, kjer je bilo prisotnih več samic skupaj, se je samec večkrat vzpenjal na samice, za katere je bilo značilno, da so dalj časa gradile gnezdo (140).

Spolno obnašanje samice lahko razdelimo na tri različne dele: privlačnost, proceptivnost in receptivnost. Privlačnost nam pove, v kakšni meri je samica privlačna za samca in obratno. Privlačnost je zelo odvisna od feromonov, ki jih izločata samec in samica. Proceptivnost ali faza pred kopulacijo (prekopulativna faza) nam pove, kako močno je samica motivirana, da bo sodelovala pri parjenju (115). Velikokrat samica prva vzpodbudi kontakt s samcem. To se lahko kaže z ovohavanjem anogenitalnega področja samca in z značilnim gibanjem približevanja in oddaljevanja od samca. Ta vzorec gibanja spodbudi samce, da se približajo samici. Opazili so ga pri podganah (138) in miših, vendar je pri miših veliko manj izrazit (140). Včasih se samice, zelo motivirane za parjenje, tudi vzpenjajo na samce ali na druge samice. Zadnja faza spolnega obnašanja samice je receptivnost ali spolna sprejemljivost. Ker je za to fazo značilno, da samica s svojim obnašanjem omogoči samcu uspešno kopulacijo, ji pravimo tudi faza kopulacije ali kopulatorna faza. Najbolj izrazit vzorec obnašanja, ki je značilen za spolno sprejemljivo samico in omogoča samcu kopulacijo, je refleksno usločenje hrbta ali lordoza (115). Med aktom lordoze samica

dvigne glavo, iztegne zadnje noge in upogne rep na eno stran. Tako še dodatno približa genitalno področje, da samec lažje vstopi s penisom v nožnico (127). Med posameznimi vstopi penisa v nožnico se podganja samica umakne od samca in tako sama določa ritem parjenja. Odmori med posameznimi vstopi penisa v nožnico omogočajo, da se zaradi refleksnega draženja sprosti iz hipofize dovolj prolaktina, ki dodatno pripravi maternico za vsaditev zarodka. Po odmoru se ponavadi samica vrne nazaj k samcu (141). V raziskavi Zipse in sod. (142) so primerjali spolno obnašanje samic s prisotnimi jajčniki in samic z odstranjenimi jajčniki po dodajanju estradiol benzoata in progesterona. Kljub enaki spolni sprejemljivosti obeh skupin so pri samicah z odstranjenimi jajčniki in dodanimi hormoni opazili daljše premore med posameznimi vstopi penisa v nožnico kot pri spolno sprejemljivih samicah s prisotnimi jajčniki. Dolžino časa, ki je potekla med posameznimi vstopi penisa v nožnico, je očitno odvisna od celotnega hormonskega statusa in ne samo od prisotnosti glavnih hormonov, estrogenih hormonov in progesterona. Pri mišji samici so opazili podoben vzorec oddaljevanja in približevanja, vendar je med parjenjem velikokrat stekla na popolnoma drugo mesto in se po odmoru vrnila na mesto, kjer se je parila, in ne k samcu (140).

Med vsemi področji v možganih je ventromedialno jedro v hipotalamusu (VMH) najpomembnejše pri uravnavanju refleksa lordoze. Poškodba tega področja zavre lordozo (143, 144), neposredno injiciranje estrogenih hormonov v to področje pa vzpodbudi lordozo. Sami estrogeni hormoni delujejo veliko šibkeje kot kombinacija estrogenih hormonov in progesterona (145). Za področje MPOA so ugotovili nasprotno kot za področje VMH. Področje MPOA naj bi lordozo zaviralo, saj se je ob poškodbah tega področja lordoza izboljšala, medtem ko je draženje tega področja povzročilo zmanjšanje lordoze (146). Celotno pot nastanka refleksa lordoze so uspeli do danes zelo natančno opisati. Verjetno je to eden najbolje opisanih refleksov, ki se neposredno navezuje na obnašanje živali. Draženje kože na ledvenem predelu med vzpenjanjem samca sproži pri spolno sprejemljivih samicah lordozo. Pri tem se vzdražijo čutni živci, po katerih potuje dražljaj do dorzalnih korenin ganglijev v hrbtenjači. Od hrbtenjače potuje dražljaj do mreževine v možganskem deblu (*angl*. medullary reticular formation in the hind brain) in v predel centralne sivine v srednjih možganih (*angl*. midbrain central gray). Ob prisotnosti ustreznih hormonov pošljejo VMH, MPOA in srednji del prednjega hipotalamusa ustrezno sporočilo do ostalih predelov možganov. Sporočilo potuje nazaj v centralno sivino v srednjih možganih (*angl*. midbrain central gray), v mreževino v srednjih možganih (*angl*.

midbrain reticular formation) in v medialno kolenasto telo (*angl*. medial geniculate body). Mreževina in medialno kolenasto telo aktivirata motorične živce v hrbtenjači in povzročita usločenje hrbta, lordozo (115, 147).

Za dobro izražanje lordoze so potrebni estrogeni hormoni in pri nekaterih vrstah tudi progesteron. Na splošno bi lahko rekli, da estrogeni hormoni pripravijo živčni sistem, da se bo v nadaljevanju lahko pod vplivom kombinacije estrogenih hormonov in progesterona, ali pa samo pod vplivom estrogenih hormonov, odzval z refleksom lordoze. Pri miših in podganah sta oba hormona potrebna za popolno izražanje lordoze (141). V laboratoriju lahko tudi z zelo visokimi količinami samo estrogenih hormonov vzpodbudimo delno izražanje lordoze (148). Miši brez gena za progestinski receptor (PR) kljub ustreznemu dodajanju obeh hormonov ne kažejo lordoze (148). Prav tako podgane, ki so jim vbrizgali nesmiselno ribonukleinsko kislino (RNK), ki se je zaradi obratnega zaporedja vezala na RNK progestinskega receptorja, po dodajanju estrogenih hormonov in progesterona niso kazale lordoze (149). Poleg hormonov iz spolnih žlez vplivajo na spolno obnašanje samice še drugi hormoni, kot na primer sproščujoči hormon gonadotropinov (GnRH), prolaktin in oksitocin (141). Pomembno sodelujejo pri spolnem obnašanju tudi številni nevrotransmiterji acetilholin, dopamin, serotonin, gama-aminobutirična kislina in opioidi. Spolni hormoni vplivajo na izločanje nevrotransmiterjev, ti pa v nadaljevanju lahko spodbujajo ali zavirajo različne vzorce obnašanja, odvisno v katerem področju živčnega sistema delujejo in preko katerih receptorjev delujejo (150).

2.5.3.2 Starševsko obnašanje

Starševsko obnašanje je definirano kot vrsta različnih aktivnosti, ki pripomore k boljšemu preživetju potomstva. Pri večini vrst sesalcev za potomstvo skrbi samo mati. Očetovsko ali paternalno obnašanje se pojavlja zelo redko na primer pri glodavcih (151). Mladiči miši se rodijo slabo razviti, neodlakani, slepi, z zelo slabo razvitimi gibalnimi sposobnostmi in nezmožnostjo ohranjanja telesne temperature. Starševsko obnašanje se začne z rojstvom in traja tri do štiri tedne. Vključuje gnezdenje, prinašanje mladičev v gnezdo, negovanje in lizanje mladičev, dojenje in obrambo mladičev pred vsiljivci (127). Pri miših oba starša skrbita za mladiče. V naravi so pogosta večja, skupna gnezda. Verjetno so v večjih gnezdih prisotne vonjave, značilne za kolonijo, ki gnezdi skupaj. To izboljšuje socialne stike in zmanjšuje pogostnost ubijanja mladičev (152). Gnezdenje je izredno pomembno zaradi ogrevanja neodlakanih mladičev in v naravi služi tudi kot skrivališče pred plenilci. Za

prinašanje mladičev v gnezdo je pomembno njihovo oglašanje z visoko frekvenco in njihov vonj. Ob zmanjšanem prepoznavanju teh dveh dražljajev se poveča zavračanje mladičev in kanibalizem (127).

2.5.3.2.1 Materinsko obnašanje

Starševsko obnašanje samice, materinsko ali maternalno obnašanje, je tesno povezano z laktacijo. S sesanjem se sproži refleks, ki potuje po hrbtenjači do supraoptičnega in paraventrikularnega jedra v hipotalamusu in spodbudi hipofizo k izločanju oksitocina. Oksitocin se sprosti v krvni obtok in spodbudi izločanje mleka iz mlečne žleze, hkrati pa utrjuje socialne vezi in materinsko obnašanje (127). Za nemoteno laktacijo je poleg oksitocina pomemben tudi prolaktin, ki spodbuja tvorbo mleka. Sprva so mislili, da je prav prolaktin edini hormon, ki je nujno potreben za izražanje materinskega obnašanja. Danes ugotavljajo, da pri izražanju materinskega oziroma starševskega obnašanja sodelujejo poleg prolaktina še drugi hormoni in snovi, kot so oksitocin, β endorfin, holecistokinin, prostaglandini, relaksin, progesteron in estrogeni hormoni (153, 154). Pri podganah, najverjetneje tudi pri miših in kuncih, strm padec progesterona hkrati z visokim dvigom estradiola, prolaktina in laktogenih hormonov posteljice ob porodu vzpodbudi začetek materinskega obnašanja. Če so padec progesterona preprečili, se je materinsko obnašanje kljub dvigu ostalih hormonov zavrlo (155). Prav tako samice podgane, ki so jim predčasno prekinili brejost in jim dodali progesteron ali kombinacijo estradiol benzoata in progesterona, niso kazale materinskega obnašanja. Nasprotno pa je polovica živali po dodatku samo estradiol benzoata kazala materinsko obnašanje (156). Ko je enkrat starševsko obnašanje vzpostavljeno, za vzdrževanje obnašanja (vsaj pri podganah) hormoni niso več nujno potrebni. Za nadaljevanje izražanja obnašanja je zadosten dražljaj le prisotnost mladiča. Zdi se, da obstaja vsaj pri večini glodavcev osnoven nivo starševskega obnašanja, ki ni odvisen od fizioloških stanj, kot sta brejost in laktacija. Vzorci starševskega obnašanja se tako pojavijo tudi pri spolno nezrelih mladičih podgane in odraslih podganjih samicah, ki nikoli niso bile breje (155). Prav tako so starševsko obnašanje opazili tudi pri monogamnih spolno nezrelih rovkah, ne pa tudi pri poligamnih spolno nezrelih rovkah in spolno nezrelih miših (157). Če so samice podgane, ki nikoli niso bile breje, izpostavili mladičem nekaj ur dnevno, so po petih do šestih dneh začele kazati vzorce obnašanja značilne za matere (158, 159). Temu pojavu pravimo tudi razvoj občutljivosti. Najverjetneje se s tem izboljša preživetje mladičev in ima vlogo pri učenju

starševskega obnašanja, saj se v naravi velikokrat zgodi, da so starejši mladiči v istem gnezdu kot novorojeni mladiči in pomagajo skrbeti za njih (155). Očitno je, da imajo v starševskem obnašanju pomembno vlogo tudi predhodne izkušnje. Podgana, ki je že bila mati, bo že po enem dnevu posvojila tuje mladiče, ne glede na njeno hormonsko stanje (151). Miši prav tako v odsotnosti hormonov in brez predhodnih izkušenj lahko kažejo vzorce starševskega obnašanja. Samci in samice prinašajo mladiče v gnezdo, negujejo in izražajo obnašanje podobno laktaciji (čepenje nad mladiči), čeprav nekatere vzorce obnašanja izražajo bolj intenzivno samice kot samci (160). Prisotnost mladičev pri ovariektomiziranih samicah miši vzpodbudi še bolj intenzivno gradnjo gnezd. Kljub odsotnosti hormonov gradijo lepo oblikovana, globoka gnezda, značilna za samice matere (161).

Pri starševskem obnašanju ima pomembno vlogo vohalni sistem. Miši, ki so jim takoj po porodu odstranili vohalne betiče ali kemično preprečili zaznavanje vonja, so prenehale izražati materinsko obnašanje. Zanimivo je, da so pri samicah hrčka in podganjih samicah v estrusu, ki nikoli niso bile v paritvi, ugotovili obraten učinek. Šele nezmožnost zaznavanja vonja mladičev je pri njih vzpodbudila materinsko obnašanje. Očitno pri hrčku in podgani samice, ki niso matere, ne kažejo materinskega obnašanja, ker jih vonj mladičev odvrača. Da se vzpodbudi materinsko obnašanje, pride v pozni brejosti do hormonalnih sprememb in sprememb v živčevju, ki vzpodbudijo privlačnost in s tem približevanje ter zavrejo zavračanje in s tem izogibanje mladičem (155).

Dve področji, medialno predoptično področje (MPOA) in spodnje jedro končne strije (BNST), sta se izkazali kot pomembna dela sistema v možganih, ki uravnava materinsko obnašanje (162). Pri kalifornijski miši (*Peromyscus californicus*), kjer je starševsko obnašanje prisotno v enaki meri pri obeh spolih, je področje MPOA pri samcih veliko večje kot pri samicah. Ko oba postaneta starša, teh razlik ni več, saj se pri samicah telesa živčnih celic v MPOA močno povečajo (163). Pri samicah podgane uničenje MPOA in BNST popolnoma zavre materinsko obnašanje (155), medtem ko vsadki estradiola, vstavljeni v MPOA, vzpodbudijo materinsko obnašanje (164). Protein C-FOS, ki je pokazatelj aktivnosti živčnih celic, se začne v MPOA izražati že samo po dodajanju estradiol benzoata pri spolno neizkušenih samicah podgane (brez izpostavitve mladičem). Pri brejih samicah podgane prekinitev brejosti in dodajanje estradiol benzoata še povečata izražanje C-FOS v MPOA. Najbolj pa se poveča izražanje pri podganah, pri katerih so

prekinili brejost, jim dodali estradiol benzoat, jih izpostavili mladičem in so tudi kazale materinsko obnašanje. Protein C-FOS je bil pri teh samicah močno izražen poleg MPOA tudi v področjih BNST in v dorzalnem ter intermedialnem delu stranskega pretina (156). Tudi raziskave estrogenskih receptorjev (ER) so pokazale, da se prav v obdobju pred in ob porodu poveča izražanje estrogenskih receptorjev v MPOA in BNST (155). Prav tako miši brez ERα kažejo zmanjšano materinsko obnašanje in v nekaterih primerih celo pobijajo mladiče (165). Področje MPOA pošilja živčne povezave v stranski pretin in medialni hipotalamus. Ti dve področji bi lahko zavirali materinsko obnašanje, saj sta del živčnega sistema, ki uravnavata strah in agresivno obnašanje (155). Tudi medialna amigdala, ki dobiva sporočila iz vohalnega sistema, naj bi zavirala starševsko obnašanje. To dokazujejo raziskave, kjer so s poškodbami medialne amigdale vzpodbudili materinsko obnašanje (166). Področje BNST pošilja živčne povezave v ventralni del krova srednjih možganov in v področje retrorubralnega polja. Ta del sistema bi lahko vzpodbujal materinsko obnašanje, saj je del dopaminergičnega sistema, ki uravnava procese motivacije oziroma nagrajevanja. Obe področji, BNST in MPOA, pošiljata živčne povezave v obakveduktno sivino, ki dobiva sporočila iz čutnega zaznavanja preko ust. To bi lahko pomenilo, da področje obakveduktne sivine sodeluje pri uravnavanju prenašanja mladičev z usti (155). Tudi prolaktin in drugi laktogeni hormoni vplivajo na materinsko obnašanje. Število prolaktinskih receptorjev se lahko poveča zaradi povečane količine estrogenih hormonov ali pa izražanje receptorjev vzpodbudi že sama prisotnost mladičev (155). Prolaktin v POA vzpodbudi materinsko obnašanje pri samicah podgane, ki so jim predhodno dodali estradiol. Tudi oksitocin naj bi imel pomembno vlogo pri materinskem obnašanju. Začetne raziskave miši brez gena za oksitocinski receptor ne ugotavljajo večjih sprememb v razmnoževanju razen prekinjene laktacije (167). Novejše raziskave pa ugotavljajo, da je delovanje oksitocina pomembno pri negovanju (lizanju) mladičev in pri nekaterih motivacijskih procesih materinskega obnašanja (168, 169). Miši brez gena za oksitocinski receptor imajo tudi motnje v socialnem prepoznavanju, ki bi lahko vplivale na starševsko obnašanje (170).

2.5.3.2.2 Očetovsko obnašanje

Podobni živčni mehanizmi, ki sodelujejo pri materinskem, naj bi sodelovali tudi pri očetovskem obnašanju. Vsadki estradiola v področje POA tudi pri samcih podgane vzpodbudijo starševsko obnašanje, čeprav je čas do začetka obnašanja daljši kot pri

samicah (171). Tudi pri samcu kalifornijske miši (*Peromyscus californicus*), ki prav tako kot samica skrbi za mladiče, je starševsko obnašanje tesno povezano s področjem MPOA. Samci kalifornijske miši, ki so jim poškodovali to področje, preživijo krajši čas z mladiči, manj ližejo in ovohavajo mladiče ter potrebujejo dalj časa, da prinesejo mladiče v gnezdo kot samci brez poškodb (172). Tudi pri monogamni prerijski voluharici (*Microtus ochrogaster*) je očetovsko obnašanje močno izraženo. Veliko raziskav se je osredotočilo na vlogo arginin vazopresina in ugotovili so, da naraščanje očetovskega obnašanja pri prerijski voluharici sovpada z zmanjševanjem količine arginin vazopresina v stranskem pretinu. To verjetno pomeni, da se arginin vazopresin med obnašanjem intenzivno izloča. Skladno s tem so ugotovili povečanje izražanja sporočilne ribonukleinske kisline (mRNK) za arginin vazopresin v celicah, ki pošiljajo živčna vlakna v stranski pretin. V teh celicah verjetno nastaja zaloga arginin vazopresina, ki prehaja v stranski pretin. Povečanje mRNK za arginin vazopresin zato razlagajo kot posledico povečane porabe v stranskem pretinu. Če so v stranski pretin spolno neizkušenim samcem prerijske voluharice injicirali arginin vazopresin, so vzpodbudili očetovsko obnašanje. Nasprotno, če so v isto področje injicirali antagonist vazopresinskega receptorja, so očetovsko obnašanje zavrli (173).

2.5.3.3 Socialno in agresivno obnašanje

Socialno obnašanje je širše definirano kot obnašanje, ki predstavlja interakcije med posamezniki in od katerega ima en ali več posameznikov korist. Tako široka definicija zajema tako agresivne kot tudi neagresivne oblike interakcij. Neagresivne interakcije med posamezniki zajemajo različne vzorce obnašanja, ki utrjujejo povezanost in dajejo občutek pripadnosti. Lahko so tudi sklop drugih vrst obnašanj, kot so na primer starševsko obnašanje ali dvorjenje pri spolnem obnašanju. Med posameznimi vrstami obstajajo velike razlike med izražanjem različnih oblik socialnega obnašanja. Posamezniki nekaterih vrst živijo popolnoma sami in imajo socialne stike le ob parjenju, drugi lahko živijo sami in imajo poleg parjenja še občasne socialne stike. Veliko živalskih vrst, med katerimi so tudi podgane in miši, pa živi v skupinah ali parih večino časa. Živali, ki živijo v parih ali celo skupinah, imajo praviloma veliko socialnih stikov in med njim se vzpostavi občutek povezanosti oziroma pripadnosti. Čeprav teritorialno in agresivno obnašanje posameznike razdvaja, socialno obnašanje pa posameznike povezuje, mehanizem uravnavanja enega ni nasproten mehanizmu uravnavanja drugega. Pri obeh oblikah gre za zapleteno delovanje

hormonov, nevrotransmiterjev in drugih snovi, ki uravnavajo odgovor živčnega sistema na različne dražljaje (174).

2.5.3.3.1 Socialno obnašanje

Socialno obnašanje v povezavi z možgani se je v veliki meri proučevalo na različnih vrstah voluharic, ki izražajo različno partnersko obnašanje. Prerijska voluharica (*Microtus ochrogaster*) je monogamna, medtem ko sta njena bližnja sorodnika gorska voluharica (*Microtus montanus*) in travniška voluharica (*Microtus Pennsylvanicus*) poligamni. Oksitocin in arginin vazopresin sta v tesni povezavi z različnim partnerskim obnašanjem voluharic in pomembno vplivata na izražanje socialnega, agresivnega, teritorialnega in starševskega obnašanja tudi pri ostalih vrstah (175, 176). Arginin vazopresin deluje preko treh tipov receptorjev, V1a, V1b in V2, od katerih sta pri socialnem obnašanju pomembna predvsem receptorja V1a in V1b (177, 178). Monogamna in poligamna voluharica se razlikujeta v razporeditvi vazopresinskih receptorjev V1a (179) in oksitocinskih receptorjev (180) v možganih. Podobno razliko v razporeditvi oksitocinskih receptorjev so ugotovili tudi za poligamno vrsto miši (*Peromyscus maniculatus*) in monogamo vrsto miši (*Peromyscus californicus*) (181).

Samci in samice laboratorijske miši (*Mus musculus*) ne tvorijo partnerskih vezi tako kot monogamne vrste voluharic ali nekatere monogamne vrste miši, zato socialnega obnašanja ne moremo raziskovati z vidika monogamnosti in poligamnosti. Kljub vsemu je socialno obnašanje pri laboratorijski miši vseeno močno izraženo. Kaže se kot del drugih vzorcev obnašanja, kot so: starševsko, spolno, igra mladičev ali pa bolj specifično kot socialno prepoznavanje vrstnikov. Za raziskovanje socialnega obnašanja laboratorijske miši se pogosto uporablja poskus socialnega prepoznavanja. Z njim ugotavljamo, ali miš prepozna vonj druge miši, ali jo ta vonj zanima in ali si vonj po določenem času tudi zapomni. Poskus socialnega prepoznavanja temelji na spoznanju, da miš raje ovohava neznano miš od že znane miši. Ker so miši v tem poskusu izpostavljene večkrat zaporedoma isti samici, si njen vonj postopoma zapomnijo in se čas ovohavanja zato zmanjšuje. Čas ovohavanja pa se ponovno poveča, ko v kletko dodamo novo samico, ki zopet vzpodbudi zanimanje pri poskusni miši (182).

Za proučevanje vpliva arginin vazopresina na obnašanje imamo na voljo dva modela miši brez gena za receptor V1a in miši brez gena za receptor V1b. Oba modela gensko

spremenjenih miši kažeta motnje v socialnem obnašanju, vendar so pri samcih miši brez gena za V1a ugotovili večje motnje pri socialnem prepoznavanju kot pri samcih miši brez gena za receptor V1b (183, 184). Poleg tega so pri samcih miši brez gena za receptor V1b opazili tudi zmanjšano agresivnost v primerjavi s samci z normalno prisotnim receptorjem (184). Pri obeh spolih miši brez gena za receptor V1a pa so ugotovili tudi zmanjšano obnašanje podobno tesnobi in zmanjšano sposobnost učenja ter pomnjenja (177). Tudi oksitocin ima pomembno vlogo pri uravnavanju socialnega obnašanja, saj so moteno socialno prepoznavanje ugotovili pri miših brez gena za oksitocin in miših brez gena za oksitocinski receptor (185, 186).

2.5.3.3.2 Agresivno obnašanje

Na splošno lahko opišemo agresivno obnašanje kot obnašanje, ki se izrazi, kadar pride do spora zaradi različnih interesov posameznikov. Z vidika organizma, proti kateremu je agresivno obnašanje usmerjeno, bi lahko rekli, da je to obnašanje nasprotno socialnemu obnašanju. Z vidika osebka, ki agresivno obnašanje izvaja, lahko to obnašanje celo izboljša socialne stike (zaščita kolonije pred plenilci ali drugimi vsiljivci, materinska agresivnost). Ni nujno, da se agresivnost kaže z različnimi oblikami fizičnega stika. Spor med dvema osebkoma se lahko razreši brez fizičnega stika, že s samo grožnjo, obredom ali z aktivnostjo, ki kaže na podreditev poraženca. Različne vrste agresivnosti se pojavljajo v različnih situacijah, okoljih in v različnem socialnem kontekstu. Agresivnost ima lahko namen obrambe ali zagotavlja vire (hrana, ozemlje) za boljše preživetje in razmnoževanje. V naravi se pojavljajo: teritorialna agresivnost, materinska agresivnost, agresivnost med samci in agresivnost plenilcev, ki zagotavlja hrano. V laboratorijih agresivnost lahko vzpodbudimo z različnimi eksperimentalnimi pogoji, kot so strah, elektrošok, izolacija in prisotnost osebka iste ali druge vrste. Pri podganah in miših se največkrat proučuje agresivnost med samci in maternalna agresivnost. Samci se ponavadi borijo za ozemlje in samice. V laboratoriju poražene in podrejene miši ne morejo oditi iz kletke in naseliti novega ozemlja, kot se to zgodi v naravi. V kletki se ustvari hierarhija in na vrhu lestvice je ponavadi en dominanten samec, ki največkrat napada ostale (174). Zgodnje raziskave na podganah so prišle do zanimivih ugotovitev, kaj se dogaja s populacijo, kadar pride do prenaseljenosti. Na začetku poskusa je gostota populacije podgan naraščala. Ko je dosegla kritično točko, je začela naglo upadati. Mladiči so poginjali, samice niso dočakale kotitve in samci so se intenzivno borili, dokler se ni vzpostavila hierarhija. Dominanten samec je

imel skupino samic, ki so normalno kotile in dobro skrbele za mladiče. Ostale samice iz skupine, ki niso živele v bližini dominantnega samca, pa so imele slabša gnezda in so slabo skrbele za mladiče, ki so tudi velikokrat poginili. S temi samicami so se parili največkrat samci na obrobju, saj je dominanten samec preprečeval ostalim samcem, da bi se parili z njegovimi samicami (187).

Na splošno je agresivno obnašanje znano kot obnašanje, ki se zelo razlikuje med spoloma in se kaže bolj intenzivno pri osebkih moškega spola kot pri osebkih ženskega spola. Povečanje izražanja agresivnih oblik obnašanja se pojavi ob puberteti. Takrat se moda povečajo in pod vplivom luteinizirajočega hormona izločajo vedno večje količine androgenih hormonov. V naravi je za glodavce to pomemben čas, saj morajo takrat oditi iz gnezda, se osamosvojiti in si z ustreznim obnašanjem zagotoviti ozemlje, hrano in samice (174). Androgeni hormoni med razvojem in v odraslem obdobju pomembno vplivajo na agresivno obnašanje. Pri podganah vplivajo na razvoj igre med mladiči, ki ima elemente agresivnosti in je pomembna za izražanje ustreznega obnašanja v odraslem obdobju (188). Zgodnja odstranitev mod pri miši, takoj po rojstvu, zmanjša agresivnost, kljub dodajanju testosterona v odraslem obdobju. Nasprotno dodajanje testosterona samicam takoj po rojstvu poveča agresivnost samic kasneje v odraslem obdobju (189). Pri nekaterih vrstah so ugotovili, da lega plodov v maternici lahko vpliva na spolno različen razvoj nevroendokrinega sistema. Spremembe so bile opisane predvsem pri podganah in miših. Pri miših so primerjali nekatere fiziološke parametre, morfologijo in obnašanje v odvisnosti od tega, ali je plod v maternici ležal med dvema plodovoma moškega ali med dvema plodovoma ženskega spola. Samci in samice, ki so ležali v maternici med dvema plodovoma moškega spola, so izražali več agresivnega obnašanja kot tisti, ki so ležali med dvema plodovoma ženskega spola. Te spremembe so pripisali testosteronu, ki se je izločal iz plodov moškega spola in prehajal v sosednje plodove (42). V večini odstranitev mod vpliva na zmanjšanje ali popolno prenehanje agresivnosti. To ne drži v vseh okoliščinah in za vse vrste. Tako na primer pri samcu prerijske voluharice (190), kalifornijske miši (191) in miši linije CD-1 (192) po odstranitvi mod ne pride do zmanjšanja agresivnosti. Ker odstranitev mod v večini primerov drastično zmanjša ali celo prekine izražanje agresivnosti, so različne raziskave želele povezati individuale razlike v agresivnosti s količino testosterona v krvi. Nekatere so uspele potrditi pozitivno povezavo med količino testosterona v krvi in agresivnostjo, medtem ko so druge to hipotezo ovrgle (193). Testosteron verjetno do neke mere povečuje agresivnost, vendar le, kadar se giblje znotraj

fizioloških koncentracij. Nad fiziološkimi koncentracijami testosteron ne vpliva več na povečanje agresivnosti (194). Testosteron lahko vpliva na agresivno obnašanje nespremenjen ali pa v obliki različnih presnovkov. V možganih se lahko presnovi v 5α-dihidrotestosteron ali v estradiol (195). Aromatiziran testosteron, estradiol, je pomemben za razvoj agresivnega obnašanja tudi med fetalnim razvojem. V tem času maskulinizira nevroendokrini sistem moških plodov, kar je osnova za ustrezno izražanje agresivnega obnašanja v odraslem življenju (9). Najverjetneje je pri tem pomemben estrogenski receptor α (ERα), saj samci brez gena za ERα le redko izražajo agresivno obnašanje usmerjeno proti samcem (196, 197). Nasprotno velja za samce brez gena za ER β, kjer niso opazili večjih sprememb v agresivnosti do samcev (198). Pri miših linije CD-1 so ugotovili, da po odstranitvi mod še vedno kažejo agresivno obnašanje. Ta agresivnost je bila odvisna od estrogenih hormonov, saj se je po dodanem zaviralcu aromataze zmanjšala. Prav tako so ugotovili, da so bile individualne razlike v agresivnosti teh miši v pozitivni povezavi s številom ERα v nekaterih področjih možganov (192).

Hormoni vplivajo na obnašanje, vendar tudi obnašanje vpliva nazaj na hormone. Socialne izkušnje lahko povratno vplivajo na koncentracijo hormonov in drugih snovi v krvi in s tem na agresivno obnašanje. Tako lahko pri sirijskem hrčku izkušnje z agresivnostjo v zgodnjem obdobju življenja vplivajo na povečano agresivnost v odraslem obdobju (199). Tudi izkušnje poraza v odraslem obdobju lahko vplivajo na hormonske spremembe in obnašanje. Pri vrstah kot so opice rezus, miši in hrčki se po ponavljajočih porazih zniža koncentracija androgenih hormonov v krvi (174). Ta pojav je najbolj raziskan pri hrčkih in ga imenujejo pogojena podrejenost. Hrček, ki stalno izgublja borbe, popolnoma preneha izražati agresivno obnašanje. Kljub izpostavitvi veliko manjšemu in neagresivnemu nasprotniku, ki ponavadi izzove agresivnost, ne brani svojega ozemlja. Sprememba obnašanja pa ni nujno pogojena s fizičnim stikom z nasprotnikom. Že sama bližina drugega samca lahko povzroči povečan stres in prenehanje agresivnega obnašanja (200).

Živčni sistem, ki uravnava agresivno obnašanje, vključuje medialno predoptično področje, stranski pretin, sprednji hipotalamus, ventromedialni hipotalamus (VMH), področje sivine ob ventriklih (*angl.* periaqaductal gray, PAG), medialno amigdalo in BNST (*angl.* bed nucleus of stria terminalis). V ta krog se povezujejo še druga področja možganov, kot na primer možganska skorja in področja, ki sprejemajo dražljaje iz čutil. Pri glodalcih so pri uravnavanju agresivnosti pomembni vohalni betiči, medtem ko so pri drugih vrstah, kjer je

bolj razvito čutilo za vid in sluh, pomembna področja, ki sprejemajo dražljaje iz teh čutil (66). Na splošno pri podganah poškodbe stranskega pretina, BNST, sprednjega hipotalamusa in medialne amigdale zmanjšajo agresivnost (201), medtem ko poškodbe orbitofrontalnega dela možganske skorje povečajo agresivnost, kar kaže na to, da to področje verjetno zavira agresivnost (202). Določena jedra znotraj posameznih področij možganov imajo različno vlogo pri uravnavanju agresivnosti v različnih socialnih okoliščinah. Dorzomedialni del VMH in kavdoventralni del medialne amigdale sodelujeta pri obnašanju, ki ima značilnosti obrambe, medtem ko posterodorzalni del amigdale sodeluje pri napadalnem obnašanju (203).

Steroidni hormoni vplivajo na sistem nevrotransmiterjev, ki oblikujejo neagresivni ali agresivni odgovor na dražljaj. Čeprav so že za skoraj vsak nevrotransmiter poročali, da je v določeni meri udeležen pri uravnavanju agresivnosti, pa predpostavljajo, da je serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) eden najpomembnejših. Na splošno znižana raven 5-HT povečuje agresivnost, zvišana pa zmanjšuje agresivnost. Na višjo raven 5-HT lahko vplivamo preko povišanja presnovkov predhodnikov 5-HT, z dodajanjem zaviralcev ponovnega prevzema 5-HT ali z dodajanjem agonistov serotoninskih receptorjev 5-HT_{1A} in 5-HT_{1B}. Kadar so mišim dodali zgoraj naštete snovi, se je v vseh primerih zmanjšala agresivnost (204, 205). Vpliv serotoninskega sistema na agresivnost so raziskovali tudi na različnih modelih gensko spremenjenih miši. Samci in samice miši brez gena za serotoninski receptor 1b kažejo večjo agresivnost kot miši z normalnim genotipom (206). Serotoninska receptorja 1a in 1b verjetno različno vplivata na agresivno obnašanje, saj miši brez gena za serotoninski receptor 1a kažejo drugačen fenotip kot miši brez gena za serotoninski receptor 1b. Te miši izražajo več obnašanja podobnega tesnobi in manj reaktivnega obnašanja ter so verjetno zaradi tega tudi manj agresivne (207).

Preko serotoninskega sistema ali samostojno lahko vplivajo na agresivnost še dušikov oksid (NO), γ amino butirična kislina (GABA) in vazopresin (66, 204). Miši brez gena za encim, ki tvori dušikove okside v živčnem sistemu, imajo zmanjšano presnovo 5-HT v nekaterih področjih možganov (204) in najverjetneje zaradi tega kažejo večjo agresivnost do nasprotnikov (208). Poleg zgoraj naštetih snovi sodelujeta pri uravnavanju agresivnosti tudi dopamin in noradrenalin, saj med agresivnimi srečanji pride do dviga vzburjenosti živčnega sistema in povečanega stresnega odgovora (66).

2.5.4 Modeli miši za proučevanje vplivov spolnih hormonov na spolno diferenciacijo in obnašanje

2.5.4.1 Miši z neobčutljivostjo androgenskih receptorjev in miši brez gena za androgeni receptor

Androgenski receptor (AR) je izražen v področjih možganov, ki večinoma uravnavajo spolno obnašanje. V področju prednjih možganov je izražen v večjem delu možganske skorje, vohalni skorji in področju hipokampusa (209, 210, 211). V limbičnem področju je izražen v pretinu, amigdali in v spodnjem jedru končne strije (212). Znotraj hipotalamusno-predoptičnega dela je izražen v predoptičnem področju, paraventrikularnem jedru, arkvatnem jedru in ventromedialnem jedru (211, 213). V nekaterih področjih celice skupaj z androgenskim receptorjem izražajo tudi encim tirozin hidroksilazo, ki je pomemben v proizvodnji dopamina. Izražanje androgenskega receptorja je v glavnem odvisno od testosterona oziroma njegovih presnovkov. Število androgenskih receptorjev se lahko zmanjša tako pri povišanih koncentracijah kot tudi pri znižanih koncentracijah testosterona. Testosteron se v celicah lahko spremeni v 5α-dihidrotestosteron, ki se veže samo na androgenske receptorje, ali pa v estradiol, ki se veže na estrogenske receptorje. Presenetljivo oba 5α-dihidrotestosteron in estradiol uravnavata izražanje androgenskih receptorjev (213, 214).

Za proučevanje androgenskega receptorja imamo na voljo dve vrsti gensko spremenjenih miši. Prva je rezultat spontane mutacije androgenskega receptorja, zaradi katere pride do neobčutljivosti receptorja na androgene hormone (*angl.* testicular feminization mutation, Tfm). Druga skupina predstavlja miši, ki so jim umetno izbili gen za androgenski receptor in se imenujejo miši brez gena za androgenski receptor (*angl.* knockout, ARKO). Fenotipsko so samci Tfm podobni samicam in niso plodni (215). Čeprav imajo v trebušni votlini prisotna majhna moda, ki izločajo nizke količine testosterona in 5α-dihidrotestosterona, brez dodanih spolnih hormonov ne izražajo spolnega obnašanja. Po dodajanju različnih spolnih hormonov samo del samcev Tfm izraža spolno obnašanje, vključno z ejakulatornim refleksom (36). Nasprotno spolnemu obnašanju pa samci Tfm izražajo normalno agresivno obnašanje usmerjeno proti samcem, kar dokazuje, da AR ni nujno potreben za izražanje agresivnega obnašanja (216). Očitno je AR pomemben tudi pri samicah, saj imajo samice ARKO moteno razmnoževanje. Tako heterozigotne kot

homozigotne samice z mutacijo v androgenskem receptorju imajo manjše število mladičev kot miši z normalno prisotnim androgenskim receptorjem (215, 217).

2.5.4.2 Miši brez gena za estrogenski receptor

Čeprav se stalno ugiba, ali je prisotnih več oblik estrogenskega receptorja, so do sedaj izolirali le dve obliki, α in β (218). Vzorec izražanja obeh oblik receptorja v možganih se ponekod prekriva, v nekaterih področjih možganov pa je izražena ena oblika bolj kot druga. Vzorec izražanja se spreminja tudi glede na starost, spolni cikel pri samicah in glede na obdobje razvoja. V področju spodnjega jedra končne strije in medialne amigdale sta izražena oba receptorja podobno pri miših in podganah. Po celotni skorji možganov je izražen predvsem estrogenski receptor β, čeprav se vzorec izražanja zelo razlikuje med podgano in mišjo. V predoptičnem področju in v področju hipotalamusa sta oba receptorja izražena, vendar različno glede na posamezne manjše dele teh področij. Estrogenski receptor α je izražen predvsem v medialnem predoptičnem področju, arkvatnem in ventromedalnem jedru hipotalamusa (VMH), medtem ko estrogenskega receptorja β v teh področjih skoraj ni. V predoptičnem področju je estrogenski receptor β močno izražen le v področju magnocelularnih celic. Estrogenski receptor β je močno izražen tudi v paraventrikularnem jedru (PVN) pri miših in podganah. V tem področju pri podgani estrogenskega receptorja α ni, medtem ko je pri miših srednje do šibko izražen (219, 220). Oksitocin, ki je pomemben pri oblikovanju lordoze, nastaja v paraventrikularnem jedru in v supraoptičnem jedru, ki se povezujeta z VMH. Večina celic v paraventrikularnem jedru istočasno izraža oksitocin in estrogenski receptor β (221). V področju anteroventralnega dela periventrikularnega jedra (AVPV) celice izražajo pri podganah le estrogenski receptor α, medtem ko pri miših tudi nekaj estrogenskega receptorja β (219, 220). Dopamin prav tako spodbuja spolno obnašanje pri samicah in samcih in v AVPV celice istočasno izražajo estrogenski receptor α in encim tirozinsko hidroksilazo, pri čemer imajo samice več takih celic kot samci (222). Pri miših je estrogenski receptor β močno izražen v področjih, kjer se izločajo monoamini (dopamin, serotonin in noradrenalin), ki sodelujejo pri motivacijskih procesih (219).

Za proučevanje estrogenskih receptorjev imamo na voljo tri različne modele miši z izbitimi geni za različne estrogenske receptorje (*angl.* knockout, KO). Proučujemo lahko miši brez gena za estrogenski receptor α (ERαKO), miši brez gena za estrogenski receptor β (ERβKO) in miši brez genov za oba estrogenska receptorja α in β (ERαβKO).

Samci ERαβKO ne kažejo nobenih vzorcev moškega spolnega obnašanja od faze dvorjenja do faze paritve (223). Ultrazvočno oglašanje je bilo prisotno le pri enem samcu od sedmih. Po odstranitvi mod so s kombinacijo testosterona in apomorfina (agonist dopamina) najbolje uspeli povrniti vzpenjanje in vstope penisa v nožnico, medtem ko noben samec ni ejakuliral (36). Tudi agresivno obnašanje je bilo močno zmanjšano pri samcih ERαβKO v primerjavi s samci z normalnim genotipom (223). Samice ERαβKO po dodajanju estradiola in progesterona ne izražajo lordoze. Tudi kombinacija estradiola in apomorfina pri njih ni uspela vzpodbuditi lordoze (224).

Tudi pomanjkanje samo estrogenskega receptorja α vpliva na razmnoževanje. Čeprav se spolni organi razvijejo normalno, so samci in samice ERαKO neplodni. Samice ERαKO, ki so jim odstranili jajčnike, kljub dodajanju estradiol benzoata in progesterona ne kažejo lordoze, čeprav stimulusne samce privlačijo enako močno kot samice z normalnim genotipom (225, 226). Pri samcih ERαKO se spolno obnašanje po odstranitvi mod in vstavitvi testosteronskih vsadkov le delno povrne. Čeprav samci ERαKO ne kažejo privlačnosti do vonja samice (123), se vseeno vzpenjajo na samice in ultrazvočno oglašajo, vendar imajo močno zmanjšano število vstopov penisa v nožnico in ne ejakulirajo (225, 226, 227). Po dodajanju apomorfina, agonosta dopamina, se je spolno obnašanje in privlačnost do vonja samice v celoti povrnilo, kar dokazuje da ERα ni nujno potreben za izražanje spolnega obnašanja pri samcih (123). Estrogenski receptor α je očitno pomemben tudi pri razvoju agresivnosti, saj samci ERαKO ne kažejo agresivnega obnašanja do drugih samcev, čeprav pri njih normalno izzovejo agresivnost. Nasprotno pa so samci ERαKO agresivni do samic in do mladičev ter kažejo povečano ubijanje mladičev (197, 228).

V nasprotju z ERαβKO in ERαKO miši brez gena za estrogenski receptor β (ERβKO) nimajo tako spremenjenega spolnega in agresivnega obnašanja. V moškem spolnem obnašanju niso odkrili nobenih razlik v primerjavi s samci divjega tipa. Prav tako normalno izražajo agresivno obnašanje proti samcem. Edina razlika, ki so jo ugotovili v agresivnem obnašanju, je, da pri samcih z normalnim genotipom agresivnost s številom poskusov narašča, pri samcih ERβKO pa agresivnost med poskusi ostaja podobna (229). Pri samicah ERβKO spolno obnašanje ni spremenjeno, kažejo celo povečano spolno sprejemljivost kot kontrolne samice in so spolno sprejemljive celo dan po estrusu (229). Čeprav samci ERβKO ne kažejo nobenih znakov demaskulinizacije, po odstranitvi mod in dodajanju estradiol benzoata in progesterona kažejo značilnosti ženskega spolnega obnašanja in

imajo boljšo lordozo kot samci divjega tipa. Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da je estrogenski receptor β pomemben za popolno defeminizacijo plodov moškega spola (230).

2.5.4.3 Miši brez gena za progestinski receptor

Odkriti sta bili dve glavni obliki progestinskega receptorja A in B (231). Podobno kot androgenski receptor je tudi progestinski receptor (večinoma obe obliki) izražen v področjih možganov, ki uravnavajo spolno obnašanje. Še posebno močno je izražen v celicah predoptičnega področja (POA) in ventromedialnega hipotalamusa (VMH), srednje močno je izražen v jedru končne strije, arkvatnem jedru hipotalamusa (ARC) in amigdali (232, 233, 234). Primarno uravnavanje izražanja progestinskega receptorja poteka preko estradiola. Nekatere celice v možganih izražajo oba, tako estrogenski kot tudi progestinski receptor. Med estrusom se po dvigu estradiola poveča izražanje progestinskega receptorja v POA in VMH, kar omogoča ustrezno obnašanje (lordozo) spolno sprejemljive samice (141). Pri samicah miši poteka uravnavanje izražanja progestinskega receptorja v MPOA samo preko estrogenskega receptorja α, medtem ko sta pri samcih potrebna oba estrogenska receptorja za največje izražanje progestinskega receptorja (235). Tipičen primer spolno različnega izražanja zaradi vplivov estradiola v fetalnem obdobju je izražanje progestinskega receptorja v področju POA in v anteroventralnem delu periventrikularnega jedra (AVPV). Pri samcih je v tem obdobju progestinski receptor močno izražen, medtem ko ga pri samicah skorajda ni. Samci v tem obdobju izločajo testosteron, ki se aromatizira v estradiol in uravnava izražanje progestinskega receptorja, medtem ko samice v tem obdobju ne izločajo spolnih hormonov, ki bi lahko vplivali na izražanje progestinskega receptorja (236). Pri podganjih samicah nekatere celice hipotalamusa izražajo poleg progestinskega receptorja tudi dopaminske receptorje (237) in encim tirozin hidroksilazo, ki je pomemben za presnovo dopamina (238). Glede na to bi v teh celicah lahko tudi dopamin sodeloval pri izražanju progestinskega receptorja.

Za proučevanje progestinskega receptorja imamo na voljo miši brez gena za progestinski receptor (*angl.* knockout, PRKO). Samice PRKO imajo motnje v razmnoževanju in so neplodne. Motnje se kažejo na več ravneh, od motene ovulacije, nepopolno razvitih mlečnih žlez, hiperplazije sluznice maternice, do zmanjšanega izražanja spolnega obnašanja. Samice PRKO po dodajanju estradiol benzoata in progesterona ne kažejo spolne sprejemljivosti (lordoze), medtem ko samice heterozigotne za izbiti gen progestinskega receptorja kažejo lordozo podobno kot samice z nespremenjenim

genotipom. Enkratno injiciranje samo estradiol benzoata, brez progesterona, ni uspelo vzpodbuditi lordoze niti pri samicah PRKO niti pri samicah z nespremenjenim genotipom. Ko so mišim dodajali zelo visoke odmerke estradiol benzoata (10µg na miš) deset dni zaporedoma, pa so uspeli enako vzpodbuditi lordozo pri samicah PRKO, heterozigotnih samicah in pri samicah z nespremenjenim genotipom. Lordoza je bila v tem primeru veliko slabša kot lordoza po kombinaciji estradiol benzoata in progesterona. Očitno samice PRKO niso popolnoma izgubile sposobnosti izražanja lordoze in za lordozo, vzpodbujeno preko estradiol benzoata, ni potreben progestinski receptor (148). Čeprav so samci PRKO z razliko od samic plodni, vseeno kažejo manjše motnje v spolnem obnašanju. Samci PRKO so kazali manjše število vzpenjanj kot kontrolni samci. Te razlike so izginile, če so imeli samci pred poskusom izkušnje s parjenjem. Velike razlike so opazili, če so izkušenim samcem odstranili spolne žleze. Po odstranitvi mod se je izkušenim samcem PRKO spolno obnašanje drastično zmanjšalo, medtem ko je pri kontrolnih samcih, prav tako z izkušnjami, ostalo na višji ravni. Iz rezultatov predpostavljajo, da izkušnje vplivajo na dopaminski sistem, ki preko progestinskih receptorjev uravnava spolno obnašanje. Ker samci PRKO nimajo progestinskih receptorjev, se jim kljub spolnim izkušnjam spolno obnašanje po odstranitvi mod močno zmanjša (239).

2.5.4.4 Miši brez gena za encim aromatazo

Encim citokrom P450 aromataza (Ar), produkt gena *cyp 19*, katalizira proces aromatizacije androgenih hormonov v estrogene hormone (240). Encim Ar je prisoten v področjih možganov, ki večinoma uravnavajo razmnoževanje. Visoko količino encima Ar so izmerili v področjih možganov, kot so: amigdala, spodnje jedro končne strije, ventromedialni hipotalamus, predoptično področje, v nekaterih ostalih delih vmesnih možganov ter hipokampusu in možganski skorji (241, 242). Za proučevanje delovanja encima Ar so na voljo miši z izbitim genom *cyp 19,* ki nosi zapis za encim Ar (*angl.* knockout, ArKO). Samci ArKO so neplodni, vendar se delež in čas, ko začne plodnost upadati, razlikujeta glede na linijo miši (243). Če so bili nastanjeni skupaj s samicami, je le majhen delež samcev ArKO uspel zaploditi potomce (244). Če so samci ArKO dobivali estradiol nekaj dni po rojstvu, se je njihova plodnost izboljšala in uspeli so zaploditi vsaj po tri gnezda (243). Kopulatorno obnašanje (vzpenjanje, vstopi penisa v nožnico in ejakulacija) je zmanjšano pri samcih ArKO. Tudi samice imajo moteno razmnoževanje. Lordoza samic ArKO je kljub dodajanju estradiola in progesterona veliko slabša od samic z normalnim

genotipom (125). Estrogeni očitno uravnavajo tudi agresivno obnašanje pri samcih. Samci ArKO so se namreč agresivno obnašali le ob dodatku estradiola. Delež samcev, ki so bili agresivni, je bil odvisen od tega, kdaj po rojstvu so začeli dobivati injekcije estradiola in koliko časa so jih dobivali. Na splošno je bila agresivnost večja, če je bilo injiciranje bližje dnevu rojstva in je trajalo dalj časa (243).

2.5.5 Model miši za proučevanje genetskih vplivov na spolno diferenciacijo in obnašanje

Par spolnih kromosomov (XX, XY) vpliva na nastanek spolnih razlik večinoma posredno, ker uravnava razvoj spolnih žlez in s tem določi, kateri spolni hormoni bodo v nadaljevanju vplivali na spolno diferenciacijo (11). Nekatere razlike med spoloma se pojavijo še pred razvojem spolnih žlez, zato so po vsej verjetnosti odvisne od različnega izražanje genetskih dejavnikov in ne od različnega vpliva spolnih hormonov. Tako so se na primer v popolnoma enakih pogojih (v odsotnosti spolnih hormonov) *in vitro* živčne celice zarodkov ženskega spola razvijale drugače kot živčne celice zarodkov moškega spola (68). Dewing in sod. (12) ugotavljajo, da se že pri desetem dnevu in pol po oploditvi (pred pričetkom razvoja spolnih žlez) v možganih moških in ženskih zarodkov miši izražajo tako različne količine kot tudi različne vrste genov. Prav ti geni in gen *Sry* bi lahko bili glavni kandidati, ki bi lahko vplivali na razlike med spoloma. Nedavno so ugotovili, da v možganih podgan gen *Sry* neposredno uravnava izražanje encima tirozin hidroksilaze, ki je udeležen pri proizvodnji dopamina in ima pomembno vlogo tudi pri uravnavanju različnih obnašanj povezanih z razmnoževanjem (245).

2.5.5.1 Model miši štirih različnih genotipov (angl. four core genotypes, FCG)

Miši FCG predstavljajo štiri različne skupine miši, pri katerih je spol oziroma prisotnost moških ali ženski spolnih žlez neodvisna od spolnega kromosoma Y. To so dosegli tako, da so gen *Sry* prenesli na avtosomni kromosom ali pa so ga mutirali, tako da ni več deloval in ni mogel sprožiti razvoja mod. S tako gensko manipulacijo so dobili samice s kromosomi XY in samce s kromosomi XX, ki jih lahko primerjajo s samci s kromosomi XY in s samicami s kromosomi XX. Raziskave pri miših FCG sicer ne morejo izključiti učinkov spolnih hormonov med fetalnim razvojem, saj imajo te miši prisotne spolne žleze, vendar pa lahko s primerjavo vseh štirih skupin proučujejo neposreden vpliv gena *Sry* in spolnih kromosomov na spolno diferenciacijo in obnašanje. Kar nekaj začetnih raziskav ni

uspelo potrditi hipoteze o neposrednem vplivu spolnih kromosomov na spolno diferenciacijo. Spolne razlike v motoričnih živcih v hrbtenjači, v anteroventralnem delu periventrikularnega jedra ter izražanje progestinskih receptorjev v hipotalamusu so nastale zaradi organizacijskih učinkov spolnih hormonov med fetalnim razvojem (246). Tudi raziskave spontane aktivnost v odprtem polju, obnašanja v dvignjenem labirintu in razlike v odzivu na elektrošok niso odkrile neposredne povezave vpliva spolnih kromosomov na spolno diferenciacijo (14). Vpliv spolnih kromosomov neodvisno od vrste spolnih žlez pa se je pokazal v raziskavah, ki so ugotavljale razlike v izražanju tirozin hidroksilaze (247), vazopresina (15, 68), odzivu na bolečino (248) in pri učenju navad (13). Prav tako se je pri analizi socialnega obnašanja pokazalo, da miši XX manj ovohavajo in negujejo vsiljivca kot miši XY, ne glede na to ali imajo jajčnike ali moda (14). Tudi pri starševskem in agresivnem obnašanju se je pokazal vpliv spolnih kromosomov na razlike v obnašanju, vendar samo pri samicah. Samice XX so hitreje prinesle mladiče v gnezdo kot ostale tri skupine miši (samice XY, samci XX in samci XY). Po dodanem testosteronu je manjši delež samic XX izražal agresivnost v primerjavi z ostalimi skupinami miši. To pomeni, da so na razlike v obnašanju vplivali tako spolni kromosomi kot tudi spolni hormoni (15). Verjetno so najobetavnejše raziskave, kjer bi lahko opažanja prenesli celo na človeka, raziskave nekaterih avtoimunskih bolezni. Avtoimunski bolezni kot sta multipla skleroza in sistemski lupus eritematosus se pojavljata pri ženskah pogosteje kot pri moških (249). Podobne razlike med spoloma so našli pri miših z umetno povzročenim avtoimunskim encefalomielitisom, ki služijo kot model za multiplo sklerozo. V odsotnosti hormonov so pri samicah XX našli težje histopatološke spremembe in bolezen je hitreje napredovala kot pri samicah XY (16, 250). Tudi pri modelu miši za sistemski lupus eritematosus so našli pri samicah XX večje patološke spremembe na ledvicah kot pri samicah XY in samice XX so poginile hitreje kot samice XY (250).

2.5.6 Proučevanje vzorcev obnašanja miši, ki so podobni simptomom duševnih motenj pri človeku

Duševne motnje se pri človeku kažejo kot spremembe duševnih procesov (miselni, motivacijski, čustveni, spomin). Čustva so z vidika psihologije stanja, ki izražajo človekov vrednostni sistem do zunanjega sveta in do samega sebe ter usmerjajo obnašanje in omogočajo prilagoditev različnim situacijam. Ker so to zelo vrstno specifični in osebni procesi, se moramo pri raziskovanju čustev z živalskimi modeli izogibati

antropomorfizmu, pripisovanju človeških lastnosti živalim. Bolj kot čustva, opisujemo v takih raziskavah odziv, obnašanje živali ali spremembo fiziološkega parametra pri živali. Namesto izraza "modeli miši za duševne motnje" je zato bolj primeren izraz "poskusi, s katerimi proučujemo odzive, podobne simptomom duševnih motenj". Ker je delovanje živčnega sistema in nevrotransmiterjev podobno pri miših in človeku, se v raziskavah uporabljajo tudi zdravila za zdravljenje simptomov duševnih motenj. Glede na to, katero zdravilo je imelo vpliv na rezultate v poskusih, so poskuse poimenovali kar po simptomu, ki ga zdravijo s tem zdravilom, na primer poskus za proučevanje tesnobe, depresije, shizofrenije (109).

2.5.6.1 Proučevanje vzorcev obnašanja miši, ki so podobna tesnobi pri človeku

Tesnoba oziroma anksiozna motnja se pojavljajo pri ljudeh v okviru različnih duševnih motenj kot so: fobije, obsesivno-kompulzivne motnje, napadi panike itd. (251). Za proučevanje stanj, ki so podobna tesnobi pri človeku, uporabljamo poskuse, kjer miši izpostavimo različnim stresnim situacijam in situacijam, ki izzovejo notranji spor (konflikt) med željo po soočenju, približevanju in željo po umiku. Kadar so miši izpostavljene akutnemu stresu, se lahko odzovejo z ultrazvočnim oglašanjem in/ali s presenečenjem, ki se lahko konča z nepremičnim položajem ali zamrznitvijo. Akutni stres lahko predstavlja močan, nezaželen dražljaj, nov objekt ali subjekt ali kakšno drugo situacijo, kjer gre za spor med željo po približevanju in željo po umiku. Želja po približevanju (raziskovanju) in želja po oddaljevanju se najbolj izrazi v poskusu odprtega polja, poskusu svetlo/temnega prostora in v dvignjenem labirintu (252). Dvignjen labirint v obliki križa je sestavljen iz dveh zaprtih in dveh odprtih krakov. Miši so po naravi zelo radovedne živali, vendar se raje zadržujejo v temnih in zaprtih kot v svetlih in odprtih prostorih. Odprti krak je zato privlačen za približevanje, raziskovanje, vendar hkrati predstavlja tudi večjo grožnjo in tveganje kot zaprti krak labirinta. Če so mišim dali anksiolitike, ki se uporabljajo za zmanjševanje tesnobe pri človeku, se je povečalo število vstopov in čas nahajanja v odprtem kraku (109). Čeprav se na splošno tesnoba in depresivne motnje bolj pogosto pojavljajo pri ženskah kot pri moških (253), je iz raziskav podgan in miši težko posplošiti, pri katerem spolu se v večji meri pojavlja obnašanje podobno tesnobi. Nekatere raziskave so uspele potrditi razlike med spoloma, pri drugih raziskavah pa razlik med spoloma niso ugotovili. Prav tako so bile razlike med spoloma odvisne tudi od vrste poskusa, ki so ga naredili. V nekaterih poskusih so kazale samice

povečano tesnobo, medtem ko so v drugih poskusih kazali samci povečano tesnobo (254, 255). Pri nastanku in uravnavanju razlik med spoloma so zelo pomembni spolni hormoni. Posebno pri samicah, kjer se spolni hormoni spreminjajo s ciklusom, se tudi odziv v poskusih temu primerno spreminja. Največjo stopnjo tesnobnega obnašanja v dvignjenem labirintu so opazili pri samicah miši v diestrusu, medtem ko je bila najmanjša stopnja tesnobnega obnašanja v metestrusu, ko je bilo v krvi največ progesterona (256). Tudi pri samcih testosteron vpliva na obnašanje v dvignjenem labirintu. Na splošno deluje testosteron anksiolitično (zmanjšuje tesnobo), vendar ima večji učinek nearomatiziran v obliki dihidrotestosterona kot pa aromatiziran v obliki estradiola. Povečano izločanje testosterona se pojavi med prekopulativno fazo, ko njegov anksiolitični učinek še dodatno pripomore k uspešnejši paritvi (257). Spolni hormoni v fetalnem obdobju so prav tako pomembni pri nastanku spolnih razlik v obnašanju podobnemu tesnobi. Aromatiziran testosteron v času fetalnega razvoja vpliva na organizacijo živčnega sistema, ki uravnava tesnobno obnašanje pri samcih. Samci, ki so jim odstranili moda takoj po rojstvu, kažejo v odraslem obdobju tesnobno obnašanje podobno samicam (255). V uravnavanje in izražanje tesnobe niso vključeni samo spolni hormoni, ampak v tem procesu sodeluje celoten nevroendokrini sistem. Tako so na primer pri osebah (258, 259) in živalih (260) s povečanim izražanjem tesnobe odkrili povečano delovanje celotne stresne osi in povečano količino stresnih hormonov v krvi. Vse skupaj vpliva na sistem nevrotransmiterjev, ki v nadaljevanju uravnavajo odgovor živčnega sistema.

3 Materiali in metode

3.1 Poskusne živali in načrtovanje poskusov

Raziskava je bila narejena na miših, *Mus musculus*, linije C57BL/6J, brez spremenjenega genotipa (divji tip miši; *angl.* wild type, WT) in s spremenjenim genotipom (miši homozigotne za izbiti gen za SF-1; SF-$1^{-/-}$, *angl*. knockout, SF-1KO). Gensko spremenjene miši so bile prvotno vzgojene v laboratoriju dr. Keitha Parkerja na Univerzi Duke v Severni Karolini, ZDA. Opazovali smo samice in samce SF-1KO in kontrolne samice in samce WT, ki smo jim predhodno odstranili spolne žleze. Dovoljenje za vse poskuse je izdala Veterinarska uprava RS (številka dovoljenja 323-02-723/2004/2).

Opazovali smo štiri ločene skupine miši:

1. skupino (7 samic WT, 8 samcev WT, 7 samic SF-1KO, 7 samcev SF-1KO) smo opazovali brez dodanih spolnih hormonov v naslednjem zaporedju poskusov:
    - dvignjen labirint;
    - vohalno prepoznavanje;
    - labirint Y;
    - socialno prepoznavanje;
    - moško spolno obnašanje;
    - agresivnost do samcev brez vohalnih betičev.
2. skupino (7 samic WT, 7 samcev WT, 6 samic SF-1KO, 7 samcev SF-1KO) smo opazovali po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu v naslednjem zaporedju poskusov:
    - vohalno prepoznavanje;
    - labirint Y;
    - socialno prepoznavanje;
    - žensko spolno obnašanje.
3. skupino (6 samic WT, 7 samcev WT, 7 samic SF-1KO, 7 samcev SF-1KO) smo opazovali po vstavljenem vsadku s testosteronom v naslednjem zaporedju poskusov:
    - vohalno prepoznavanje;
    - labirint Y;

- socialno prepoznavanje;
- moško spolno obnašanje;
- agresivnost do samcev brez vohalnih betičev.

4. skupino (7 samic WT, 9 samcev WT, 9 samic SF-1KO, 11 samcev SF-1KO) smo opazovali brez dodanih spolnih hormonov v poskusih starševskega obnašanja; po tem poskusu smo 7 samicam WT, 9 samcem WT, 7 samicam SF-1KO, 9 samcem SF-1KO vstavili testosteronski vsadek in jih opazovali za agresivno obnašanje do samcev brez vohalnih betičev.

3.1.1 Vzreja živali

Vse poskusne miši so bile vzrejene v lastnem hlevu in parjene več kot 10 generacij. Vzreja je potekala v polikarbonatnih kletkah, na nastilu iz lesenih opilkov (Lignocel, Rosenberg, Nemčija) in pod standardnimi pogoji: temperatura 20–25° C, vlažnost 40–60 %, umetna osvetlitev s ciklom svetlobe: teme (12 : 12 ure). Živali so bile hranjene s krmo brez fitoestrogenov (Harlan Teklad 2016, Velika Britanija) in vodo z dodatkom klorovodikove kisline (1mL HCl/500mL vode). Hrano in vodo so imele stalno na voljo (*ad libitum*).

3.1.2 Pridobivanje in priprava živali za poskus

Miši SF-1KO smo pridobili tako, da smo parili miši, heterozigotne za izbiti gen za SF-1 ($SF\text{-}1^{+/-}$). Vsi mladiči so takoj po rojstvu prejemali podkožne injekcije (*s.c.*) mešanice kortikosteroidov (400 μg/mL hidrokortizona, 40 ng/mL deksametazona in 25 ng/mL fludrokortizon acetata) raztopljenih v koruznem olju. Dnevno količino 50 μL mešanice so prejemali vsak dan do genotipizacije.

Po genotipizaciji smo mladičem SF-1KO presadili nadledvično žlezo (99). Nadledvično žlezo smo dobili po dekapitaciji samice divjega tipa (*angl*. wild type, WT) iz istega gnezda ali samice WT, ki ni odstopala v starosti za več kot 3 dni. Prejemniku nadledvične žleze smo naredili vbodno rano z iglo (21G x 19/16'' 0,8 x 40 mm, Novico, Italija) v levem podpazdušnem področju. Obe nadledvični žlezi smo nežno izolirali s pinceto in ju vstavili skozi vbodno rano pod kožo. Isti postopek, le brez presaditve nadledvične žleze, smo naredili tudi na miših WT. Po presaditvi so miši SF-1KO in miši WT prejemale kortikosteroide še 9., 12. in 16. dan starosti.

Samico smo odstranili, ko so bili mladiči stari 21 dni, in jih pustili skupaj do 25. dneva (± 2 dni) starosti. Pri 25. dnevu (± 2 dni) starosti smo mišim WT operativno odstranili spolne žleze. Miši SF-1KO so bile podvržene podobnemu operativnemu posegu, pri katerem smo naredili samo zarezo, brez odstranitve spolnih žlez, saj jih zaradi neaktivnega gena za SF-1 nimajo (poglavje 3.1.2.2). Miši so bile skupaj do 30. dne starosti (± 1 dan), ko smo jih izolirali v manjše kletke (35 x 15 x 13 cm). S poskusi obnašanja smo začeli, ko so bile miši stare 9–13 tednov.

3.1.2.1 Določanje genotipa živali

Za določitev genotipa živali smo uporabili metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR). Vsakemu mladiču, staremu 4–6 dni smo odvzeli košček prsta. Z odvzemom tkiva različnih prstov so bile živali tudi označene s številkami 1–10, glede na položaj prsta. Tkivu smo dodali 200 µL pufra za razgradnjo (Taq DNA lysis buffer, Promega, WI, ZDA) in 15 µL proteinaze K (15 mg/mL, Sigma), ga pustili čez noč na stresalniku pri 55° C in 400 obr/min (Thermomixer, Compact, Eppendorf). Odvzeli smo 3 µL razgrajenega tkiva, dodali 50 ng vsakega oligonukleotidnega začetnika in dodali sterilno, destilirano vodo do končne količine 10 µL. Pri 95° C smo dodali 10 µL mešanice nukleotidov in polimeraze DNK (Promega, WI, ZDA) in tako zmanjšali nastanek nespecifičnih produktov PCR. Uporabili smo oligonukleotide začetnike SF-1 F 5'-ACAAGCATTACACGTGCACC-3' in SF-1 R 5'-TGACTAGCAACCACCTTGCC-3' za določitev alela WT, SF-1-neo R 5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC-3' za določitev alela SF-1KO in za določitev prisotnosti gena *Sry* začetnika F 5'-AGGCGCCCCATGAATGCATT-3' in R 5'-TCCATGAGGCTGATATTTATAG-3'.

3.1.2.2 Odstranitev spolnih žlez pri živalih divjega tipa in operacije gensko spremenjenih živali

Vsaka miš je pred operacijo prejela *s.c.* injekcijo 50 µl mešanice anestetikov: Ketamina (Vetoquinol Biowet, Gorzowie, Poljska, 100 µg/g telesne mase), Acepromazina (Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA, ZDA, 2 µg/g telesne mase) in Xilazina (Chanelle Pharmaceuticals Ltd., Loughrea, Irska, 10 µg/g telesne mase). Anestezirani miši smo populili dlako in razkužili operativno področje z alkoholnim robčkom (PDI, NY, ZDA). Samicam smo naredili sredinsko zarezo, kjer poteka bela črta (*linea alba*) in skozi odprtino odstranili jajčnike, jajcevode ter del rogov maternice. Samcem smo naredili zarezo na

vsaki strani dimelj in skozi odprtino odstranili moda z nadmodkom ter del semenske povesme. Miši SF-1KO smo prav tako anestezirali in naredili kirurško rano glede na to, kakšnega genetskega spola je bila miš. Rane smo zašili z resorbtivno kirurško nitjo 6/0 (Safil, Braun, Esculap, Tuttlingen, Nemčija). Po posegu je miš prejela protibolečinsko terapijo, *s.c.* 1–2 injekciji po 50 µL butorfanola v razmiku 4–8 ur (Turbogesic, Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA, ZDA, 3 mg/kg telesne mase).

3.2 Hormoni in njihova priprava

Za ohranjanje življenja miši brez gena za SF-1 smo uporabili mešanico kortikosteroidnih hormonov. Za poskuse smo uporabili spolne hormone testosteron, estradiol benzoat in progesteron. Vsi hormoni za injiciranje so bili zmešani s koruznim oljem (Bimal, Wels, Avstrija), ki smo ga predhodno prefiltrirali skozi celuloznoacetatno filtrirno membrano s porami premera 0,2 µm (Sartorius, Goettingen, Nemčija).

3.2.1 Priprava kortikosteroidnih hormonov

Mešanico kortikosteroidov smo pripravili iz:

- hidrokortizona (H4001, Sigma, Steinheim, Nemčija);
- deksametazona (Deksametazon 21-fosfat, D1159, Sigma, Steinheim, Nemčija);
- fludrokortizon acetata (F6127, Sigma, Steinheim, Nemčija).

Hidrokortizon smo raztopili v 95 % etilnem alkoholu, v koncentraciji 4 mg/mL, deksametazon smo raztopili v sterilni destilirani vodi, v koncentraciji 4 mg/mL in fludrokortizon acetat smo raztopili v 95 % etilnem alkoholu, v koncentraciji 5 mg/mL. Za pripravo končne mešanice za injiciranje smo zmešali 18 mL koruznega olja, 2 mL hidrokortizona, 2 µL deksametazona in 2 µL fludrokortizon acetata. S tem smo dobili naslednje koncentracije kortikosteroidnih hormonov: 400 µg/mL hidrokortizona, 40 ng/mL deksametazona in 25 ng/mL fludrokortizon acetata.

3.2.2 Priprava testosteronskih vsadkov

Za testosteronske vsadke smo uporabili kristalinični testosteron (86500, Fluka) in medicinsko silikonsko cevko (Laboratory tubing, Silastic) 1,02 mm notranjega in 2,16 mm zunanjega premera, ki smo jo narezali na 10 mm dolge koščke. Cevko smo na eni strani zalepili z medicinskim silikonskim gelom (Medical Adhesive Silicone Type A Not Sterile,

Silastic, Mich., ZDA). Skozi odprtino na drugi strani smo cevko napolnili s kristaliničnim testosteronom.

3.2.3 Priprava estradiol benzoata

Estradiol benzoat (β-estradiol 3-benzoat, E-8515, Sigma, Steinheim, Nemčija) smo mešali s koruznim oljem, in sicer 1 mg/mL olja in ponovno redčili s koruznim oljem, da smo dobili mešanico za injiciranje s koncentracijo 1 μg /50 μL.

3.2.4 Priprava progesterona

Progesteron (P-0130, Sigma, Steinheim, Nemčija) smo mešali s koruznim oljem, da smo dobili mešanico za injiciranje s koncentracijo 16 mg /mL.

3.3 Dodajanje spolnih hormonov

Estradiol benzoat in progesteron smo poskusnim mišim dajali z injiciranjem pod kožo, medtem ko smo testosteron dali v obliki vsadkov. Estradiol benzoat in progesteron smo dajali tudi stimulusnim samicam, ki smo jih uporabili za opazovanje moškega spolnega obnašanja in od katerih smo uporabili nastil za poskus vohalnega prepoznavanja. Vsi načini dajanja spolnih hormonov so bili že opisani v literaturi in se uporabljajo za vzpodbuditev določenih vzorcev obnašanja (227, 261, 262).

3.3.1 Dodajanje estradiol benzoata in progesterona

Ženska spolna hormona, estradiol benzoat in progesteron, sta bila dodana z namenom vzpodbuditi spolno sprejemljivost poskusnih in stimulusnih miši ali v primeru vohalnih poskusov za pridobivanje ustreznih vonjav, feromonov. Hormona smo dajali v takem zaporedju, da sta čim bolj posnemala naravni spolni ciklus samice miši. To pomeni, da je bila miš spolno sprejemljiva na vsake štiri dni ali več. Hormona smo injicirali pod kožo (*s.c*), estradiol benzoat 48 ur in progesteron 4–8 ur pred poskusom (262). Vse stimulusne samice so dobile 1 μg estradiol bezoata in 1,6 mg progesterona. Poskusne miši so dobile 0,5 μg ali 1 μg estradiol bezoata in 0,8 mg ali 1,6 mg progesterona, kot je opisano v poglavju 3.5.5. Za pripravo nastila v poskusu vohalnega prepoznavanja so stimulusne samice dobile 1 μg estradiol bezoata 48 ur pred pobiranjem nastila in 1,6 mg progesterona 6–10 ur pred pobiranjem nastila.

3.3.2 Dodajanje kristaliničnega testosterona v obliki vsadkov

Kristalinični testosteron smo mišim dali v obliki vsadkov. Vsadek smo anesteziranim (poglavje 3.1.2.2) miši vstavili pod kožo, v podkožje na hrbtu med obema lopaticama. Miš je imela testosteronski vsadek najmanj en teden pred začetkom poskusa in ves čas poskusa do žrtvovanja.

3.4 Priprava stimulusnih živali

Stimulusne živali so živali, ki stimulirajo oziroma vzpodbudijo v določeni situaciji pri poskusni živali določen vzorec obnašanja. Vse stimulusne živali so bile miši divjega tipa. V naših poskusih smo uporabili naslednje stimulusne miši:

- stimulusne samice;
- stimulusne spolno izkušene samce;
- stimulusne samce z odstranjenimi vohalnimi betiči.

3.4.1 Priprava stimulusnih samic

Stimulusnim samicam smo predhodno zaradi lažjega nadzora spolnega ciklusa odstranili jajčnike in jim dodali estradiol benzoat in progesteron ali pa jih uporabili brez dodanih spolnih hormonov. Spolne žleze smo odstranili po puberteti, okoli 60. dneva starosti, po postopku, opisanem v poglavju 3.1.2.2. Po operaciji in ves čas poskusa so bile stimulusne samice nastanjene v skupinah po 3–5 miši skupaj. Stimulusne samice brez dodanih spolnih hormonov so bile uporabljene v poskusu socialnega prepoznavanja. Stimulusne samice po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu smo uporabili za pripravo nastila, v labirintu Y in za poskus moškega spolnega obnašanja. Hormone smo jim dodajali, kot je opisano v poglavju 3.3.1.

3.4.2 Priprava stimulusnih spolno izkušenih samcev

Kot spolno izkušene, stimulusne samce smo uporabili živali, ki so imele stik s spolno sprejemljivimi samicami in so intenzivno kazale vse oblike moškega spolnega obnašanja (zanimanje za samico, naskakovanje, kopulacijo in ejakulacijo). Uspešnost posameznega samca smo opazovali med parjenjem z različnimi stimulusnimi samicami in preverili ejakulacijo s prisotnostjo vaginalnega čepka. Uporabili smo tudi samce, ki so že v paritvah za druge namene zaplodili eno ali več gnezd. Vse stimulusne samce smo nekajkrat združili z različnimi spolno sprejemljivimi stimulusnimi samicami, da so si pridobili čim več

spolnih izkušenj. Ves čas poskusa so bili stimulusni samci izolirani. Stimulusne spolno izkušene samce smo uporabili za pripravo nastila za poskus vohalnega prepoznavanja, v labirintu Y in za poskus ženskega spolnega obnašanja. Uporabili smo 12 stimulusnih samcev.

3.4.3 Priprava stimulusnih samcev z odstranjenimi vohalnimi betiči

Samci z odstranjenimi vohalnimi betiči ne prepoznajo vonja nasprotnika in zato ne kažejo agresivnega obnašanja do nasprotnika. Ker imajo še vedno prisotne moške spolne žleze, s svojim vonjem vzpodbudijo agresivno obnašanje pri poskusni miši. Stimulusne samce z odstranjenimi vohalnimi betiči smo uporabili za opazovanje agresivnega obnašanja (263, 264).

Vohalne betiče smo odstranili odraslim samcem, starim 60. dni ali več. Miši smo anestezirali (poglavje 3.1.2.2), jim populili dlako po nosnem in čelnem delu glave in operativno področje razkužili z etilnim alkoholom. Naredili smo zarezo na sredini čelnega in nosnega dela lobanje. V splošni anasteziji smo zvrtali v čelno kost (rostralno od bregmanove fisure), na vsako stran sredinskega kostnega šiva, luknjo premera 2 mm. Luknje smo zvrtali s sterilnim zobnim svedrom (500 104 001 001 014, Dendia, Avstrija), ki smo ga vstavili v vrtalni stroj za graviranje (Proxxon, Niersbach, Nemčija). Skozi luknje smo z aspiracijo preko igle (21G x 1 9/16'' 0,8 x 40 mm, Novico, Italija) z odrezano konico in vstavljeno v brizgalko 60 mL (BD Plastipak, Becton Dickinson, Španija) posesali vohalne betiče. V prazen prostor smo dali košček sterilne pene (Gelita, Esculap) za hitrejše ustavljanje krvavitve. Po operativnem posegu je miš prejela 2–3 injekcije protibolečinske terapije butorfanol (3 mg/kg telesne mase) v razmiku 4 ur in okrevala najmanj 7 dni do začetka poskusov. Samci z odstranjenimi vohalnimi betiči so bili po operaciji in ves čas poskusa nastanjeni v skupinah po 3–5 miši, kar še dodatno vpliva na zmanjšanje agresivnosti. V poskusu smo uporabili 6 samcev z odstranjenimi vohalnimi betiči. Če je bil samec z odstranjenimi vohalnimi betiči med poskusom izpostavljen ugrizom poskusne živali, ga isti dan nismo več uporabili.

3.5 Poskusi obnašanja

V vseh poskusih obnašanja smo opazovali samice in samce brez gena za SF-1 (*angl.* knockout female, SF-1KOf in male SF-1KOm) ter samice in samce divjega tipa (*angl.* wild type female WTf in male WTm), ki smo jim predhodno odstranili spolne žleze. Vsi

poskusi so bili opravljeni ''na slepo'', tako da med opazovanjem opazovalka ni vedela, kakšnega genotipa in spola je poskusna miš. Ker so miši bolj aktivne ponoči, je bila večina poskusov opravljena v času temnega cikla, razen če ni navedeno drugače. Opazovali smo s pomočjo rdeče steklene žarnice, ki je z oddajanjem šibke rdeče svetlobe še omogočala opazovanje in hkrati ni motila dejavnosti miši. Opazovali smo štiri ločene skupine miši, kot je prikazano v poglavju 3.1. Za beleženje aktivnosti smo za vse poskuse, razen za žensko in moško spolno obnašanje, uporabili program Stopwatch+ (Version 1.5.1, Center for Behavioral Neuroscience, Atlanta, ZDA). Nekatere poskuse smo dodatno posneli z digitalno kamero (DCR-DVD 101E, Sony, Japonska). Mišim nekaj dni (2–3 dni, več dni pri opazovanjih agresivnosti) pred in med poskusom nismo menjali nastila, tako smo se izognili stresu, ki bi ga lahko povzročilo navajanje (označevanje z izločki) na novi nastil. Med poskusi ni bilo prisotnih rešetk s hrano in vodo, razen če ni navedeno drugače. Poskusi so bili opravljeni v čim bolj enakih časovnih razmikih. Med posameznimi poskusi je bil vsaj en dan premora. Pri agresivnem obnašanju tretje skupine miši in pri ženskem spolnem obnašanju je bilo zaporedje bolj natančno določeno, kar je opisano v nadaljevanju. Labirinta in lončke, ki smo jih uporabili na večjem številu miši, smo po vsakem opazovanju očistili in razkužili s 70 % etilnim alkoholom. S tem smo odstranili izločke miši (vonje), ki bi lahko motili naslednji poskus (125). Podrobnosti izvedbe posameznih poskusov so napisane v nadaljevanju.

3.5.1 Izvedba poskusa v dvignjenem labirintu

Dvignjen labirint se uporablja za ugotavljanje obnašanja podobnega tesnobi (109). Uporabili smo labirint v obliki križa, dvignjen 50 cm od tal in sestavljen iz dveh enako dolgih in širokih krakov (dolžina 66 cm in širina 5 cm), pravokotnih eden na drugega. Odprti krak je bil brez stene, zaprti krak pa je obdajala stena (višina 20 cm in dolžina 30 cm). Labirint je bil narejen iz črnega pleksi stekla, ki se ga enostavno umije in razkuži. Miši smo opazovali v prvih urah temnega cikla. Pred poskusom niso imele nobenih izkušenj z drugimi poskusi ali z drugimi mišmi. Labirint je bil postavljen tako, da je bilo okolje labirinta na vseh štirih straneh kar se da podobno. Labirint je bil obrnjen z zaprtimi kraki proti opazovalki in od nje oddaljen za približno 0,5 m. Poskusno miš smo dali na sredino labirinta in pričeli z opazovanjem. Poskus je trajal 5 min in vsako miš smo opazovali enkrat. Ocenjevali smo neposredno in s pomočjo programa Stopwatch+ merili:

- število vstopov in čas zadrževanja v zaprtem kraku;

- začetek vstopa, število vstopov in čas zadrževanja v odprtem kraku;
- število vstopov in čas zadrževanja v prostoru na sredini labirinta.

Nahajanje v odprtem ali zaprtem kraku smo ocenili, ko je miš z vsemi štirimi tačkami stala v enem ali drugem kraku. Kadar se je miš nagnila oziroma samo pogledala iz zaprtega kraka ali je samo z dvema tačkama stala v odprtem kraku, smo ocenili nahajanje v prostoru na sredini labirinta.

3.5.2 Izvedba poskusa socialnega prepoznavanja

S tem poskusom preverimo delovanje vohalnega sistema in socialnega spomina. Za stimulusno žival smo uporabili samico z odstranjenimi jajčniki, brez dodanih spolnih hormonov. Uporabili smo standardiziran poskus (15, 263), ki smo ga spremenili tako, da smo stimulusno samico zaprli v škatlico. Za spremembo poskusa smo se odločili, ker smo v prejšnjih raziskavah ugotovili povečano agresivnost miši SF-1KO do stimulusnih samic (265). Plastična škatlica (15 cm x 7 cm x 6 cm), z odprtinami premera 11–12 mm, je preprečila poškodbe stimulusne samice, stik in neposredno ovohavanje miši pa sta bila omogočena. Škatlico s stimulusno samico smo položili za 1 min v kletko poskusne živali in jo vzeli ven za 8 min. To smo ponovili 8-krat z isto stimulusno samico. V zadnji, 9. ponovitvi, smo dali v škatlico novo stimulusno samico in jo ponovno položili za 1 min v kletko poskusne živali. Ker smo pri tem poskusu vedno znova dajali v kletko isto stimulusno miš, bi si jo morala poskusna miš zapomniti in čas ovohavanja bi se moral vedno bolj krajšati. V 9. ponovitvi, ko smo dali v kletko novo stimulusno miš, pa bi se moral čas ovohavanja ponovno povečati. Opazovali smo neposredno, v prvih urah temnega cikla in s programom Stopwatch+ merili čas do prvega stika, število prihodov do stimulusne miši in čas ovohavanja stimulusne miši.

3.5.3 Izvedba poskusa v labirintu Y

S tem poskusom preverimo delovanje samo osnovnega vohalnega sistema (v nosni sluznici), brez vomeronazalnega organa (116, 125). Labirint je bil sestavljen iz treh zaprtih krakov iz črnega pleksi stekla, v obliki črke Y. Daljši krak labirinta (dolžina 46 cm, širina 10 cm in višina 20 cm) se je razcepil pod kotom 30° v dva krajša kraka (dolžina 37 cm, širina 10 cm in višina 20 cm). Oba krajša kraka sta se končala s prostorom (dolžina 8 cm, širina 10,5 cm in višina 20 cm), ki je bil pregrajen s preluknjano ploščo. V vsakem od prostorov je bila zaprta stimulusna miš, v enem spolno izkušen samec, v drugem spolno

sprejemljiva samica. Luknjice v pregradi so bile dovolj majhne, da so skozi njih prehajale vonjave, hkrati pa so preprečile neposreden stik med stimulusno in poskusno mišjo. Poskusna miš zato feromonov ni mogla zaznavati preko ustne votline in vomeronazalnega sistema, ampak jih je zaznavala samo preko nosne sluznice. Zaradi lažje definicije vstopa poskusne miši v krak s stimulusno mišjo je bila 12 cm od pregrade bela črta, glede na katero je opazovalka določila, kje se miš nahaja. Da bi zmanjšali vpliv labirinta (novo okolje) na poskus, smo miši dva dni navajali na labirint in jih tretji dan opazovali. Navajanje je potekalo 10 min, enako kot poskus, le da v labirintu ni bilo stimulusnih miši.
Miši smo opazovali v prvih urah temnega cikla. Svetloba je bila usmerjena na sredino labirinta, opazovalka je stala nad krakoma s stimulusnimi mišmi. Poskus je trajal 10 minut in vsako miš smo opazovali enkrat. Poskuse smo neposredno opazovali in s programom Stopwatch+ merili:

- začetek vstopa, število vstopov in čas zadrževanja v prostoru s stimulusnim samcem;
- začetek vstopa, število vstopov in čas zadrževanja v prostoru s stimulusno samico.

Za nahajanje miši v prostoru s stimulusno mišjo smo šteli, če je poskusna miš stala z vsemi štirimi tačkami čez belo črto, v prostoru pred ograjo.

3.5.4 Izvedba poskusa vohalnega prepoznavanja

Poskus vohalnega prepoznavanja je standardiziran poskus, s katerim preverimo delovanje celotnega vohalnega sistema, nosno sluznico in vomeronazalni organ (15, 116, 262).

Pred poskusom smo pripravili lončke in nastil z različnimi vonji. Lončke smo izdelali iz 50 mL samostoječih centrifugirk (TPP, Trasadingen, Švica), od katerih smo odrezali zgornji del s pokrovčkom dolžine 4 cm. V sredino pokrovčka smo izvrtali luknjo premera 11–12 mm. Tulec smo s stranjo brez pokrovčka prilepili s sekundnim lepilom na dno steklene posodice (zgornjega premera 6 cm in spodnjega premera 4,5 cm). Uporabili smo nastil (Lignocel, Rosenberg, Nemčija), ki je imel tri vonje: čisti nastil, nastil z vonjem samcev in nastil z vonjem samic. Vsakič smo pripravili 1600 mL nastila. Nastil z vonjem samcev smo dobili od štirih spolno izkušenih izoliranih samcev (poglavje 3.4.2). Vsak je imel v kletki po 400 mL nastila, ki ni bil zamenjan 4 dni. Peti dan smo nastil zbrali in ga dobro premešali ter napolnili lončke. Nastil z vonjem spolno sprejemljivih samic (poglavje 3.4.1) smo dobili po podobnem postopku, le da so bile 4 samice združene v eni kletki s 1600 mL

nastila. Samice so dobile estradiol benzoat in progesteron, kot je opisano v poglavju 3.3.1. Nastil prav tako ni bil menjan 4 dni. Peti dan smo ga zbrali, dobro premešali in napolnili lončke.

Za poskus smo uporabili prazno kletko velikosti (35 x 15 x 13 cm) in vanjo postavili tri lončke z nastilom različnega vonja. Lončki so bili enako oddaljeni med sabo. Kletka je bila pokrita s plastičnim pokrovom. Da bi zmanjšali vpliv novega okolja, smo miši dva dni navajali na kletko z lončki, tretji dan pa jih opazovali. Navajanje je potekalo enako kot poskus, le da je bil v vseh lončkih čisti nastil. Poskus je trajal 10 minut in vsako miš smo opazovali enkrat. Miši smo opazovali v prvih urah temnega cikla neposredno in s programom Stopwatch+ merili čas do začetka ovohavanja, število prihodov do lončka in čas ovohavanja posameznega lončka. Upoštevali smo samo dogodke, ko je poskusna miš ovohavala področje luknje lončka.

3.5.5 Izvedba poskusa ženskega spolnega obnašanja

Žensko spolno obnašanje smo opazovali pri vsaki živali sedemkrat. Med ponovitvami poskusa ni bilo manj kot 3 dni in ne več kot 6 dni premora. Miši smo opazovali 2–4 ure po začetku temnega cikla, v akvarijskih posodah brez nastila. Da bi se poskusne miši privadile novega okolja, smo jih prestavili v akvarijske posode najmanj 1 uro pred začetkom poskusa. Poskusnim mišim smo 48 ur pred poskusom dodali estradiol benzoat in 4–8 ur pred poskusom progesteron. V prvi treh poskusih smo injicirali 0,5 μg estradiol benzoata in 0,8 mg progesterona na miš, v naslednjih štirih poskusih smo odmerke povišali na 1 μg estradiol benzoata in 1,6 mg progesterona na miš. Za povišanje odmerka smo se odločili, ker v literaturi ni bilo znanih podatkov o obnašanju miši SF-1KO. V primeru zmanjšane občutljivosti miši SF-1KO bi bili lahko nižji odmerki premajhni, da bi vzpodbudili žensko spolno obnašanje.

Poskuse smo opazovali in opažanja neposredno zapisovali. Vsako opazovanje smo posneli s kamero. Poskus se je začel tako, da smo v akvarijsko posodo dali spolno izkušenega stimulusnega samca (poglavje 3.4.2). Če samec po najmanj 5 minutah ni pokazal zanimanja za poskusno miš, smo ga zamenjali z novim samcem in postopek ponovili, dokler nismo dobili ustreznega samca, ki je pokazal zanimanje za poskusno žival in jo poskusil naskočiti. Uporabljali smo 12 stimulusnih samcev. V primeru, da se je poskusna miš aktivno branila samca in ni kazala nobene spolne sprejemljivosti, smo poskus prekinili

po 15. neuspešnih samčevih naskokih. Ker pri osmih poskusih nismo uspeli dobiti ustreznega samca oziroma noben od samcev ni pokazal vsaj 15 poskusov naskokov, smo te poskuse izključili iz obdelave podatkov. Spolno sprejemljivost smo ocenjevali od 1 do 5 po kriterijih, ki so navedeni v nadaljevanju. Če je bila spolna sprejemljivost ocenjena z 1 ali več, je poskus trajal do ejakulacije stimulusnega samca ali največ 20 minut. Če je samec ejakuliral, je imel pred naslednjim poskusom najmanj dan odmora.

Ocenjevali in beležili smo:

- število poskusov naskokov (za poskus naskoka smo šteli; kadar se je samec s sprednjimi tačkami poskušal vzpeti na ledveni predel poskusne miši, ki ni kazala spolne sprejemljivosti, je bežala, se dvignila od tal ali se celo branila);
- število naskokov (za naskok smo šteli, ko je bila poskusna miš z vsemi štirimi tačkami na tleh, stimulusni samec pa jo je s sprednjimi tačkami objemal v ledvenem predelu hrbta; naskok se je lahko nadaljeval samo s potiskanjem medenice ali pa s kopulacijo in potiskanjem medenice; pri vsakem naskoku smo ocenili tudi spolno sprejemljivost);
- spolno sprejemljivost poskusne miši smo opisovali kot usločenje hrbta (lordoza; L); ocenili smo jo s pomočjo lestvice od 1 do 5 po Burns-Cusato in sod. (36).

Zaradi lažjega ocenjevanja smo definicije priredili obnašanju naših poskusnih miši in spolno sprejemljivost ocenjevali po naslednjih kriterijih:

1 = miš se ob poskusu naskoka za kratek čas ustavi, vendar hitro konča stik s samcem;
2 = miš pusti samcu, da se vzpne na ledveni del, vendar se ob poskusu kopulacije odmakne in tako prekine kopulacijo;
3 = miš pusti samcu, da se vzpne na ledveni del; ko poskuša kopulirati, se premika in lahko tudi oglaša; kopulacijo prekine stimulusni samec;
4 = miš pusti samcu naskok in kopulacijo, se pri tem lahko oglaša in lahko tudi rahlo premika; kopulacijo prekine samec;
5 = miš pusti samcu naskok in kopulacijo; med kopulacijo je pri miru in se ne oglaša; kopulacijo prekine samec.

Po končanih opazovanjih smo iz posnetkov še enkrat ocenili lordozo poskusnih miši in preverili ostale vzorce obnašanja, zabeležene med opazovanjem. Iz ocen lordoze smo izračunali količnik lordoze (LQ), ki je predstavljal delež naskokov z dobro lordozo (4 ali

5), glede na vse poskuse naskokov in naskoke. Količnik lordoze (LQ) smo izračunali z enačbo:

$$LQ = ((L4 + L5) / \text{število vseh poskusov naskokov} + \text{število vseh naskokov})* 100$$

Poleg tega smo beležili še število ejakulacij in prisotnost agresivnega obnašanja poskusne ali stimulusne miši.

3.5.6 Izvedba poskusa moškega spolnega obnašanja

Moško spolno obnašanje smo opazovali po standardnem protokolu (197, 262). Miši so bile opazovane 2–3 ure po začetku temnega ciklusa v treh poskusih, v treh zaporednih dneh. V primeru ejakulacije je imela poskusna miš dan odmora. Miši smo opazovali 30 minut, razen v primeru ejakulacije ali agresivnega obnašanja, ko smo poskus prekinili prej. Prvo skupino miši (poglavje 3.1) smo opazovali v akvarijskih posodah (26 x 42 x 26 cm) brez nastila, kamor smo živali preselili eno uro pred poskusom. Tretjo skupino miši (poglavje 3.1) smo opazovali v polikarbonatnih kletkah (35 x 15 x 13 cm), kjer so bile živali ves čas nastanjene. Tik pred poskusom smo zaradi opazovanja vstopov penisa v nožnico odstranili nastil, ki smo ga po poskusu vrnili v kletko. Pod kletko ali akvarijsko posodo smo postavili ogledalo obrnjeno proti opazovalki, ki je omogočalo natančno opazovanje kopulacije med poskusom. Moško spolno obnašanje smo opazovali s stimulusnimi samicami (poglavje 3.4.1). Tik pred poskusom smo jih na kratko izpostavili spolno izkušenim stimulusnim samcem in preverili njihovo spolno sprejemljivost. Uporabili smo samo samice, ki so kazale dobro spolno sprejemljivost. V primeru ejakulacije med poskusom jih isti dan nismo več uporabili. Poskuse smo neposredno opazovali in ocenjevali ter jih posneli s kamero.

Ocenjevali in beležili smo:

- prisotnost ali odsotnost agresivnosti;
- število poskusov naskokov;
- število nepravilnih naskokov na področje glave;
- število popolnih in nepopolnih naskokov; pri popolnih naskokih poskusna miš objema celotni ledveni predel hrbta stimulusne samice in čim bolj približa svoje genitalno področje h genitalnem področju stimulusne samice; pri nepopolnih naskokih poskusna miš objema samo križni predel hrbta stimulusne samice;

opazovali smo tudi, ali med naskokom oziroma potiskanjem medenice poskusna miš dvigne eno nogo;

- število potiskov medenice med naskokom;
- število vstopov penisa v nožnico.

3.5.7 Izvedba poskusa starševskega obnašanja

Za opazovanje starševskega obnašanja smo uporabili podoben protokol kot v raziskavi Gatewood in sod. (15). Poskus je potekal 1–2 uri pred začetkom temnega cikla. Vsaka miš je bila opazovana v dveh poskusih, prvi dan 20 min in naslednji dan 15 min. Poskus je potekal v polikarbonatni kletki (35 x 15 x 13 cm), kjer je bila poskusna miš nastanjena. Kletka je bila pokrita z rešetkami, vendar brez hrane in vode, ki bi lahko motila poskus. Uporabili smo 3 mladiče moškega spola, stare 1–3 dni. Za material za gnezdo smo uporabili natrgane koščke papirnate brisače. Mladiče in material za gnezdo smo položili na nasprotno stran, kjer je imela poskusna miš svoje počivališče oziroma gnezdo. V primeru kakršnekoli agresivnosti smo poskus prekinili.

Poskuse smo neposredno opazovali in s programom Stopwatch+ merili:

- prvi stik z mladiči;
- začetek, število in trajanje gradnje gnezda;
- začetek prinašanja prvega, drugega in tretjega mladiča do svojega počivališča, v narejeno gnezdo ali na obrobje gnezda;
- začetek, število in trajanje negovanja (ovohavanje, lizanje) mladičev;
- začetek, število in trajanje čepenja nad mladiči; to obnašanje je podobno obnašanju samice v laktaciji, ko mladiče s potiskanjem pod telo približa seskom, jih neguje in tako spodbudi k sesanju;
- prisotnost agresivnosti do mladičev.

Na koncu opazovanja smo ocenili še obliko gnezda:

0 = papirčki ostanejo na mestu ali so razmetani;
1 = papirčki na kupu in brez oblike;
2 = slabo oblikovano in plitko gnezdo;
3 = lepo oblikovano in globoko gnezdo.

3.5.8 Izvedba poskusa agresivnega obnašanja

Poskusi so potekali po standardnem protokolu, kjer je poskusna miš nastanjena v svoji (domači) kletki, stimulusni samec pa predstavlja vsiljivca, ki vzpodbuja agresivno obnašanje pri poskusni miši (*angl*. resident-intruder test) (15, 263). Nastil v kletki poskusne miši ni bil menjan vsaj 5 dni in ves čas poskusa. Na ta način se v kletki ohranja vonj, ki vzpodbuja k agresivnosti in zaščiti lastnega ozemlja. Za stimulusno miš smo uporabili samca brez vohalnih betičev (poglavje 3.4.3). Poskus je trajal največ 15 minut oziroma 2 minuti od začetka agresivnega obnašanja. Če se je pokazalo agresivno obnašanje proti koncu 15. minute, smo opazovali še dodatni 2 minuti. Vsaka miš je bila opazovana trikrat, v treh zaporednih dneh. Poskuse smo opazovali neposredno in s programom Stopwatch+ beležili aktivnosti ter jih posneli s kamero. Poskuse, kjer je bilo veliko agresivnosti, smo še enkrat ocenili iz posnetkov.

S programom Stopwatch+ smo merili:

- začetek in število ugrizov;
- začetek in število napadov (poskusna miš s tačkami udari ali se zažene v nasprotnika);
- začetek, število in trajanje agresivnega negovanja (poskusna miš puli dlake ali kakorkoli vidno nadleguje nasprotnika, ki pri tem največkrat cvili ali pa se umika poskusni miši);
- začetek in število vibriranj z repom;
- začetek, število in trajanje prerivanja (obe miši stojita na zadnjih tačkah in se s sprednjimi prerivata);
- začetek, število in trajanje preganjanja (poskusna miš podi nasprotnika po kletki);
- začetek in število podrejene drže (miš se postavi na zadnje tačke in razkrije trebuh).

Prvo skupino miši smo opazovali brez dodanih spolnih hormonov po poskusih moškega spolnega obnašanja. Po poskusu moškega spolnega obnašanja so miši ostale v akvarijskih posodah z nastilom, ki ni bil menjan 5 dni. Poskusi agresivnosti so bili narejeni po zgoraj opisanem protokolu, 1–2 uri pred začetkom temnega cikla.

Tretjo skupino miši smo opazovali po poskusu moškega spolnega obnašanja. Miši v tej skupini so imele vsadke s testosteronom. Po zadnjem poskusu moškega spolnega obnašanja, takoj naslednji dan, so bile miši opazovane za agresivno obnašanje. Poskusi so

bili narejeni po zgoraj opisanem protokolu, v fazi temnega ciklusa in v polikarbonatnih kletkah (35 x 15 x 13 cm), kjer so bile miši opazovane tudi za moško spolno obnašanje. Nastil smo menjali 5–7 dni pred začetkom poskusa spolnega obnašanja, tako da so bili poskusi spolnega in agresivnega obnašanja narejeni na istem nastilu, ki ni bil menjan 8–10 dni.

Četrto skupino miši smo opazovali brez dodanih spolnih hormonov za starševsko obnašanje. Po teh poskusih smo mišim vstavili testosteronske vsadke in jih po 2.–3. tednih opazovali še za agresivno obnašanje. Poskusi agresivnosti so bili narejeni po zgoraj opisanem protokolu, 1–2 uri pred začetkom temnega cikla, v akvarijskih posodah, kjer nastil ni bil menjan 5 dni.

3.6 Žrtvovanja

Po končanih poskusih so bile miši žrtvovane pri starosti približno 6 mesecev. Mišim smo injicirali mešanico anestetikov (poglavje 3.1.2.2). Ko so bile miši v globoki anesteziji, smo s škarjami odprli prsni koš ter z injekcijo in iglo (0,8 x 40 mm 21G x 1 9/16’’), ki smo jo prej preprali s heparinom (1U/µL, Sigma), iz levega prekata srca odvzeli kri. Preostalo kri smo s pomočjo peristaltične črpalke (Ecoline ISM1076, Ismatec SA, Zürich, Švica) pri pretoku 5 mL/min sprali iz ožilja s 0,05 M fosfatnim pufrom z Nacl (pH 7,3 in 4° C) (*angl*. phosphate buffered saline, PBS). Spiranje smo nadaljevali z raztopino 4 % paraformaldehida v 0,05 M PBS, ki je tkivo učvrstila. Po končani fiksaciji smo odvzeli možgane, hipofizo, vranico in nadledvični žlezi. Tkiva žrtvovanih živali smo shranili in so bila namenjena drugim raziskavam.

3.7 Statistična obdelava podatkov

Vse statistične analize smo izvedli s pomočjo statističnega programa NCSS (Version 2005, Number cruncher statistical systems, Kaysville, Utah, ZDA).

Z metodo analize variance ponavljajočih meritev smo analizirali tiste poskuse, kjer smo iste vzorce obnašanja opazovali večkrat (spolno, agresivno, starševsko obnašanje ter socialno prepoznavanje). Neodvisni spremenljivki sta predstavljali spol in genotip poskusnih miši, za odvisne spremenljivke pa smo vzeli število, trajanje in čas do začetka izvajanja aktivnosti. Za poskuse, kjer ni bilo ponavljajočih meritev (dvignjen labirint, labirint Y, vohalno prepoznavanje) smo uporabili analizo variance z dvema faktorjema.

Spol in genotip poskusnih miši smo vzeli za neodvisni spremenljivki, za odvisne spremenljivke pa smo vzeli število, trajanje in čas do začetka izvajanja aktivnosti.

Kadar so poskusi zaradi agresivnosti ali ejakulacije pri spolnem obnašanju trajali različno dolgo časa, smo število aktivnosti preračunali na enotno dolžino časa (229, 266). Pri poskusu ženskega spolnega obnašanja 8 poskusov od 189 nismo uspeli opraviti (poglavje 3.5.5), zato smo jih izključili iz obdelave podatkov.

V poskusu vohalnega prepoznavanja in labirintu Y smo pred statistično analizo vse odvisne spremenljivke izrazili v deležih. V vohalnem prepoznavanju smo za vsako žival izračunali (sešteli) čas ovohavanja vseh treh lončkov in število prihodov do vseh treh lončkov. Čas ovohavanja ali število prihodov do posameznega lončka smo izrazili v deležu glede na čas ovohavanja ali število prihodov do vseh treh lončkov. Podoben postopek smo uporabili tudi pri labirintu Y. V poskusu vohalnega prepoznavanja nas je zanimalo, ali posamezne skupine miši razlikujejo lonček z vonjem od lončka brez vonja in lonček z vonjem samic od lončka z vonjem samcev. Pri vsaki skupini miši smo s parnim t-testom primerjali čas ovohavanja dveh različnih lončkov. Podobno smo analizirali obnašanje v labirintu Y, kjer smo s parnim t-testom primerjali čas zadrževanja v prostoru s stimulusno samico in čas zadrževanja v prostoru s stimulusnim samcem.

Pri analizi vseh rezultatov smo razlike med spoloma znotraj posameznega genotipa naknadno določili s Fisherjevim LDS *post-hoc* testom. Vse razlike smo sprejeli za statistično značilne, če je bila vrednost p nižja od 0,05.

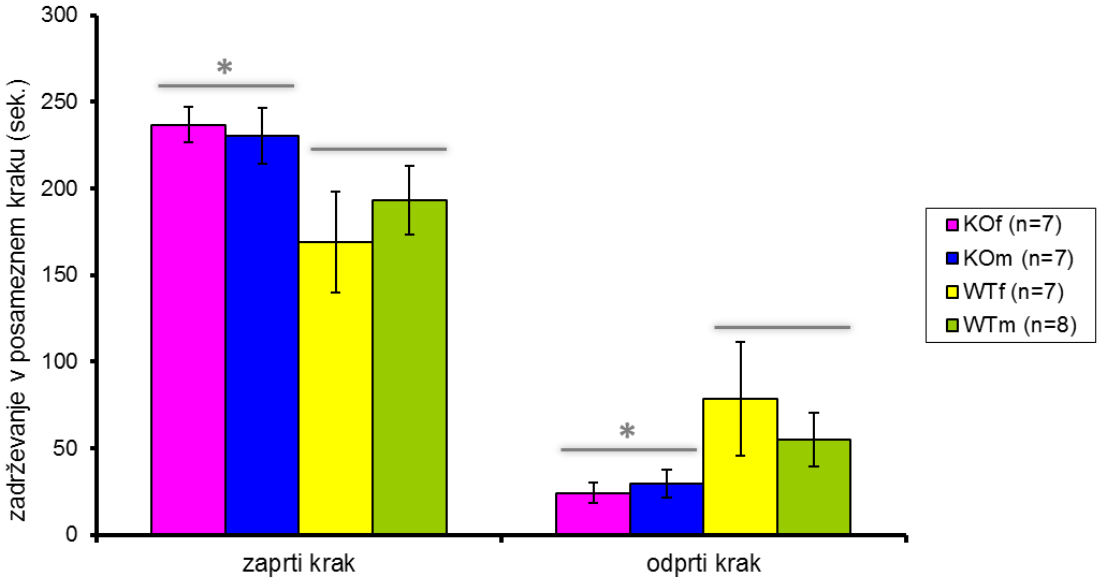
Rezultati v grafih in tabelah so prikazani kot povprečne vrednosti, izračunane iz vseh ponovitev poskusov pri posameznih živalih skupaj s standardno napako. Zaradi boljše preglednosti so miši brez gena za SF-1 v legendah grafov in tabel označene kot KOf (*angl.* female, samica) in KOm (*angl.* male, samec), miši divjega tipa (*angl.* wild type) pa kot WTf (*angl.* female, samica) in WTm (*angl*. male, samec).

4 Rezultati

4.1 Obnašanje miši brez dodanih spolnih hormonov

4.1.1 Obnašanje miši brez dodanih spolnih hormonov v dvignjenem labirintu

V dvignjenem labirintu so se miši SF-1KO v primerjavi z mišmi WT statistično značilno manj časa zadrževale v odprtem kraku in dalj časa v zaprtem kraku ($p < 0,05$) (Slika 1). Število vstopov v odprti ali zaprti krak se ni razlikovalo med skupinami miši. Tudi povprečno število vstopov v vse prostore labirinta, s katerim lahko opišemo splošno aktivnost v labirintu, se ni razlikovalo med skupinami miši. Prav tako nismo dobili nobenih razlik med spoloma pri nobenem od parametrov, ki opisuje obnašanje v labirintu.



*Slika 1: Grafični prikaz obnašanja miši v dvignjenem labirintu brez dodanih spolnih hormonov. Statistično značilne razlike med genotipoma so prikazane kot *p < 0,05.*

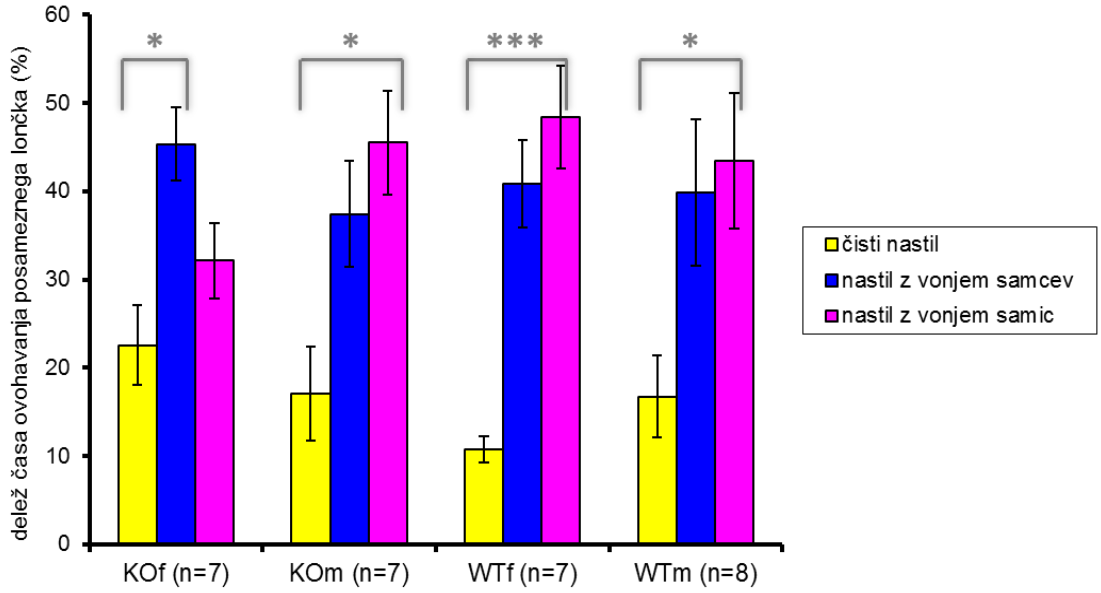
4.1.2 Obnašanje miši brez dodanih spolnih hormonov v poskusu vohalnega prepoznavanja

Število prihodov do vseh treh lončkov se je statistično značilno razlikovalo med spoloma ($p < 0,05$), pri čemer so imeli samci obeh genotipov več prihodov kot samice obeh genotipov (Tabela 1). Čas ovohavanja vseh treh lončkov se ni statistično značilno razlikoval med skupinami miši. Če smo primerjali čas ovohavanja in prihode do vsakega lončka posebej, prav tako nismo dobili razlik med skupinami miši. Ker nas je zanimalo, ali

posamezne skupine miši razlikujejo lonček z vonjem od lončka brez vonja, smo ovohavanja lončka brez vonja primerjali z lončkom, ki ga je posamezna skupina miši ovohavala najdlje časa. Ugotovili smo, da so vse skupine miši razlikovale lonček z vonjem od lončka brez vonja. Samci SF-1KO ($p < 0,05$), samci WT ($p < 0,05$) in samice WT ($p < 0,001$) so statistično značilno dlje ovohavali lonček z vonjem samic v primerjavi s čistim lončkom. Samice SF-1KO so statistično značilno dlje ovohavale lonček z vonjem samcev ($p < 0,05$) v primerjavi s čistim lončkom (Slika 2). Zanimalo nas je tudi ali posamezna skupina razlikuje vonj samca od vonja samice, zato smo primerjali deleža časa ovohavanja teh dveh lončkov. Pri nobeni skupini miši se delež časa ovohavanja teh dveh lončkov ni statistično značilno razlikoval.

*Tabela 1: Prikaz obnašanja miši brez dodanih spolnih hormonov v poskusu vohalnega prepoznavanja. Statistično značilna razlika med spoloma je prikazana kot *p < 0,05.*

Poskusna miš	**Število prihodov do vseh treh lončkov**
KOf (n = 7)	37,4 ± 3,5
KOm (n = 7)	55,3* ± 7,8
WTf (n = 7)	44,6 ± 5,9
WTm (n = 8)	51,4* ± 4,4



*Slika 2: Grafični prikaz obnašanja miši brez dodanih spolnih hormonov v poskusu vohalnega prepoznavanja. Statistične razlike so prikazane kot *p < 0,05 in ***p < 0,001.*

4.1.3 Obnašanje miši brez dodanih spolnih hormonov v labirintu Y

V labirintu Y se število vstopov v oba prostora ni razlikovalo med skupinami miši, medtem ko se je čas zadrževanja v obeh prostorih statistično značilno razlikoval med spoloma ($p < 0,05$). Samci obeh genotipov so se dalj časa zadrževali v obeh prostorih kot samice obeh genotipov (Tabela 2). Pri nobeni skupini miši se čas v prostoru s stimulusno samico ni statistično značilno razlikoval od časa v prostoru s stimulusnim samcem. Torej nobena skupina miši ni razlikovala vonja samice od vonja samca.

*Tabela 2: Prikaz obnašanja miši brez dodanih spolnih hormonov v labirintu Y. Statistično značilne razlike med spoloma so prikazane kot *p < 0,05.*

Poskusna miš	Čas zadrževanja v obeh prostorih s stimulusnimi mišmi (sek.)
KOf (n = 7)	258,0 ± 21,9
KOm (n = 7)	291,7* ± 41,6
WTf (n = 7)	257,8 ± 28,5
WTm (n = 8)	348,4* ± 14,7

4.1.4 Obnašanje miši brez dodanih spolnih hormonov v poskusu socialnega prepoznavanja

V poskusu socialnega prepoznavanja je bil povprečen čas ovohavanja stimulusne samice pri miših SF-1KO statistično značilno krajši ($p < 0,05$) kot pri miših WT (Tabela 3). Miši SF-1KO so imele daljši čas do začetka ovohavanja kot miši WT, vendar razlika ni dosegla statistično značilne vrednosti ($p = 0,068$). Pri nobeni skupini miši nismo dobili statistično značilnega zmanjšanja ovohavanja med 1. in 8. ponovitvijo poskusa ter statistično značilnega povečanja ovohavanja med 8. in 9. ponovitvijo poskusa.

*Tabela 3: Prikaz obnašanja miši brez dodanih spolnih hormonov v poskusu socialnega prepoznavanja. Statistično značilne razlike med genotipoma so prikazane kot *p < 0,05.*

Poskusna miš	Čas ovohavanja stimulusne samice (sek.)
KOf (n = 7)	24,5* ± 2,1
KOm (n = 7)	18,1* ± 2,0
WTf (n = 7)	36,9 ± 1,9
WTm (n = 8)	28,2 ± 1,8

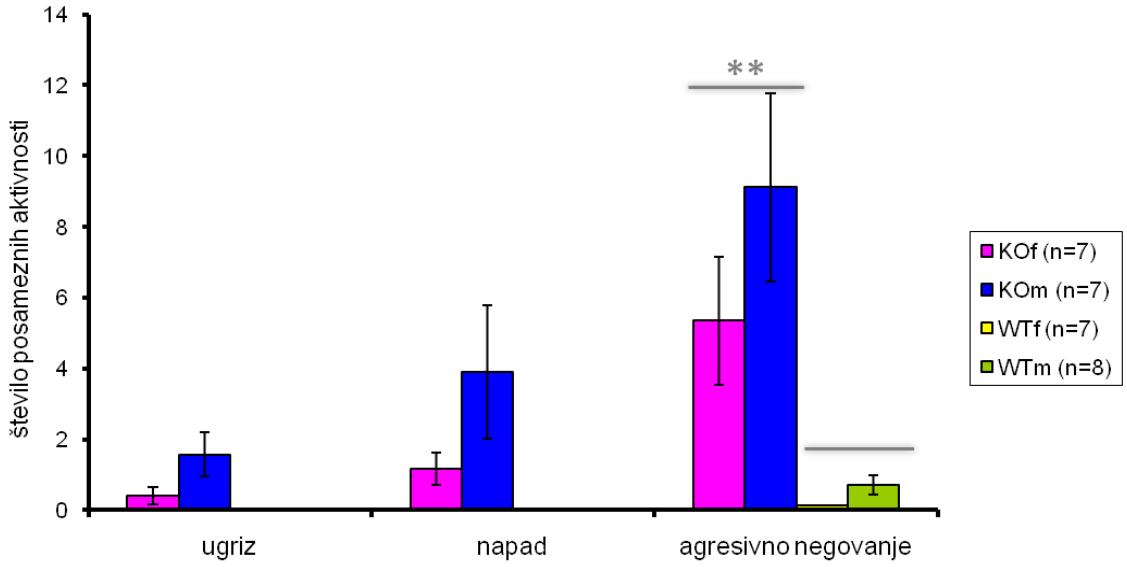
4.1.5 Obnašanje miši brez dodanih spolnih hormonov v poskusu moškega spolnega obnašanja

V poskusu s stimulusnimi samicami nobena skupina miši ni izražala nobenega od vzorcev moškega spolnega obnašanja. Nekatere miši so izražale agresivno obnašanje (napade in ugrize) do stimulusnih samic, vendar statistična analiza ni pokazala statistično značilnih razlik med skupinami poskusnih miši. Ker je bilo agresivnega obnašanja zelo malo, smo analizirali rezultate še s testom Hi-kvadrat. Primerjali smo število agresivnih živali med genotipi, in sicer agresivno obnašanje je kazalo 5 od 14 miši SF-1KO in 1 od 15 miši WT. Vse miši so kazale ugrize le v enem od treh poskusov. Od vseh miši, ki so kazale ugrize, je le ena miš SF-1KO več kot trikrat ugriznila stimulusno miš. S testom Hi-kvadrat nismo dobili statistično značilnih razlik med genotipoma.

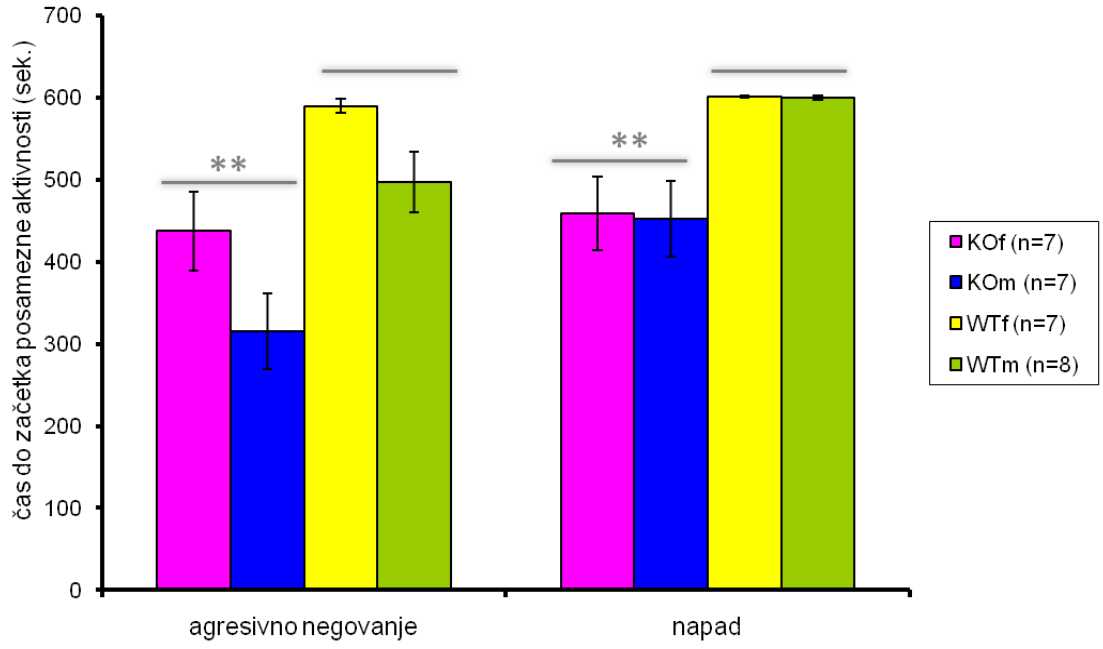
4.1.6 Obnašanje miši brez dodanih spolnih hormonov v poskusu agresivnosti do samcev brez vohalnih betičev

Miši SF-1KO so kazale večjo agresivnost proti stimulusnim samcem brez vohalnih betičev kot miši WT. Za število napadov ($p = 0,08$) in število ugrizov ($p = 0,06$) nismo dobili statistično značilnih razlik, medtem ko smo za agresivno negovanje dobili statistično značilne razlike med genotipoma ($p < 0,01$). Miši SF-1KO so statistično značilno večkrat začele (Slika 3 A) in so tudi dalj časa agresivno negovale stimulusne samce kot miši WT (Slika 3 C). Tudi čas do začetka agresivnega negovanja in čas do prvega napada je bil pri miših SF-1KO statistično značilno krajši kot pri miših WT ($p < 0,01$) (Slika 3 B).

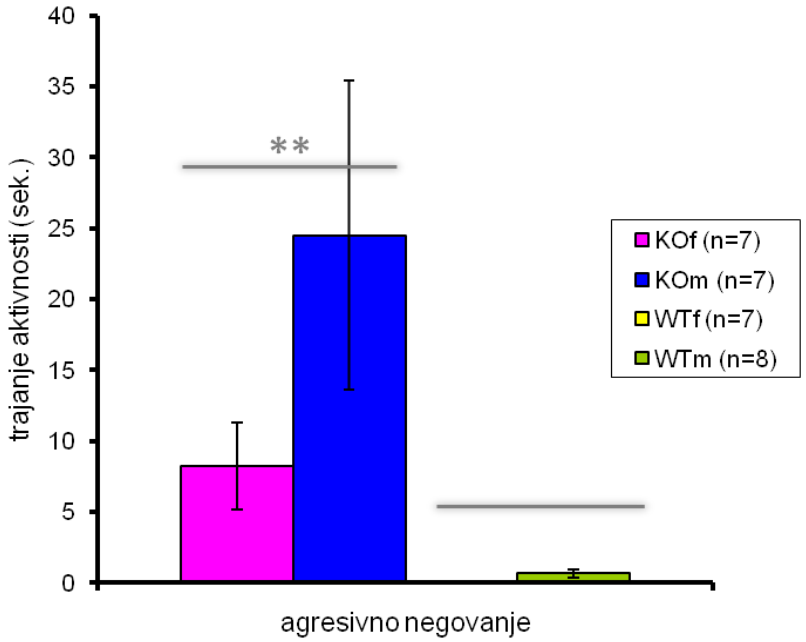
A


14
12
10
8
6
4
2
0
število posameznih aktivnosti
**
ugriz
napad
agresivno negovanje
KOf (n=7)
KOm (n=7)
WTf (n=7)
WTm (n=8)

B


700
600
500
400
300
200
100
0
čas do začetka posamezne aktivnosti (sek.)
**
**
agresivno negovanje
napad
KOf (n=7)
KOm (n=7)
WTf (n=7)
WTm (n=8)

C

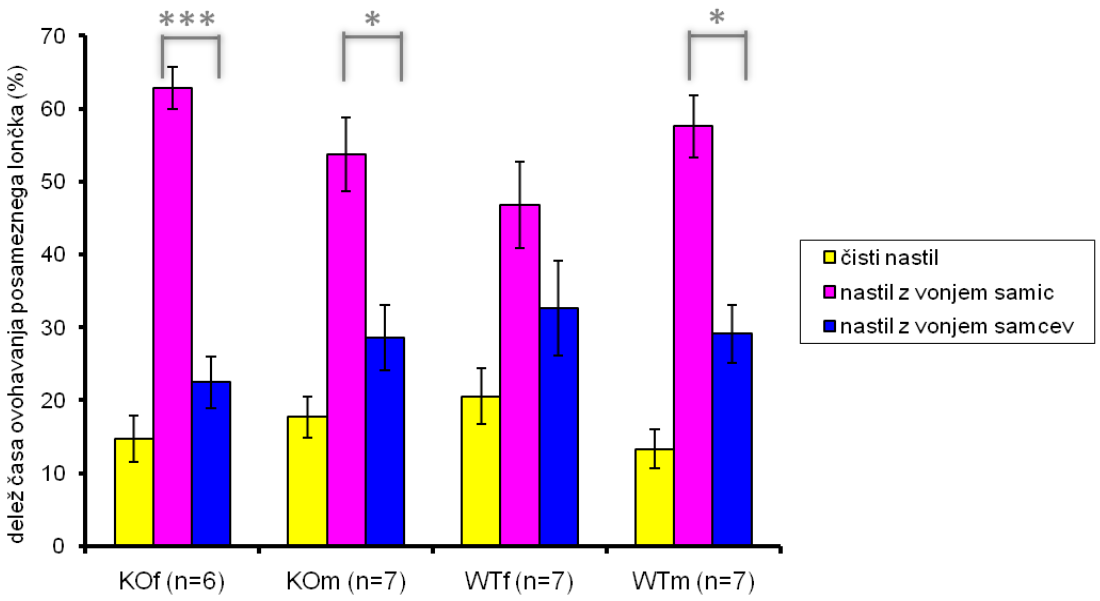


*Slika 3: Grafični prikaz agresivnega obnašanja miši brez dodanih spolnih hormonov v poskusu s samcem brez vohalnih betičev. Statistično značilne razlike med genotipoma so prikazane kot **p < 0,01. A: Število agresivnih aktivnosti pri posameznih skupinah miši. B: Čas do začetka agresivnega negovanja in napada pri posameznih skupinah miši. C: Trajanje agresivnega negovanja pri posameznih skupinah miši.*

4.2 Obnašanje miši po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu

4.2.1 Obnašanje miši po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu v poskusu vohalnega prepoznavanja

Število prihodov in čas ovohavanja vseh treh lončkov se nista statistično značilno razlikovala med skupinami miši. Zanimalo nas je ali posamezna skupina miši razlikuje vonj samic od vonja samcev. Samci SF-1KO ($p < 0,05$), samci WT ($p < 0,05$) in samice SF-1KO ($p < 0,001$) so statistično značilno dalj časa ovohavali lonček z vonjem samic kot lonček z vonjem samcev. Pri samicah WT se ovohavanje teh dveh lončkov ni statistično značilno razlikovalo (Slika 4).



*Slika 4: Grafični prikaz obnašanja miši v poskusu vohalnega prepoznavanja po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu. Statistično značilne razlike so prikazane kot *p < 0,05 in ***p < 0,001.*

4.2.2 Obnašanje miši po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu v labirintu Y

Posamezne skupine miši se niso statistično značilno razlikovale v času zadrževanja in številu vstopov v oba prostora s stimulusno mišjo. Čas zadrževanja v prostoru s stimulusno samico ali samcem se prav tako ni statistično značilno razlikoval med posameznimi skupinami miši. Nobena skupina miši ni razlikovala vonja samca od vonja samice, saj pri nobeni skupini miši nismo našli statistično značilnih razlik med časom zadrževanja v prostoru s stimulusno samico in časom zadrževanja v prostoru s stimulusnim samcem.

4.2.3 Obnašanje miši po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu v poskusu socialnega prepoznavanja

V poskusu socialnega prepoznavanja po dodajanju estradiol benzoata in progesterona je bil povprečen čas ovohavanja stimulusne samice statistično značilno krajši ($p < 0,05$) pri miših SF-1KO v primerjavi z mišmi WT, medtem ko je bil povprečen čas do začetka ovohavanja ($p < 0,05$) statistično značilno daljši pri miših SF-1KO v primerjavi z mišmi WT (Tabela 4). Pri nobeni skupini miši nismo dobili statistično značilnega zmanjšanja ovohavanja med 1. in 8. ponovitvijo poskusa in statistično značilnega povečanja ovohavanja med 8. in 9. ponovitvijo poskusa.

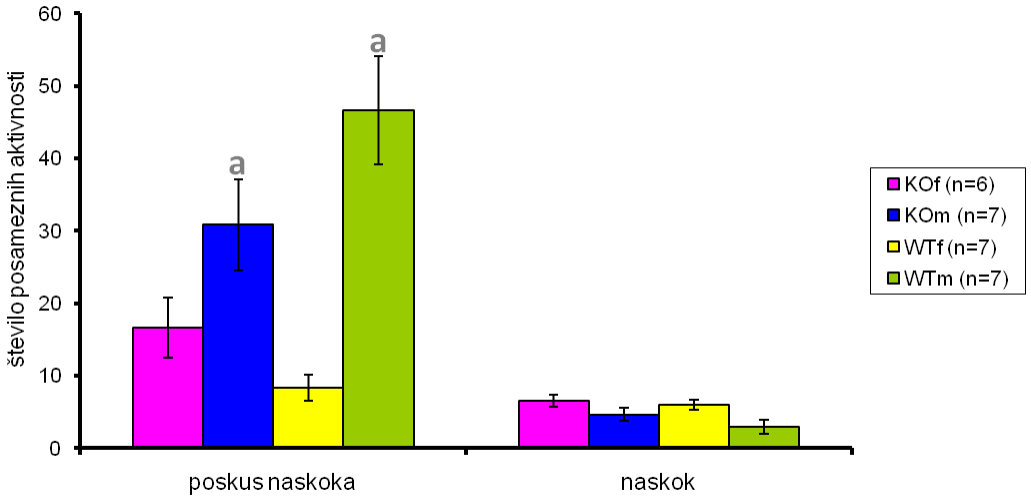
*Tabela 4: Prikaz obnašanja miši po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu v poskusu socialnega prepoznavanja. Statistično značilne razlike med genotipoma so prikazane kot *p < 0,05.*

Poskusna miš	Čas ovohavanja stimulusne samice (sek.)	Čas do začetka ovohavanja stimulusne samice (sek.)
KOf (n = 7)	6,8* ± 1,2	42,8* ± 8,4
KOm (n = 7)	15,2* ± 1,7	29,8* ± 8,8
WTf (n = 7)	19,1 ± 2,0	22,0 ± 9,2
WTm (n = 8)	26,4 ± 2,3	16,3 ± 8,3

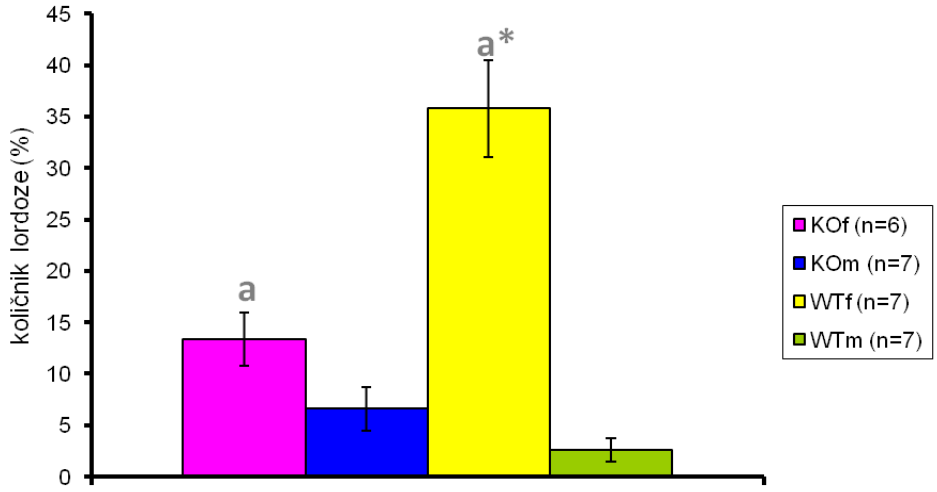
4.2.4 Obnašanje miši po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu v poskusu ženskega spolnega obnašanja

Stimulusni samci so statistično značilno večkrat poskusili naskočiti samce obeh genotipov kot samice obeh genotipov ($p < 0,01$). Pri analizi števila naskokov (ne glede na oceno lordoze) nismo dobili statistično značilnih razlik med skupinami poskusnih miši (Slika 5 A). Pri analizi količnika lordoze (LQ) smo dobili statistično značilne razlike med spoloma ($p < 0,001$). Samice obeh genotipov so imele statistično značilno višji LQ kot samci obeh genotipov, pri čemer so imele samice WT najvišji LQ ($p < 0,05$) v primerjavi z ostalimi tremi skupinami miši (Slika 5 B). Pri analizi števila ejakulacij smo dobili statistično značilno razliko med spoloma ($p < 0,001$). Stimulusni samci so večkrat ejakulirali, ko so bili s samicami obeh genotipov, kot pa s samci obeh genotipov. Fisherjev test je pokazal, da so samice WT prejele največje število ejakulacij ($p < 0,05$) v primerjavi z ostalimi tremi skupinami (Tabela 5).

A



B



Slika 5: Grafični prikaz obnašanja miši v poskusu ženskega spolnega obnašanja po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu. A: Število poskusov naskoka in naskokov stimulusnih samcev. Statistično značilne razlike med spoloma so označene kot $^{a}p < 0,01$. B: Količnik lordoze (LQ) pri poskusnih miših. Statistično značilne razlike med spoloma so označene kot $^{a}p < 0,001$, med samicami WT in ostalimi skupinami miši kot $^{*}p < 0,05$.

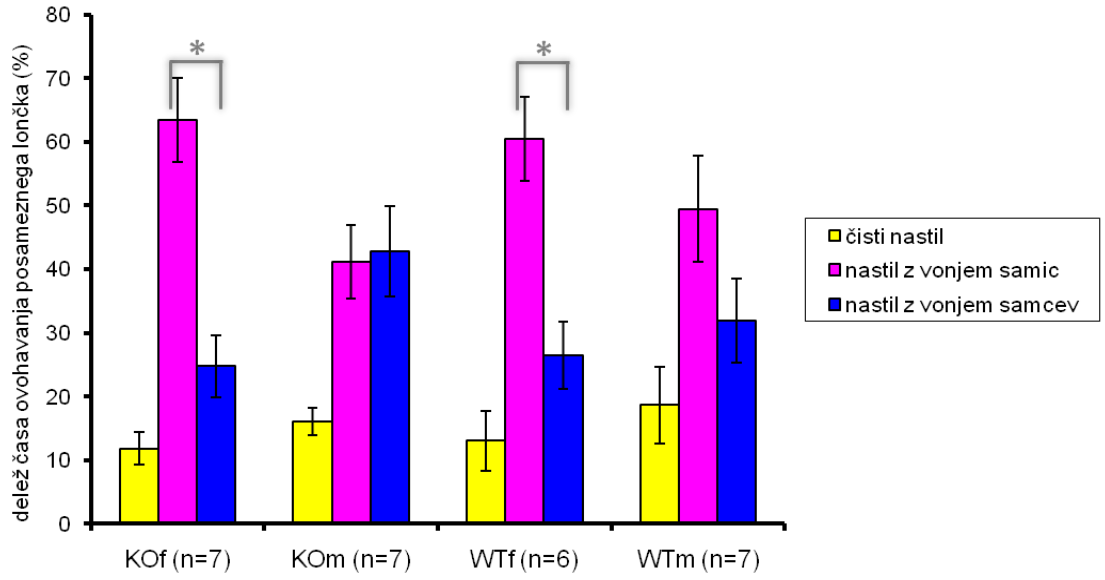
Tabela 5: Prikaz števila ejakulacij stimulusnih samcev v poskusu ženskega spolnega obnašanja miši po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu. Statistično značilne razlike med spoloma so označene kot [a]p < 0,001, med samicami WT in ostalimi skupinami miši kot [b]p < 0,05.

Poskusna miš	Število ejakulacij
KOf (n = 6)	0,24[a] ± 0,06
KOm (n = 7)	0,08 ± 0,04
WTf (n = 7)	0,43[ab] ± 0,07
WTm (n = 7)	0,00 ± 0,00

4.3 Obnašanje miši po dodanem testosteronskem vsadku

4.3.1 Obnašanje miši po dodanem testosteronskem vsadku v poskusu vohalnega prepoznavanja

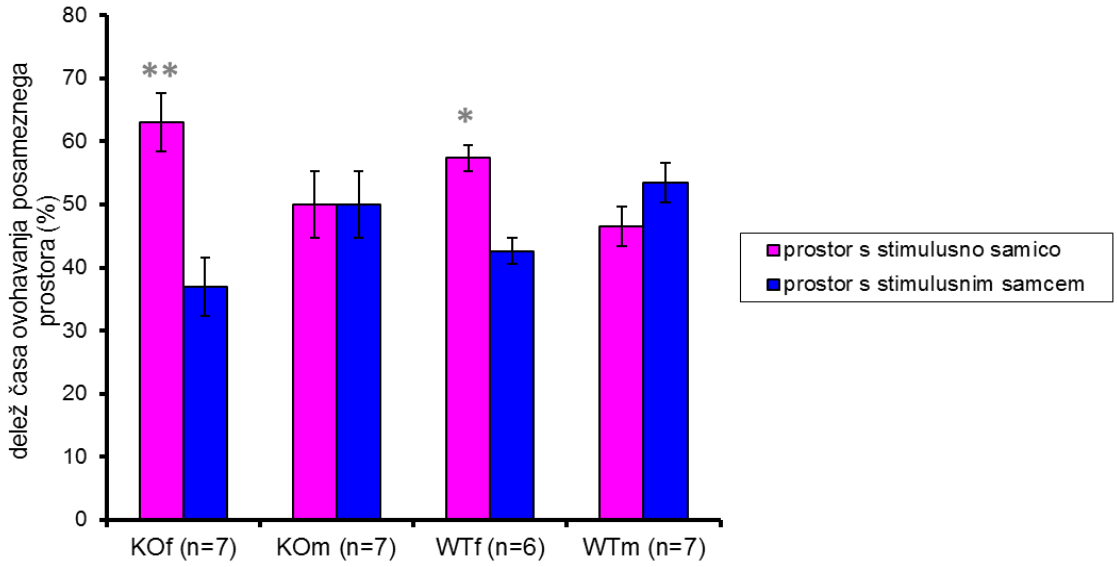
Število prihodov do vseh treh lončkov in čas ovohavanja vseh treh lončkov se med skupinami miši nista statistično značilno razlikovala. Pri analizi časa ovohavanja lončka z vonjem samic smo dobili statistično značilno razliko med spoloma ($p < 0,05$). Samice obeh genotipov so dalj časa ovohavale lonček z vonjem samic kot samci obeh genotipov (Slika 6). Analiza ovohavanja lončka z vonjem samcev je pokazala povečanje ovohavanja pri samcih obeh genotipov v primerjavi s samicami obeh genotipov, vendar razlika med spoloma ni bila statistično značilna ($p = 0,069$). Pri primerjavi ovohavanja lončka z vonjem samic in lončka z vonjem samcev smo ugotovili, da so samice SF-1KO in samice WT statistično značilno dalj časa ovohavale lonček z vonjem samic v primerjavi z lončkom z vonjem samcev ($p < 0,05$). Pri samcih obeh genotipov statistično značilnih razlik med ovohavanjem teh dveh lončkov nismo dobili (Slika 6).



*Slika 6: Grafični prikaz obnašanja miši po dodanem testosteronskem vsadku v poskusu vohalnega prepoznavanja. Statistično značilne razlike so prikazane kot *p < 0,05.*

4.3.2 Obnašanje miši po dodanem testosteronskem vsadku v poskusu v labirintu Y

Podobne rezultate kot v poskusu vohalnega prepoznavanja smo dobili tudi v labirintu Y. Število vstopov v oba prostora in čas zadrževanja v obeh prostorih s stimulusno mišjo se med skupinami miši nista statistično značilno razlikovala. Pri analizi časa zadrževanja v vsakem prostoru posebej smo ugotovili, da so se samice obeh genotipov zadrževale dalj časa v prostoru s stimulusno samico ($p < 0,01$) kot samci obeh genotipov, ki so se zadrževali dalj časa v prostoru s stimulusnim samcem ($p < 0,01$) kot samice obeh genotipov (Slika 7). Zanimalo nas je, ali posamezne skupine miši razlikujejo vonj samic od vonja samcev. Dobili smo podobne rezultate kot v poskusu vohalnega prepoznavanja. Samice SF-1KO ($p < 0,05$) in samice WT ($p < 0,01$) so statistično značilno dlje časa preživele s stimulusno samico kot s stimulusnim samcem. Pri samcih obeh genotipov statistično značilnih razlik med časom nahajanja v različnih prostorih nismo našli (Slika 7).



*Slika 7: Grafični prikaz obnašanja miši po dodanem testosteronskem vsadku v labirintu Y. Statistično značilne razlike so prikazane kot *p < 0,05 in **p < 0,01.*

4.3.3 Obnašanje miši po dodanem testosteronskem vsadku v poskusu socialnega prepoznavanja

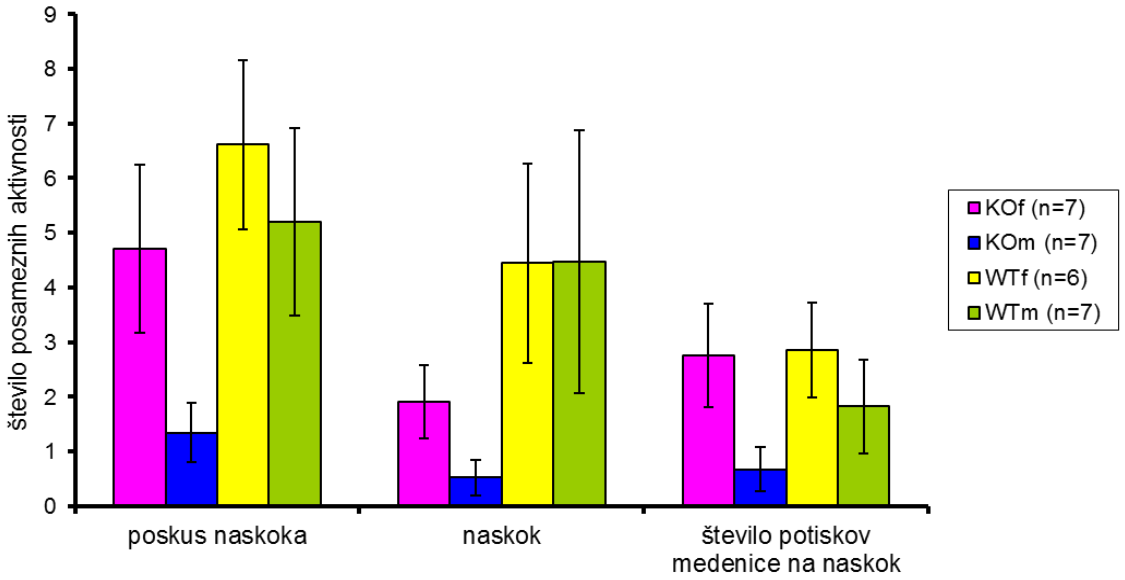
Povprečen čas ovohavanja in povprečen čas do začetka ovohavanja stimulusne samice se nista statistično značilno razlikovala med skupinami poskusnih miši. Tako kot v poskusu brez dodanih spolnih hormonov in po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu tudi tukaj nismo dobili statistično značilnega zmanjšanja ovohavanja med 1. in 8. ponovitvijo poskusa in statistično značilnega povečanja ovohavanja med 8. in 9. ponovitvijo poskusa.

4.3.4 Obnašanje miši po dodanem testosteronskem vsadku v poskusu moškega spolnega obnašanja

V nobeni od aktivnosti, ki je značilna za moško spolno obnašanje, ni bilo statistično značilnih razlik med posameznimi skupinami miši (Slika 8). Naskakovali so 3 samci WT od 7, 4 samice WT od 6, 2 samca SF-1KO od 7 in 5 samic SF-1KO od 7. Od vseh samcev WT sta le 2 kopulirala in le 1 samec je kazal ejakulatorni refleks.

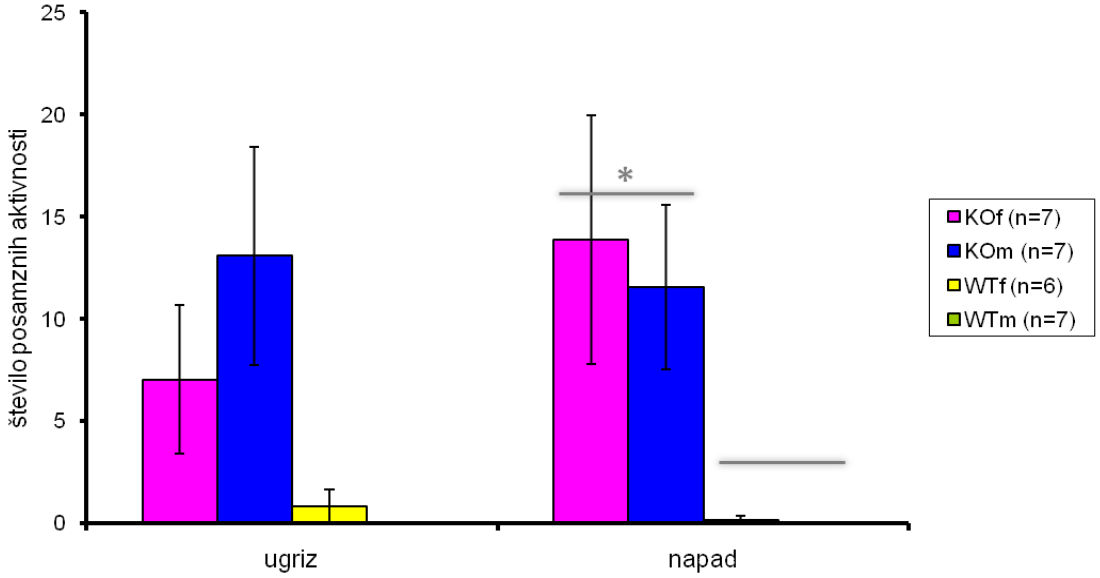
Med opazovanjem moškega spolnega obnašanja so se nekatere miši obnašale agresivno do stimulusnih samic. Miši SF-1KO so imele večje število napadov in ugrizov kot miši WT, vendar pri analizi števila ugrizov nismo dobili statistično značilnih razlik med genotipoma ($p = 0,07$), medtem ko smo za število napadov dobili statistično značilno razliko med genotipoma ($p < 0,05$) (Slika 9 A). Tudi čas do prvega ugriza ($p < 0,05$) in do prvega

napada ($p < 0,01$) je bil statistično značilno krajši pri miših SF-1KO v primerjavi z mišmi WT (Slika 9 B).

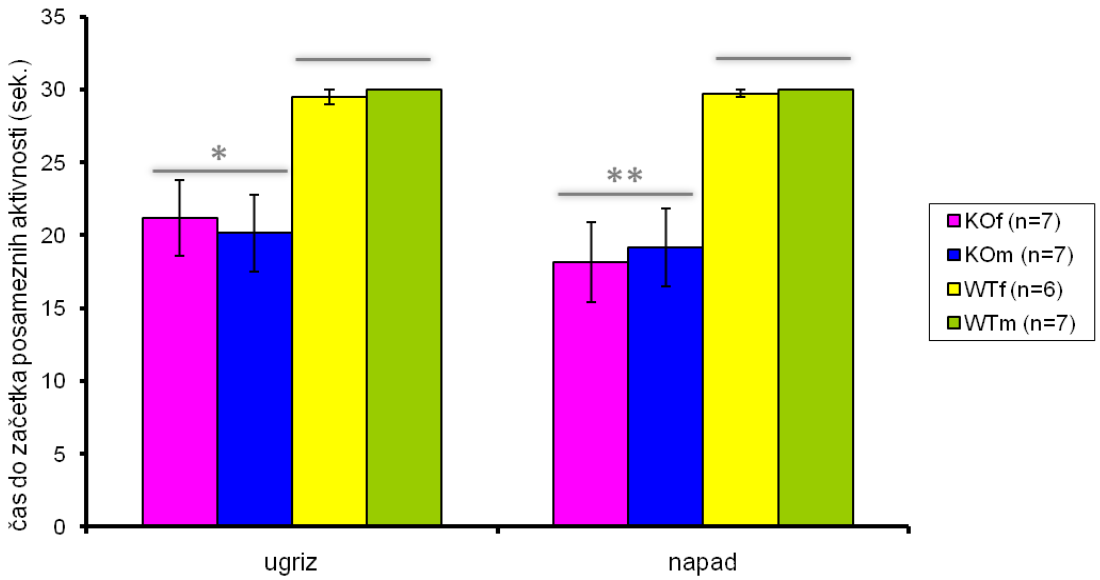


Slika 8: Grafični prikaz obnašanja miši po dodanem testosteronskem vsadku v poskusu moškega spolnega obnašanja s stimulusnimi samicami. Statistično značilnih razlik med skupinami miši ni bilo.

A



B

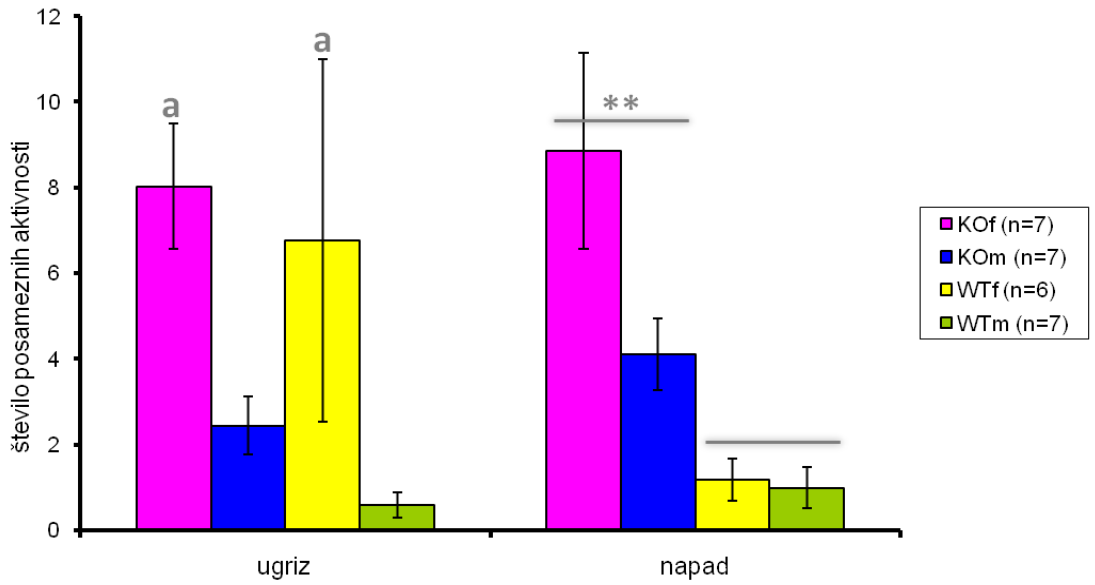


*Slika 9: Grafični prikaz obnašanja miši po dodanem testosteronskem vsadku v poskusu moškega spolnega obnašanja s stimulusnimi samicami. Statistično značilne razlike med genotipoma so prikazane kot *p < 0,05 in **p < 0,01. A: Število ugrizov in napadov. B: Čas do prvega ugriza in napada.*

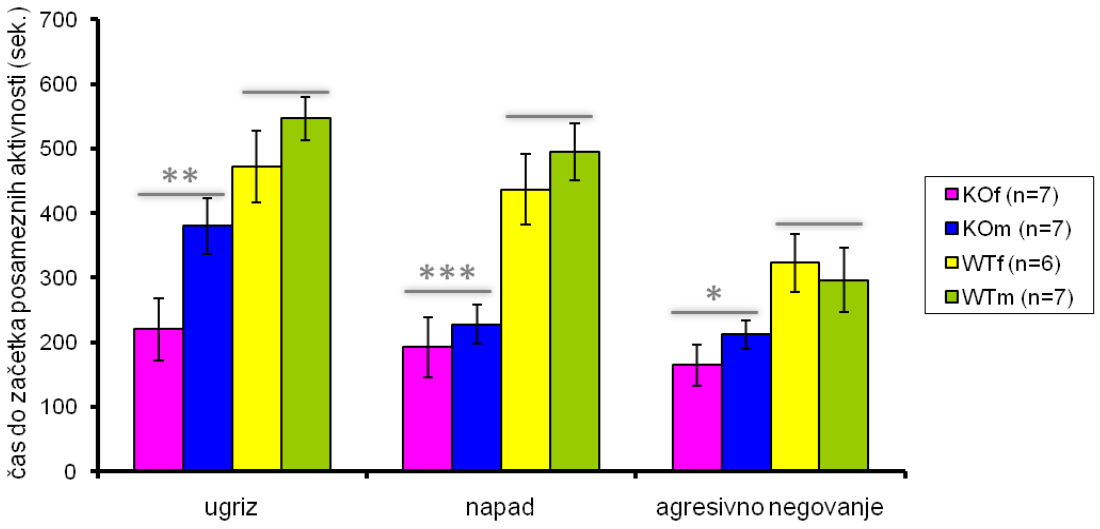
4.3.5 Obnašanje miši (tretja skupina) po dodanem testosteronskem vsadku v poskusu agresivnosti do samcev brez vohalnih betičev

Pri analizi števila ugrizov smo dobili statistično značilne razlike med spoloma. Samice obeh genotipov so statistično značilno večkrat ugriznile ($p < 0,05$) stimulusnega samca kot samci obeh genotipov (Slika 10 A). Za število napadov, čas do prvega napada in čas do prvega ugriza smo dobili statistično značilne razlike med genotipoma. Miši SF-1KO so hitreje ($p < 0,001$) in večkrat ($p < 0,01$) napadle stimulusne samce kot miši WT in prav tako tudi hitreje ugriznile ($p < 0,01$) stimulusne samce v primerjavi z mišmi WT (Slika 10 A, B). Pri agresivnem negovanju smo dobili statistično značilne razlike le za čas do začetka agresivnega negovanja, ne pa tudi za število začetkov in trajanje agresivnega negovanja. Miši SF-1KO so statistično značilno hitreje ($p < 0,05$) začele agresivno negovati stimulusne samce kot miši WT (Slika 10 B). Pri analizi trajanja agresivnega negovanja smo ugotovili, da so samci obeh genotipov dalj časa agresivno negovali stmulusnega samca kot samice obeh genotipov, vendar razlika ni bila statistično značilna ($p = 0,058$).

A



B



Slika 10: Grafični prikaz agresivnega obnašanja miši (tretja skupina) po dodanem testosteronskem vsadku v poskusu s samcem z odstranjenimi vohalnimi betiči. Statistično značilne razlike med spoloma so prikazane kot $^{a}p < 0,05$, med genotipoma kot $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ in $***p < 0,001$. A: Število ugrizov in napadov. B: Čas do začetka ugriza, napada in agresivnega negovanja.

4.4 Obnašanje miši brez dodanih spolnih hormonov in po dodanem testosteronskem vsadku

4.4.1 Obnašanje miši brez dodanih spolnih hormonov v poskusu starševskega obnašanja

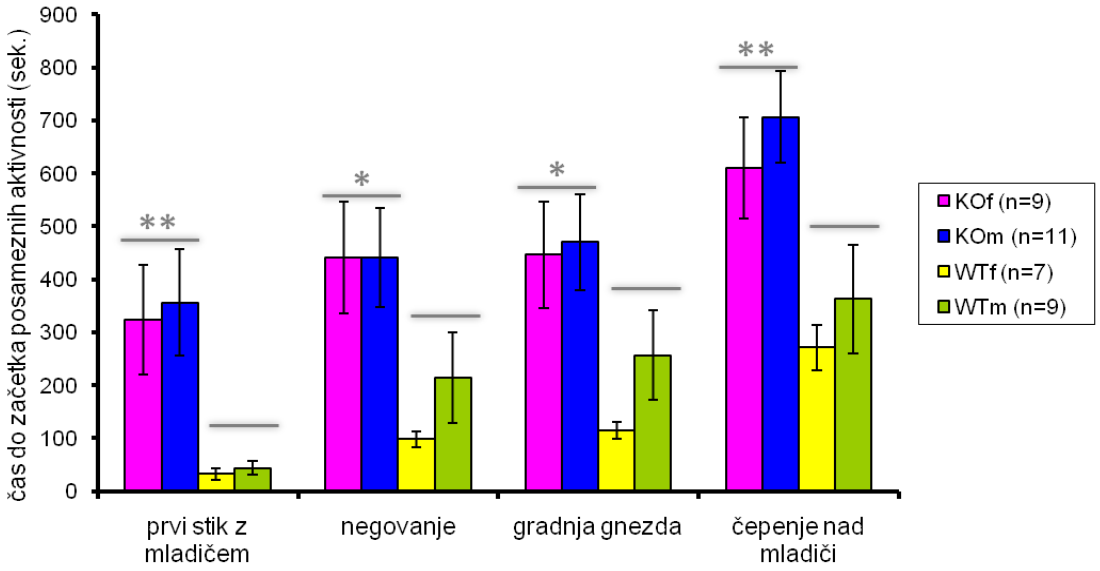
Za večino vzorcev starševskega obnašanja smo pri miših SF-1KO ugotovili statistično značilno daljši čas do začetka izvajanja v primerjavi z mišmi WT. Miših SF-1KO so imele statistično značilno daljši čas do prvega stika z mladičem ($p < 0,01$), do začetka negovanja mladičev ($p < 0,05$), do začetka čepenja nad mladiči ($p < 0,01$) in do začetka gradnje gnezda ($p < 0,05$) (Slika 11).

Pri trajanju aktivnosti smo za gradnjo gnezda in čepenje nad mladiči dobili statistično značilno razliko med genotipoma ($p < 0,01$) in med spoloma ($p < 0,05$). Miši SF-1KO so statistično značilno manj časa gradile gnezdo in manj časa čepele nad mladiči kot miši WT. Samice obeh genotipov so statistično značilno dalj časa gradile gnezdo in dalj časa čepele nad mladiči kot samci obeh genotipov. Fisherjev test je pokazal, da so samice WT najdalj časa gradile gnezdo ($p < 0,05$) in čepele nad mladiči ($p < 0,05$) v primerjavi z ostalimi skupinami miši. Za trajanje negovanja nismo dobil statistično značilnih razlik med skupinami miši (Slika 12).

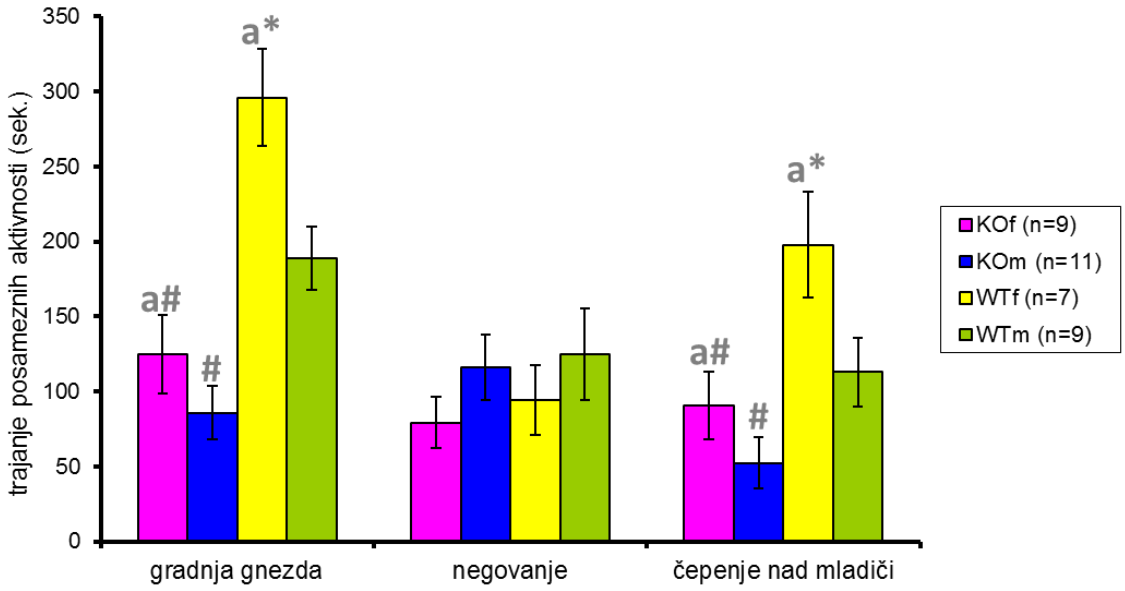
Ko smo primerjali povprečno oceno oblike gnezda smo dobili statistično značilno razliko med genotipoma ($p < 0,001$). Miši SF-1KO so imele slabše oblikovana gnezda kot miši WT (Tabela 6).

Ker smo v poskusu uporabili 3 mladiče, smo za vsakega posebej merili čas, ki ga je potrebovala poskusna žival, da ga prinese v gnezdo. Čas, da so prvega mladiča prinesle v gnezdo, se ni statistično značilno razlikoval med posameznimi skupinami miši. Za drugega in tretjega mladiča smo dobili statistično značilno razliko med spoloma, ki je pokazala, da so samice obeh genotipov hitreje prinesle drugega ($p < 0,05$) in tretjega ($p < 0,01$) mladiča v gnezdo kot samci obeh genotipov. Za tretjega mladiča smo poleg razlik med spoloma dobili še statistično značilno razliko med genotipoma. Miši SF-1KO so potrebovale statistično značilno dlje časa ($p < 0,05$), da so prinesle tretjega mladiča v gnezdo kot miši WT. Fisherjev test je pokazal, da so imele samice WT najkrajši čas ($p < 0,05$), da so prinesle drugega in tretjega mladiča v gnezdo v primerjavi z ostalimi tremi skupinami miši

(Slika 13). Skupine miši se med sabo niso razlikovale v številu prinesenih mladičev v gnezdo (Tabela 6).



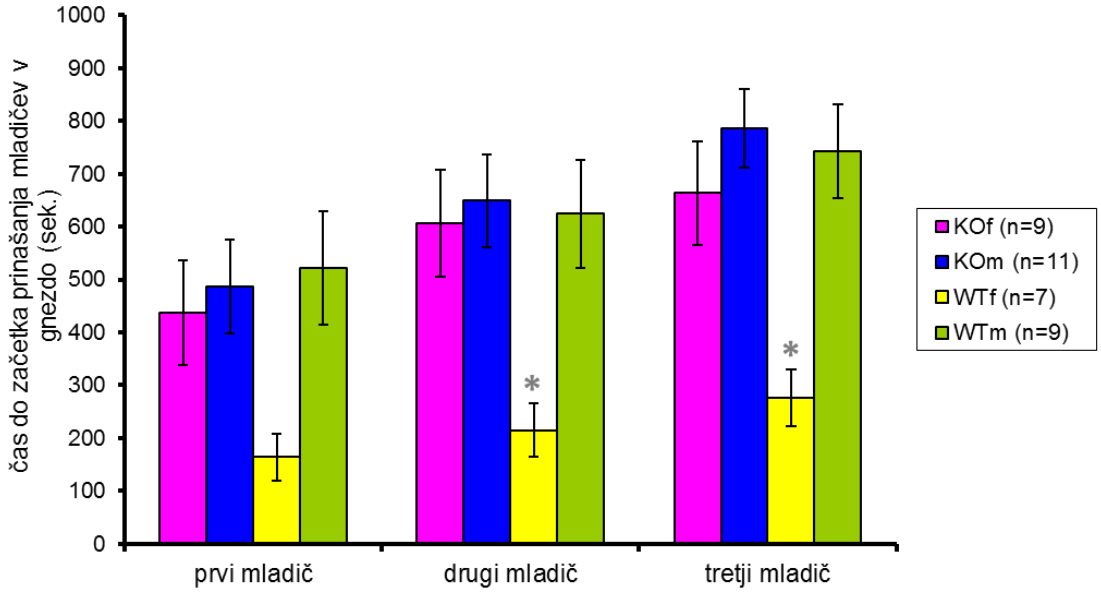
*Slika 11: Grafični prikaz starševskega obnašanja miši brez dodanih spolnih hormonov. Statistično značilne razlike med genotipoma so prikazane kot *p < 0,05 in **p < 0,01.*



*Slika 12: Grafični prikaz starševskega obnašanja miši brez dodanih spolnih hormonov. Statistično značilne razlike med spoloma so prikazane kot $^{a}p < 0,05$, med genotipoma so prikazane kot $^{\#}p < 0,01$ in med samicami WT in ostalimi skupinami miši kot *p < 0,05.*

*Tabela 6: Prikaz starševskega obnašanja miši brez dodanih spolnih hormonov. Statistično značilne razlike med genotipoma so prikazane kot ***p < 0,001*

Poskusna miš	Povprečna ocena oblike gnezda	Število mladičev prinesenih v gnezdo
KOf (n = 9)	1,4*** ± 0,2	2,4 ± 0,3
KOm (n = 11)	1,3*** ± 0,2	2,5 ± 0,3
WTf (n = 7)	2,8 ± 0,1	3,0 ± 0,0
WTm (n = 9)	2,2 ± 0,2	2,3 ± 0,3

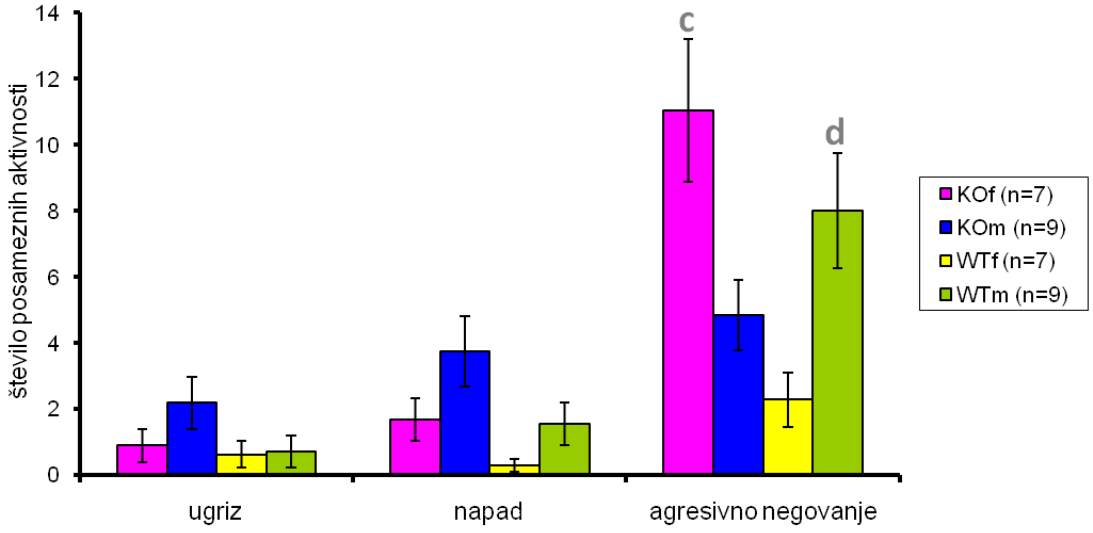


*Slika 13: Grafični prikaz starševskega obnašanja miši brez dodanih spolnih hormonov. Statistične razlike med samicami WT in ostalimi skupinami miši so prikazane kot *p < 0,05.*

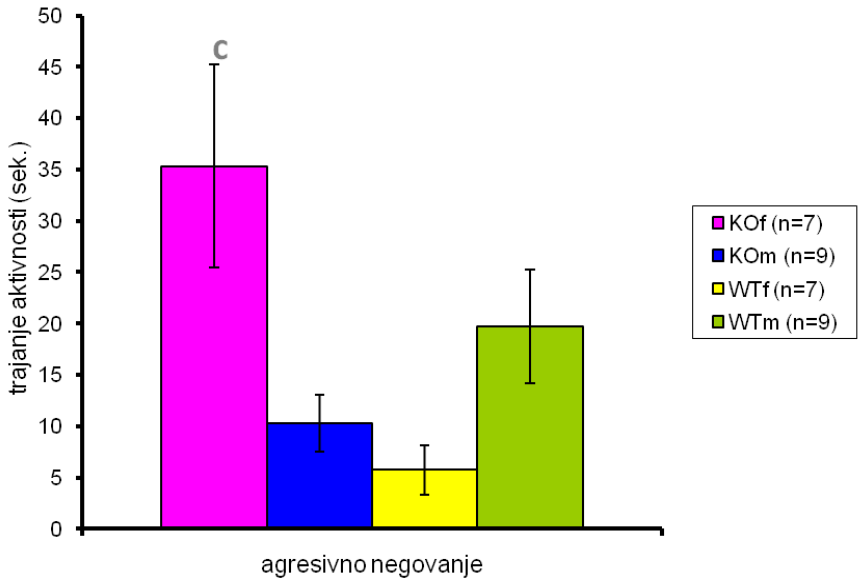
4.4.2 Obnašanje miši (četrta skupina) po dodanem testosteronskem vsadku v poskusu agresivnosti do samcev brez vohalnih betičev

Pri analizi števila napadov in ugrizov nismo dobili statistično značilnih razlik med skupinami miši, ne glede na genotip ali spol (Slika 14 A). Tudi za čas do prvega napada in prvega ugriza nismo dobili statistično značilnih razlik med skupinami miši. Agresivno negovanje je bil edini vzorec agresivnega obnašanja, za katerega smo dobili nekatere statistično značilne razlike med posameznimi skupinami miši. Za število in trajanje agresivnega negovanja smo dobili statistično značilen medsebojni vpliv genotipa in spola. Fisherjev test je pokazal, da so samice SF-1KO večkrat začele agresivno negovati ($p < 0,05$) kot samci SF-1KO in samice WT, samci WT pa so začeli večkrat agresivno negovati ($p < 0,05$) kot samice WT (Slika 14 A). Samice SF-1KO so tudi dalj časa agresivno negovale ($p < 0,05$) kot samci SF-1KO in samice WT, medtem ko se trajanje agresivnega negovanja samcev WT ni statistično značilno razlikovalo od ostalih skupin miši (Slika 14 B).

A



B



Slika 14: Grafični prikaz agresivnega obnašanja miši (četrta skupina) po dodanem vsadku s testosteronom, v poskusu s samci brez vohalnih betičev. A: Število ugrizov, napadov in začetkov agresivnega negovanja. Samice SF-1KO so se statistično značilno razlikovale od samcev SF-1KO in samic WT $^{c}p < 0,05$, samci WT so se statistično značilno razlikovali od samic WT $^{d}p < 0,05$. B: Trajanje agresivnega negovanja miši. Samice SF-1KO so se statistično značilno razlikovale od samcev SF-1KO in samic WT $^{c}p < 0,05$.

5 Razprava

5.1 Obnašanje miši v dvignjenem labirintu brez dodanih spolnih hormonov

S poskusom v dvignjenem labirintu smo želeli ugotoviti, ali miši različnega genotipa in spola kažejo različno intenzivno obnašanje podobno tesnobi. V nadaljevanju bomo zaradi lažjega opisovanja uporabili izraz tesnoba, čeprav obnašanja miši v tem poskusu ne moremo primerjati neposredno s tesnobo, ki se pojavlja pri človeku. Miši SF-1KO so se zadrževale krajši čas v odprtem kraku in daljši čas v zaprtem kraku labirinta kot miši WT. Ker se ta poskus uporablja za ugotavljanje tesnobe (109), lahko rečemo, da so miši SF-1KO kazale povečano tesnobo v primerjavi z mišmi WT. Glede na to, da imajo miši SF-1KO zmanjšano spontano aktivnost na kolesih (99, 106), smo bili še posebej pozorni, če je bila aktivnost spremenjena tudi v dvignjenem labirintu. Število vstopov v oba kraka in v vmesni prostor v labirintu se ni razlikovalo niti med genotipoma niti med spoloma miši, kar pomeni, da je bila aktivnost miši SF-1KO podobna mišim WT. Tudi število vstopov v posamezni krak se med skupinami miši ni razlikovalo, kar pomeni, da so imele miši SF-1KO podobno število vstopov v odprti krak kot miši WT, le zadrževale so se manj časa v njem.

Za povečano tesnobo pri miših SF-1KO obstaja več razlogov. Prvi razlog bi bil lahko spremenjeno ventromedialno jedro hipotalamusa (VMH). To potrjujejo rezultati na gensko spremenjenih miših, katerim so izbili gen za SF-1 samo v centralnem živčnem sistemu (CNS SF-1KO) (267). Te miši imajo spremenjeno jedro VMH, nedledvični žlezi in spolne žleze pa so normalno prisotne. V različnih poskusih, ki se uporabljajo za ugotavljanje tesnobe, so kazale miši CNS SF-1KO več tesnobe kot miši WT. Pri miših CNS SF-1KO poročajo tudi o težjem rokovanju, kar smo opazili tudi pri naših miših SF-1KO, ki so med rokovanjem večkrat ušle, poskakovale in tudi ugriznile. Povečano tesnobo pri miših CNS SF-1KO povezujejo s spremembami v VMH. Pri miših CNS SF-1KO so v VMH poleg spremembe položaja celic ugotovili tudi zmanjšano izražanje dejavnika BDNF (*angl*. brain derived neurotrophic factor, BDNF) in receptorja za kortikotropin sproščujoči hormon tipa 2 (Crhr2), ki ju povezujejo s tesnobnim obnašanjem (267). Podobne spremembe v izražanju BDNF so našli tudi pri miših SF-1KO (101). Glede na to, da so pri obeh modelih

miši našli podobne spremembe v VMH jedru (101, 102, 106, 267, 268), predvidevamo, da so te spremembe vplivale na povečano tesnobo tudi pri miših SF-1KO v naši raziskavi.

Kljub vsemu se raziskava Zhao in sod. (267) in naša raziskava razlikujeta v dveh pomembnih dejstvih (izolacija, odsotnost spolnih hormonov), ki bi lahko dodatno vplivali na rezultate. Miši v naši raziskavi so bile izolirane zelo zgodaj po odstavitvi in znano je, da izolacija povzroči povečanje stresa in tesnobe (269). Izolacija bi lahko pripomogla k povečanju tesnobe, vendar zaradi več razlogov mislimo, da ni bila glavni razlog za razlike med mišmi SF-1KO in WT. V raziskavi Zhao in sod. (267) so miši CNS SF-1KO kljub nastanitvi v skupinah kazale povečano tesnobo. Če bi bila izolacija glavni razlog za povečano tesnobo miši SF-1KO, bi to pomenilo, da so miši SF-1KO bolj občutljive na izolacijo kot miši WT. Glede na rezultate v poskusu socialnega prepoznavanja (poglavje 5.3) to verjetno ne drži, saj sta se oba genotipa in spola miši v tem poskusu obnašala podobno. V raziskavi Kerčmar in sod. (270) smo ugotovili, da izolacija vpliva na socialno prepoznavanje miši. Podobne rezultate v poskusu socialnega prepoznavanja smo dobili pri vseh skupinah miši glede na genotip in spol, tudi v tej raziskavi.

Tudi v nekaterih drugih poskusih so se pokazale razlike med genotipoma, ki bi jih lahko povezali s povečano tesnobo pri miših SF-1KO. Miši SF-1KO so v nekaterih poskusih potrebovale več časa, da so začele izvajati določeno aktivnost kot miši WT. Tako so na primer v poskusu starševskega obnašanja potrebovale daljši čas do prvega obiska, dviga mladiča, do začetka negovanja, čepenja nad mladiči ter do začetka gradnje gnezda. V poskusu socialnega prepoznavanja so potrebovale daljši čas do začetka ovohavanja samice. Tudi trajanje aktivnosti (ovohavanje, gradnja gnezda, čepenje nad mladiči) je bilo pri miših SF-1KO krajše kot pri miši WT. V vseh poskusih so se miši srečale z novim vonjem in novim objektom (škatlica, mladič, dvignjen labirint), kar bi lahko pri miših SF-1KO sprožilo večji strah in posledično večjo tesnobo kot pri miših WT.

Drugi razlog za povečano tesnobo pri miših SF-1KO bi bilo lahko tudi pomanjkanje spolnih hormonov. Najnovejše raziskave predvidevajo, da bi tudi pri samicah lahko obstajala aktivna feminizacija. Možgani samic miši naj bi se dokončno razvili v obdobju med rojstvom in puberteto pod vplivom estradiola, izločenega iz jajčnikov (10). Če to drži, pomeni, da so bili možgani samic WT pod vplivom estradiola po rojstvu in do odstranitve spolnih žlez, možgani samcev WT so bili pod vplivom testosterona že pred rojstvom in do odstranitve spolnih žlez, medtem ko so se možgani samic in samcev SF-1KO razvijali v

popolni odsotnosti spolnih hormonov, kar bi bil lahko vzrok za povečano tesnobo. Tako so na primer pri samcih miši brez gena za encim aromatazo (ArKO) ugotovili več obnašanja podobnega tesnobi, ki ga povezujejo s pomanjkanjem estradiola v fetalnem in odraslem obdobju (124). Tudi samci z neobčutljivostjo androgenskega receptorja (*angl.* testicular feminization mutation, Tfm) kažejo povečano tesnobo v primerjavi s samci, ki imajo delujoče androgenske receptorje (271). V obeh omenjenih raziskavah žal ni podatkov za samice, tako da ne moremo zaključiti, da je na povečano tesnobo pri obeh spolih miši SF-1KO dodatno vplivalo pomanjkanje spolnih hormonov.

Poleg razlik med genotipoma, bi lahko dobili tudi razlike med spoloma, saj se obnašanje podobno tesnobi izraža različno glede na spol. Kljub vsemu rezultati raziskav niso enotni niti glede razlik med spoloma in niti glede tega, pri katerem spolu je tesnoba bolj izražena. Rezultati so zelo odvisni od hormonskega stanja živali, vrste poskusa in drugih pogojev (255). Na splošno velja, da testosteron pri samcih zmanjšuje tesnobo (257), pri samicah pa se izražanje tesnobe močno spreminja s spolnim ciklusom. Progesteron zmanjšuje tesnobo, vendar se njegov učinek spreminja s časom in je odvisen od prisotnosti in deleža estradiola v krvi (256, 272). Zanimivo, da v raziskavi Zhao in sod. (267) ne ugotavljajo razlik med spoloma tako pri miših CNS SF-1KO kot tudi pri kontrolnih miših, čeprav so imele vse miši prisotne spolne žleze. Ne navajajo, v kateri fazi ciklusa so bile samice opazovane, tako da težko sklepamo o njihovem hormonskem stanju. Poleg tega so pri samicah CNS SF-1KO ugotovili nepravilen spolni ciklus (268), kar bi še dodatno lahko vplivalo na rezultate v dvignjenem labirintu v raziskavi Zhao in sod. (267). Tudi v naši raziskavi nismo dobili razlik med spoloma pri nobenem od genotipov, vendar so bile vse miši v naši raziskavi brez spolnih žlez. Lahko, da so za razlike med spoloma v dvignjenem labirintu pomembni aktivacijski učinki spolnih hormonov. V tem primeru bi se razlike pokazale šele po dodajanju spolnih hormonov, kar bo potrebno ugotoviti v nadaljnjih raziskavah. Ker nismo dobili nobenih razlik med samicami SF-1KO in samci SF-1KO, lahko rečemo, da genetski dejavniki ne vplivajo na spolne razlike v obnašanju podobnem tesnobi, kadar miši v odraslem obdobju niso pod vplivom spolnih hormonov. To je skladno z raziskavo McPhie-Lalmansingh in sod. (14), kjer pri miših FCG (*angl.* four core genotypes) ravno tako niso ugotovili neposrednega vpliva spolnih kromosomov na tesnobno obnašanje v dvignjenem labirintu in odprtem polju.

5.2 Obnašanje miši v poskusu vohalnega prepoznavanja in v labirintu Y

5.2.1 Obnašanje miši v poskusu vohalnega prepoznavanja in v labirintu Y brez dodanih spolnih hormonov

Delovanje vohalnega sistema smo preverili v poskusu vohalnega prepoznavanja z lončki treh različnih vonjev in v labirintu Y. Tako v poskusu z lončki kot tudi v labirintu Y se miši med sabo niso razlikovale v ovohavanju različnih vonjev. V poskusu z lončki so vse miši dalj časa ovohavale vsaj enega od dveh lončkov z vonjem (nastil z vonjem samca ali samice) v primerjavi z lončkom brez vonja (čisti nastil). To pomeni, da so vse miši razlikovale lonček z vonjem od lončka brez vonja. Predvidevamo, da osnovno delovanje vohalnega sistema pri miših SF-1KO ni spremenjeno glede na divji tip miši. To je skladno z raziskavo Pierman in sod. (273), kjer ugotavljajo, da tako samci kot samice miši brez gena za aromatazo (ArKO) kljub pomanjkanju estradiola v obdobju pred in po rojstvu razlikujejo vonj urina od čiste vode.

Naslednja ugotovitev v obeh poskusih (z lončki in labirint Y) je, da nobena skupina miši glede na genotip in spol ni razlikovala vonja samic od vonja samcev. Večina raziskav vohalnega obnašanja je narejenih pri miših s prisotnimi spolnimi žlezami ali po dodanih spolnih hormonih. Kljub vsemu poročajo o razlikah med spoloma pri miših z odstranjenimi spolnimi žlezami in brez dodanih spolnih hormonov. Tako na primer samice bolje zaznavajo nižje koncentracije urina (od obeh spolov) v primerjavi s samci (273, 274). V raziskavi Piermana in sod. (273) so miši obeh spolov z odstranjenimi spolnimi žlezami razlikovale urin samca od urina samic. Samci so ovohavali dalj časa urin samic, medtem ko so samice ovohavale dalj časa urin samcev v primerjavi z urinom nasprotnega spola. Zakaj v naši raziskavi nismo dobili podobnih razlik med spoloma, obstaja več možnih razlogov. Prvi razlog je sama izvedba poskusa. V omenjeni raziskavi Piermana in sod. (273) so uporabili vohalni poskus navajanja/odvajanja od vonja urina samca in samice, ki se zelo razlikuje od poskusov, ki smo jih uporabili v naši raziskavi. Miši so bile zaporedoma, v treh različnih poskusih, izpostavljene trem različnim vonjem. V vsakem poskusu so imele na voljo samo en vonj. V prvem poskusu so bile zaporedoma izpostavljene vodi, nato urinu samcev in na koncu urinu samic, v drugem poskusu ravno tako vodi, nato urinu samic in na koncu urinu samcev. Miši so ovohavale le en vonj naenkrat, za razliko od našega poskusa, kjer so imele na razpolago lončke s tremi

različnimi vonji ali dve stimulusne živali v labirintu Y. Možno je, da je sama izvedba poskusa vplivala na rezultate na tak način, da v naših poskusih miši niso kazale privlačnosti za nasprotni spol. Drugi dve razliki sta bili v sami pripravi poskusnih miši. Mišim v naši raziskavi smo odstranili spolne žleze že pred puberteto in so bile izolirane že od 30. dneva starosti, za razliko od raziskave Pierman in sod. (273), kjer so mišim odstranili spolne žleze po puberteti in so bile večino časa nastanjene v skupinah. Izolacija bi lahko vplivala na spremenjeno vohalno obnašanje preko povečane tesnobe oziroma spremenjenega socialnega obnašanja (269) ali v smislu pomanjkanja stika z vrstniki in z vonji istega ali nasprotnega spola (275).

Na vohalno obnašanje bi lahko vplivali tudi spolni hormoni. Lahko, da je čas pubertete pomemben za popoln razvoj možganov in s tem ustrezno obnašanje, kot so ugotovili že pri nekaterih drugih vrstah glodavcev (276, 277) in kot to omenjamo tudi mi v razpravi o vohalnem obnašanju po dodanem testosteronu (poglavje 5.2.2). Pri miših ArKO ugotavljajo, da imajo delno spremenjeno prepoznavanje vonjev različnih spolov (273). To bi lahko pomenilo, da pomanjkanje estradiola v obdobju pred in po rojstvu vpliva na prepoznavanje vonjev. To je skladno tudi z našimi rezultati, saj miši SF-1KO med fetalnim razvojem niso bile izpostavljene estradiolu in brez dodanih spolnih hormonov ne ločujejo vonja samic od vonja samcev. Pri miših WT pa so zaradi odstranitve spolnih žlez pred nastopom pubertete manjkali spolni hormoni v obdobju po rojstvu in do pubertete, kar bi prav tako lahko bil vzrok za neprepoznavanje obeh vonjev.

5.2.2 Obnašanje miši v poskusu vohalnega prepoznavanja in v labirintu Y po dodanem testosteronu

Testosteron zgodaj v fetalnem obdobju maskulinizira možgane in kasneje v odraslem obdobju vzpodbudi pri samcih moške vzorce obnašanja. Raziskave na podganah kažejo, da je tudi vohalno prepoznavanje pri samcih odvisno od izpostavitve testosteronu v fetalnem življenju (278). Raziskave na miših dokazujejo nasprotno. Testosteron pri miših med fetalnim življenjem ni nujno potreben za izražanje privlačnosti do vonja samic, saj samice po dodajanju testosterona izražajo podobno obnašanje kot samci (125, 126). To dokazujejo tudi naši rezultati, saj samice obeh genotipov po dodajanju testosterona kažejo privlačnost do vonja samic v obeh vohalnih poskusih. Presenetljivo je, da samci obeh genotipov po dodanem testosteronu niso kazali privlačnosti do vonja samic v nobenem od vohalnih poskusov. Tudi pri moškem spolnem in agresivnem obnašanju po dodanem testosteronu

nismo dobili pričakovanih razlik med samci WT in ostalimi mišmi, saj smo pričakovali, da bodo ti vzorci obnašanja najbolj intenzivno izraženi ravno pri samcih WT. Samo trije samci WT od sedmih so se vzpenjali na stimulusne samice, dva izmed njih sta kopulirala in samo eden je izražal ejakulatorni refleks. Čeprav pri podganah poročajo o pozitivni povezavi med slabo izraženim moškim spolnim obnašanjem in neprivlačnostjo do vonja samic (279), pri nas nismo odkrili take povezave. Samec, ki je najbolje izražal moško spolno obnašanje, ni kazal socialne privlačnosti v nobenem od vohalnih poskusov.

Eden od možnih razlogov za slabše izražanje moških vzorcev obnašanja pri samcih WT je odstranitev mod pred puberteto. V naši raziskavi smo samcem WT odstranili moda pri 25. dnevu starosti. V ostalih raziskavah vohalnega obnašanja so uporabili samce z modi (122, 124, 262) ali pa so odstranili moda po puberteti (124, 126). Odstranitev mod pred puberteto lahko kljub ustreznemu hormonskemu dodajanju vpliva na spremenjeno socialno in zmanjšano spolno obnašanje pri podganah (276) ter zmanjšano spolno obnašanje pri hrčkih (277, 280). Močnik in Tratnjek (281) sta primerjali obnašanje v vohalnih poskusih pri dveh skupinah samcev, z odstranjenimi modi pred in po puberteti. Izkazalo se je, da samci z odstranjenimi modi pred puberteto kljub dodanem testosteronu ne prepoznavajo vonja samic v primerjavi s samci z odstranjenimi modi po puberteti, ki so po dodanem testosteronu kazali privlačnost do vonja samic. Vse kaže na to, da pomanjkanje spolnih hormonov v obdobju pred rojstvom in med puberteto vpliva na vohalno prepoznavanje predvsem pri samcih. Delno to dokazujejo tudi raziskave pri miših brez gena za encim aromatazo (ArKO). Samice ArKO po dodanem testosteronu kažejo privlačnost do vonja samic v obeh poskusih, z lončki in v labirintu Y (125), medtem ko samci ArKO po dodanem testosteronu kažejo privlačnost do vonja samic le v poskusu vohalnega prepoznavanja (116, 124). Podobne rezultate smo dobili tudi mi, saj samice v naši raziskavi kažejo po dodanem testosteronu privlačnost do vonja samic v obeh vohalnih poskusih, medtem ko samci ne kažejo privlačnosti do vonja samic v nobenem od vohalnih poskusov.

Zanimivo je, da so se samci SF-1KO odzvali v vohalnih poskusih podobno kot samci WT in niso dalj časa ovohavali vonja samic od vonja samcev. Skupno obema skupinama samcev je prisotnost spolnega kromosoma Y. Možno je, da so prav genetski dejavniki povzročili te razlike med spoloma pri obeh genotipih. Že prejšnje raziskave so skušale dokazati vpliv spolnih kromosomov na vohalno obnašanje. Miši FCG (*angl.* four core

genotypes) imajo prisoten spolni kromosom Y ne glede na prisotnost različnih spolnih žlez. Pri tem modelu miši niso našli vpliva kromosoma Y, ampak le vpliv prisotnosti mod med fetalnim življenjem na privlačnost do vonja samic (15). Pri modelu miši FCG pa vseeno ni skupine miši, ki bi imela gen *Sry* in hkrati ne bi imela razvitih mod tako kot v naši raziskavi samci SF-1KO. Možno, da je ravno prisotnost gena *Sry* vzrok za podobno obnašanje samcev WT in samcev SF-1KO. Glede na vse to obstaja možnost, da kombinacija pomanjkanja spolnih hormonov v času fetalnega razvoja pri samcih SF-1KO in med puberteto pri samcih WT vpliva na vohalno obnašanje pod pogojem, da je prisoten ustrezen par spolnih kromosomov (XY) vključno z genom *Sry*.

5.2.3 Obnašanje miši v poskusu vohalnega prepoznavanja in v labirintu Y po dodajanju estradiol benzoata in progesterona

Dodajanje estradiol benzoata in progesterona je vzpodbudilo daljše ovohavanje lončka z vonjem samic od lončka z vonjem samcev pri vseh miših razen pri samicah WT. Samice WT so sicer dalj časa ovohavale lonček z vonjem samic, vendar razlika ni bila statistično značilna. Rezultati poskusa vohalnega prepoznavanja z lončki po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu so bili presenetljivi, saj na splošno velja, da samice v estrusu bolj privlači vonj samcev kot vonj samic (275, 282). Tudi podganji samci z odstranjenimi modi po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu, podobno kot podganje samice v estrusu, več časa preživijo v prostoru s samcem kot v prostoru s samico (283). V nasprotju s to raziskavo pa Portillio in sod. (279) ugotavljajo, da podganji samci z odstranjenimi modi in po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu ne kažejo privlačnosti niti do vonja samcev niti do vonja samic. Očitno si rezultati raziskav vohalnega obnašanja po dodanih ženskih spolnih hormonih nasprotujejo. Težko je razložiti, zakaj so miši v naši raziskavi kazale privlačnost do vonja samic namesto do vonja samcev. Razlogov za take rezultate je lahko več, saj so v raziskavah ugotovili, da je vohalno obnašanje močno odvisno od prejšnjih izkušenj, izvedbe poskusa ter genetske variabilnosti poskusnih in stimulusnih miši (275, 284, 285). Miši v naši raziskavi od izolacije (30. dan starosti) do poskusa niso bile v stiku z nobenim vrstnikom. Do njihovih kletk so lahko prihajale le hlapne vonjave preko zraka, torej niso imele izkušenj z nehlapnimi vonji nasprotnega ali istega spola. Možno je, da je ustrezen vzorec ženskega vohalnega obnašanja odvisen od prejšnjih izkušenj in od stikov z vonji, ki prehajajo do živali ne samo po zraku, ampak predvsem preko ustne votline in vomeronazalnega sistema (275). Izkazalo se je, da samice kažejo privlačnost do hlapnih

vonjav nasprotnega spola le v primeru, da so imele predhodno že neposreden stik (preko ustne votline) z vonjem urina istega samca. V primeru, da je bil stik z urinom le preko zraka, niso kazale privlačnosti do tega vonja. Prav tako niso kazale privlačnosti do hlapnih vonjav neznanega samca (285). Tudi v naši raziskavi miši v labirintu Y, ki so bile izpostavljene le vonju preko zraka, niso kazale privlačnosti niti do samice niti do samca. Očitno je ustrezno prepoznavanje hlapnih vonjav odvisno od večjega števila dejavnikov in ne samo od izpostavljenosti ustreznim spolnim hormonom.

Razlog za izražanje privlačnosti do vonja samic po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu verjetno ni različna izpostavitev spolnim hormonom med fetalnim razvojem, saj so vse miši kazale podobno vohalno obnašanje, ne glede na to ali so bile izpostavljene estradiolu med fetalnim razvojem ali ne. Kaže, da spolna diferenciacija vohalnega sistema pri miših ni odvisna od organizacijskih učinkov estrogenih hormonov (124, 125, 284) tako kot pri podganah (278). Zelo malo je raziskav vohalnega obnašanja miši po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu, ki bi bile podobne naši raziskavi, vendar tudi rezultati drugih raziskav, kjer so samicam dodali samo estrogene hormone, med seboj niso skladni. Samice po dodanem estradiolu v nekaterih poskusih kažejo privlačnost do vonja samcev (126, 284), v drugih poskusih pa celo privlačnost do vonja samic (125). To še dodatno dokazuje, da je socialna privlačnost odvisna od številnih drugih dejavnikov, ki jih bo potrebno proučiti v dodatnih raziskavah.

5.3 Obnašanje miši v poskusu socialnega prepoznavanja brez dodanih spolnih hormonov, po dodanem estradiol benzoatu, progesteronu in testosteronu

V poskusu socialnega prepoznavanja smo ocenjevali socialno obnašanje miši oziroma bolj natančno vohalno obnašanje, sposobnost prepoznavanja in pomnjenja znanega vonja v primerjavi z neznanim vonjem. Potrebno je omeniti, da pod socialno obnašanje v širšem pomenu besede spada tudi agresivno obnašanje in del spolnega ter starševskega obnašanja, o katerih razpravljamo v drugih poglavjih.

Za raziskovanje socialnega prepoznavanja pri laboratorijskih glodavcih se najpogosteje uporablja poskus, ki vsebuje elemente navajanja in odvajanja (habituacije/dishabituacije) vonja živali iste vrste. Poskus socialnega prepoznavanja temelji na spoznanju, da miš raje ovohava neznano kot že znano miš. Ker so miši v tem poskusu izpostavljene večkrat

zaporedoma isti samici, si njen vonj postopoma zapomnijo in se čas ovohavanja zato zmanjšuje. Čas ovohavanja se ponovno poveča, ko v kletko dodamo novo samico, ki zopet vzpodbudi zanimanje pri poskusni miši (182).

V poskusu socialnega prepoznavanja smo opazovali miši brez dodanih spolnih hormonov, po dodanih testosteronskih vsadkih in po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu. Vzorca obnašanja (navajanja in odvajanja), ki ga opisujemo na začetku, v naši raziskavi nismo ugotovili pri nobenem genotipu ali spolu miši ne glede na njihovo hormonsko stanje. Čeprav smo pričakovali zmanjševanje ovohavanja med prvim in osmim poskusom, je trajanje ovohavanja med ponovitvami poskusov pri vseh miših (ne glede na hormonsko stanje) postopoma naraščalo. Prav tako nismo dobili statistično značilnega povečanja ovohavanja med osmim in devetim poskusom, ko smo v kletko dodali novo samico, pri nobenem od genotipov ali spolov miši in ne glede na njihovo hormonsko stanje.

Razlogov za take rezultate je lahko več. Za normalno socialno prepoznavanje mora biti zagotovljeno normalno delovanje vohalnega sistema. Mislimo, da osnovno zaznavanje vonja pri miših v naši raziskavi deluje normalno, saj so miši v poskusu vohalnega prepoznavanja ločile čisti lonček od lončka z vonjem.

Drugi razlog bi lahko bil, da imajo miši v naši raziskavi spremenjeno socialno obnašanje in/ali socialni spomin zaradi zgodnje izolacije. Z raziskavo Kerčmar in sod. (270) smo ugotovili, da pri izoliranih samicah in samcih ne pride do tipičnega zmanjšanja ovohavanja med prvim in osmim poskusom in povečanja ovohavanja med osmim in devetim poskusom v primerjavi z mišmi, ki so živele z vrstniki. V tej raziskavi so bile uporabljene miši WT iz iste kolonije kot so bile naše miši. Vzrejene, odstavljene in izolirane so bile po istem postopku kot miši v naši raziskavi. Edina razlika med obema raziskavama je bila v izvedbi poskusa. V raziskavi Kerčmar in sod. (270) smo uporabili standarden poskus socialnega prepoznavanja (182), medtem ko smo v naši raziskavi dodali škatlico z odprtinami, v katero smo zaprli stimulusno samico. Škatlico smo dodali zaradi povečane agresivnosti miši SF-1KO do samic (265). Glede na to, da je bil v omenjeni raziskavi (270) ugotovljen podoben vzorec ovohavanja tudi brez škatlice, predvidevamo, da je bila izolacija eden od pomembnih dejavnikov, ki je vplival na spremenjeno socialno obnašanje in/ali spomin. Glede na to, da pri nobeni miši nismo ugotovili učinka navajenosti na vonj, predvidevamo da je izolacija vplivala na vse miši, obeh genotipov in spolov.

V poskusu socialnega prepoznavanja smo ugotovili še nekatere druge razlike med mišmi SF-1KO in WT, ki pa jih bolj povezujemo s spremenjenim socialnih obnašanjem in s povečano tesnobo pri miših SF-1KO. Tako je bil na primer v poskusu socialnega prepoznavanja brez dodanih spolnih hormonov in po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu povprečen čas ovohavanja pri miših SF-1KO krajši kot pri miših WT. Po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu so miši SF-1KO rabile tudi dalj časa, da so začele ovohavati škatlico s samico kot miši WT. Škatlica je poleg stimulusne samice predstavljala nov predmet v kletki in zato je naš poskus vseboval poleg socialnega prepoznavanja tudi elemente poskusa prepoznavanja novega predmeta. Poskus, kjer miši izpostavimo novemu predmetu, se prav tako kot dvignjen labirint uporablja za proučevanje obnašanja podobnega tesnobi (252). Skupaj z rezultati v dvignjenem labirintu lahko zato sklepamo, da miši SF-1KO izražajo več obnašanja podobnega tesnobi kot miši WT in zato potrebujejo dalj časa, da začnejo ovohavati in tudi manj časa ovohavajo. Zmanjšan čas ovohavanja v vohalnih poskusih so ugotovili tudi pri samicah brez gena za encim aromatazo (ArKO) in ga razlagajo kot posledico zmanjšane motivacije zaradi pomanjkanja estradiola med fetalnim življenjem (125). Tudi miši SF-1KO v naši raziskavi nimajo prisotnih spolnih hormonov med fetalnim razvojem, vendar v ostalih vohalnih poskusih (vohalno prepoznavanje, labirint Y) pri njih nismo ugotovili zmanjšanega ovohavanja. Poleg tega po dodanem testosteronu v poskusu socialnega prepoznavanja ni bilo več razlik v času ovohavanja med genotipoma, kar pomeni, da pomanjkanje spolnih hormonov med fetalnim obdobjem ni nepovratno spremenilo ovohavanja pri odraslih miših.

5.4 Starševsko obnašanje miši brez dodanih spolnih hormonov

Raziskave starševskega obnašanja navajajo različne podatke o razlikah med spoloma glede na linijo miši, starost in pogojev poskusa. Na splošno lahko rečemo, da je starševsko obnašanje pri odraslih miših obnašanje, ki se zelo razlikuje med spoloma (160). Samica, ki ni bila nikoli breja, se zelo hitro odzove na prisotnost mladičev in začne izražati različne vzorce starševskega obnašanja, medtem ko se samci velikokrat za mladiče ne zmenijo ali pa jih celo ubijejo (160, 286, 287). V naši raziskavi smo opazovali odrasle miši brez spolnih hormonov. Miši WT so imele odstranjene spolne žleze pred puberteto, medtem ko miši SF-1KO spolnih žlez nimajo. Vse miši, ne glede na spol in genotip, so izražale vzorce starševskega obnašanja: prinašanje mladičev v gnezdo, negovanje, čepenje nad mladiči in gradnja gnezda. To je skladno z ostalimi raziskavami, ki ugotavljajo, da spolni hormoni

niso nujno potrebni za izražanje starševskega obnašanja (15, 288). Čeprav so vse miši izražale starševsko obnašanje, smo za različne vzorce obnašanja dobili razlike tako med genotipoma in spoloma kot tudi razlike med samicami WT in ostalimi skupinami miši. Iz rezultatov lahko povzamemo štiri glavne ugotovitve. Prvič: miši SF-1KO so se v večini vzorcev obnašanja razlikovale od miši WT. Drugič: samci WT, ki so edini izpostavljeni testosteronu v času fetalnega življenja, niso izražali najmanj starševskega obnašanja, kot je bilo pričakovano. Tretjič: v nekaterih vzorcih obnašanja so samice izražale starševsko obnašanje bolj intenzivno kot samci ne glede na genotip. Četrtič: samice WT so na splošno izražale največ starševskega obnašanja v primerjavi z ostalimi skupinami.

V poskusu starševskega obnašanja smo dobili veliko razlik med mišmi SF-1KO in mišmi WT. Miši SF-1KO so potrebovale dalj časa preden so začele izražati skoraj vse aktivnosti, ki so bile neposredno ali posredno povezane z mladiči. Čas do prvega stika z mladičem, začetka negovanja in začetka čepenja nad mladiči in čas do začetka gradnje gnezda je bil pri miših SF-1KO daljši kot pri miših WT. Tudi samo trajanje nekaterih aktivnosti se je razlikovalo med genotipoma. Miši SF-1KO so manj časa čepele nad mladiči in manj časa gradile gnezdo, le-to pa je bilo tudi slabše oblikovano kot pri miših WT. Podobno smo ugotovili že v poskusu socialnega prepoznavanja, kjer so miši SF-1KO potrebovale dalj časa, da so začele ovohavati škatlico s samico in jo tudi krajši čas ovohavale v primerjavi z mišmi WT. Te razlike so najverjetneje posledica spremenjenega socialnega obnašanja in/ali povečanega obnašanja podobnega tesnobi (poglavje 5.3 in 5.1). Mladiči in papir za gradnjo gnezda so tako kot škatlica predstavljali nov predmet, ki bi pri miših SF-1KO lahko povzročil povečan strah in tesnobo. Spremenjeno obnašanje miši SF-1KO je lahko posledica pomanjkanja spolnih hormonov v času fetalnega življenja in/ali posledica spremenjenega ventromedialnega jedra v hipotalamusu. Na vse to je lahko še dodatno vplivala zgodnja izolacija živali, o kateri razpravljamo že v poglavju 5.3 in 5.1. Zanimivo je, da v času trajanja negovanja in v številu prinesenih mladičev nismo dobili razlik med mišmi, ne glede na genotip ali spol. To dokazuje, da se del starševskega oziroma socialnega obnašanja pri miših SF-1KO izraža normalno.

Veliko raziskav ugotavlja, da testosteron med fetalnim življenjem vpliva na različno izražanje starševskega obnašanja med spoloma (15, 288, 289, 290). Samci WT so večino vzorcev starševskega obnašanja izražali manj intenzivno kot samice WT, medtem ko so se samice WT za večino vzorcev (gradnja gnezda, čepenje nad mladiči in prinašanje mladičev

v gnezdo) razlikovale od ostalih treh skupin miši in so najbolje izražale starševsko obnašanje. Ker so samci WT edina skupina miši, ki je v času fetalnega življenja izpostavljena testosteronu, smo pričakovali, da bodo slabše izražali starševsko obnašanje kot miši SF-1KO in da se bodo miši SF-1KO obnašale podobno kot samice WT. V raziskavi Keller in sod. (288) ugotavljajo, da samice, ki so zaradi pomanjkanja alfa-feto proteina izpostavljene estrogenim hormonom med fetalnim življenjem, kažejo podobno starševsko obnašanje kot samci. Naši rezultati so pokazali nasprotno. V večini vzorcev so se miši SF-1KO obnašale bolj podobno samcem WT kot samicam WT. Možno je, da so vzroki za podobno obnašanje miši SF-1KO in samcev WT različni pri obeh skupinah miši. Možno je, da pri samcih WT na zmanjšanje starševskega obnašanja vpliva testosteron med fetalnim življenjem, medtem ko je pri miši SF-1KO vzrok spremenjeno socialno obnašanje.

Čeprav nismo dobili razlik med samci in samicami SF-1KO, smo za nekatere vzorce obnašanja dobili razlike med spoloma ne glede na genotip. Samice obeh genotipov so dalj časa čepele nad mladiči in dalj časa gradile gnezdo kot samci obeh genotipov. Glede na to, da so samci SF-1KO bolj podobni samcem WT in da sta pri obeh prisotna spolna kromosoma XY, bi to pomenilo, da na razlike med spoloma vplivajo poleg testosterona tudi spolni kromosomi. Podobno so ugotovili že Gatewood in sod. (15) pri gensko spremenjenih miših FCG (*angl.*four core genotypes), pri katerih je prisotnost moških ali ženskih spolnih žlez neodvisna od spolnega kromosoma Y. V navedeni raziskavi so samice XX izražale boljše starševsko obnašanje kot samice XY, samci XX in samci XY. Zaenkrat ne moremo zaključiti, da na nekatere vzorce starševskega obnašanja vplivajo genetski dejavniki neodvisno od spolnih hormonov, saj razlik med spoloma pri miših SF-1KO nismo dobili. Možno je, da se zaradi spremenjenega socialnega obnašanja in povečane tesnobe pri miših SF-1KO niso pokazale razlike med spoloma, ker miši SF-1KO niso izrazile starševskega obnašanja v celoti. V prihodnosti bi bilo potrebno ugotoviti ali je pri miših SF-1 KO prisoten strah pred mladiči, ki bi ga bilo mogoče zmanjšati s ponavljanjem poskusov. Možno je, da bi že sama nastanitev miši SF-1KO z vrstniki zmanjšala tesnobo in s tem povečala izražanje starševskega obnašanja in tudi drugih oblik socialnega obnašanja.

5.5 Agresivno obnašanje miši brez dodanih spolnih hormonov in po dodanem testosteronu

V poskusih za agresivno obnašanje do stimulusnih samcev brez vohalnih betičev smo opazovali tri ločene skupine miši (poglavje 3.1).

Prvo skupino miši smo opazovali brez dodanih spolnih hormonov po poskusu moškega spolnega obnašanja. V tej skupini so na splošno miši SF-1KO izražale več agresivnega obnašanja kot miši WT. Čeprav v številu napadov in ugrizov nismo dobili statistično značilnih razlik, so miši SF-1KO hitreje ugriznile, hitreje in večkrat začele agresivno negovati in tudi dalj časa agresivno negovale stimulusne samce kot miši WT.

Tretjo in četrto skupino miši smo opazovali po vstavljenih testosteronskih vsadkih. Tretjo skupino miši smo opazovali po poskusu moškega spolnega obnašanja, četrto skupino po poskusu starševskega obnašanja. Tudi pri tretji skupini miši smo ugotovili povečano agresivnost pri miših SF-1KO v primerjavi z mišmi WT. Miši SF-1KO so hitreje začele izvajati agresivne aktivnosti in imele večje število napadov na stimulusne samce v primerjavi z mišmi WT. Ko smo tretjo skupino miši po dodanem testosteronu opazovali za moško spolno obnašanje, se je nepričakovano izkazalo, da miši SF-1KO kažejo povečano agresivno obnašanje tudi do stimulusnih samic. Miši SF-1KO so hitreje ugriznile ter hitreje in večkrat napadle stimulusne samice kot miši WT.

Če vse skupaj povzamemo, miši SF-1KO izražajo agresivno obnašanje v različnih socialnih situacijah in v različnih hormonskih stanjih. Za povečano agresivnost bi bilo lahko več razlogov. Kot prvi razlog lahko navedemo spremenjeno vohalno obnašanje. Podobna agresivnost do stimulusnih samic je bila ugotovljena pri samcih miši brez gena za encim aromatazo (ArKO), za estrogenski receptor α (ERαKO) in za estrogenski receptor α and β (ERαβKO) (197, 228, 244, 291). Agresivno obnašanje samcev ArKO in ERαKO razlagajo kot posledico spremenjenega vohalnega prepoznavanja zaradi pomanjkanja estradiola med fetalnim življenjem. Samci ERαKO (122, 262) in ArKO (116, 124) v vohalnih poskusih ne kažejo privlačnosti do vonja samic v primerjavi z vonjem samcev. Opisane raziskave so bile narejene samo na samcih, zato težko rečemo ali pomanjkanje spolnih hormonov vpliva na agresivnost tudi pri samicah. V naši raziskavi so agresivno obnašanje do stimulusnih samic izražali samci in samice SF-1KO in vsaj pri samicah SF-1KO vzrok za agresivnost ni neprepoznavanje vonja samice, saj v obeh vohalnih poskusih

po dodanem testosteronu kažejo privlačnost do vonja samic. V poskusih vohalnega obnašanja brez dodanih spolnih hormonov nismo dobili nobenih razlik med genotipom ali spolom miši. Vse miši so ločile čisti lonček od lončka z vonjem, kar dokazuje, da vsaj osnovno delovanje vohalnega sistema pri miših SF-1KO ni spremenjeno.

Kot drugi razlog, ki bi lahko vplival na povečano agresivnost, lahko navedemo spremenjeno ventromedialno jedro hipotalamusa (VMH) pri miših SF-1KO. Ventromedialno jedro hipotalamusa je zelo pomembno pri uravnavanju socialnega oziroma v ožjem pomenu agresivnega obnašanja (18). Začetne raziskave so pokazale, da poškodbe VMH pri podganah povzročijo povečanje agresivnosti vzpodbujene z električnim draženjem (292). Prav tako samci podgan s poškodbami VMH večkrat sodelujejo v spopadih s samci, čeprav sami niso pobudniki teh spopadov in prav tako ne kažejo agresivnega obnašanja do samic (293). Pri miših SF-1KO je spremenjen predvsem dorzomedialni del VMH (98), kjer so ugotovili spremenjeno izražanje različnih beljakovin (101, 102, 106) in prav tako so spremenjene živčne povezave VMH z drugimi področji možganov (Büdefeld, neobjavljeno). Vse naštete spremembe bi lahko pripomogle k povečanju agresivnega obnašanja pri miših SF-1KO.

Pri analizi rezultatov agresivnega obnašanja tretje in četrte skupine miši (po dodanem testosteronu) smo ugotovili, da so se rezultati obeh skupin razlikovali tako v kvaliteti agresivnosti kot tudi v številu agresivnih aktivnosti. V poskusih po moškem spolnem obnašanju (tretja skupina miši) je bilo več ugrizov, napadov in manj agresivnosti v obliki agresivnega negovanja. V poskusih po starševskem obnašanju (četrta skupina) je bilo število ugrizov in napadov manjše, miši pa so izražale agresivno obnašanje predvsem v obliki agresivnega negovanja. Iz rezultatov lahko sklepamo, da različno zaporedje poskusov lahko vpliva na rezultate obnašanja. Očitno moško spolno obnašanje oziroma predhodne izkušnje s samico vzpodbujajo agresivnost do samcev. To je skladno s prejšnjimi raziskavami, kjer so ugotovili, da prisotnost samice, podobno kot izolacija, vzpodbuja agresivnost pri miših (294, 295).

Naslednja ugotovitev iz poskusov agresivnega obnašanja po dodanem testosteronu je, da samci WT v nobeni od obeh skupin miši (tretja in četrta) niso izražali več agresivnega obnašanja v primerjavi s samicami WT in mišmi SF-1KO. V tretji skupini so izražali samci WT celo statistično značilno manjše število ugrizov in napadov kot samice obeh genotipov. To je neskladno z nekaterimi raziskavami, ki navajajo, da je za popolno

izražanje agresivnosti med samci pomembna aromatizacija testosterona v možganih. Samci z neobčutljivostjo androgenskega receptorja ne kažejo spremenjenega agresivnega obnašanja (216), medtem ko samci ArKO (243) in samci ERαKO kažejo zmanjšano agresivnost v poskusih s samci (197). Za maskulinizacijo agresivnega obnašanja naj bi bil pomembnejši estrogenski receptor α kot estrogenski receptor β, saj samci brez estrogenskega receptorja β kažejo normalno agresivnost v poskusih s stimulusnimi samci (198). V naši raziskavi samice WT in miši SF-1KO kljub temu da niso izpostavljene testosteronu med fetalnim razvojem, izražajo več agresivnega obnašanja kot samci WT. To bi lahko pomenilo dvoje: ali da zaradi odstranitve mod pred puberteto pri samcih WT nismo uspeli vzpodbuditi agresivnosti ali da spolni hormoni v fetalnem obdobju niso nujno potrebni za izražanje agresivnosti med samci.

Ker je v literaturi le malo podatkov o vplivu pubertete na maskulinizacijo vzorcev obnašanja, lahko sklepamo na to le iz raziskav na podganah in hrčkih (276, 277), kjer ugotavljajo, da pomanjkanje spolnih hormonov med puberteto lahko povzroči manjše izražanje agresivnega obnašanja. Tudi ostali rezultati naše raziskave (poglavje 5.2.2 in 5.6.1) po dodanem testosteronu kažejo na slab oziroma nepričakovan odziv samcev WT. V vohalnih poskusih samci WT niso prepoznavali vonja samic in v poskusih moškega spolnega obnašanja je le majhno število samcev kazalo kopulacijo vključno z ejakulatornimi refleksi.

Zaenkrat je težko zaključiti, na kateri stopnji spolne diferenciacije so spolni hormoni najpomembnejši ali celo nujni za maskulinizacijo in izražanje značilne agresivnosti med samci. Pri miših ERαKO je nemogoče ločiti ali so spremembe posledica pomanjkanja estradiola pred rojstvom ali po njemu, saj nimajo delujočega ERα skozi celo življenje. Drugače je pri samcih ArKO, kjer dokazujejo, da je agresivnost možno vzpodbuditi tudi kasneje, z dodajanjem estradiola po rojstvu. Agresivnost samcev ArKO se poveča ob dodatku estradiola, pri čemer je bil učinek večji, če so samcem dodajali estradiol čim bližje dnevu rojstva in dalj časa (243). Rezultati na samcih ArKO in naši rezultati dokazujejo, da za agresivnost med samci ni nujna izpostavitev testosterona med fetalnim razvojem, ampak jo je možno vsaj delno vzpodbuditi preko aktivacijskih učinkov testosterona v odraslem obdobju.

Zanimivo je, da smo v tretji skupini po dodanem testosteronu ugotovili več agresivnega obnašanja pri samicah kot pri samcih, ne glede na genotip, v drugi skupini pa je bilo več

agresivnega negovanja pri samicah SF-1KO v primerjavi s samci SF-1KO. Če je res pomanjkanje spolnih hormonov med puberteto povzročilo zmanjšanje agresivnosti pri samcih WT, to vseeno ne drži za samce SF-1KO, ki nimajo spolnih žlez in so bili na splošno manj agresivni od samic SF-1KO. Ker je pri obeh skupinah samcev, ne glede na genotip, prisoten enak par spolnih kromosomov (XY), bi to pomenilo, da so za del teh razlik lahko krivi tudi genetski dejavniki. O vplivu spolnih kromosomov na agresivnost so poročali že Gatewood in sod. (15). Njihovi rezultati kažejo na to, da kromosom Y vpliva na povečanje agresivnosti, saj je bil delež živali, ki so izražale agresivnost, manjši pri samicah XX kot pri samicah XY, samcih XX in samcih XY. Pojavlja se vprašanje, ali je pri samcih obeh genotipov v naši raziskavi podoben mehanizem vplival na zmanjšanje agresivnosti. Zanimivo je, da smo podobne razlike med spoloma dobili tudi v poskusih vohalnega obnašanja po dodanem testosteronu, saj samci SF-1KO, podobno kot samci WT, niso prepoznavali vonja samice. Možno je, da gre pri obeh vzorcih obnašanja za podoben mehanizem in da so spolni hormoni v različnih obdobjih življenja pomembni samo pri samcih, ker imajo prisotna spolna kromosoma XY.

5.6 Spolno obnašanje miši

5.6.1 Moško spolno obnašanje miši po dodanem testosteronu

V izražanju moškega spolnega obnašanja po dodanem testosteronu nismo ugotovili nobenih razlik med genotipoma ali spoloma miši. Vse miši so imele podobno število poskusov naskoka, naskokov in potiskov z medenico. Očitno za izražanje omenjenih vzorcev moškega spolnega obnašanja ni nujno potrebna izpostavitev testosteronu med fetalnim razvojem, ampak so za izražanje potrebni le aktivacijski učinki testosterona v odraslem obdobju. Kar nekaj raziskav pri miših opisuje podobne vzorce moškega spolnega obnašanja pri obeh spolih (126, 227, 296), zato ni povsem jasno, ali so možgani pri samicah miši sploh demaskulinizirani ali pa so to vzorci obnašanja, ki vsaj pri tej liniji miši (C57BL/6J) niso spolno različni (36, 297). Ostale vzorce obnašanja, kot je vstop penisa v nožnico in ejakulatorni relfeks, smo opazili le pri samcih WT, saj jih pri samicah WT in miših SF-1KO ne moremo opazovati, ker imajo zunanje spolne organe ženske. Kljub vsemu v nobenem poskusu nismo ugotovili statistično značilno večjega izražanja teh vzorcev obnašanja pri samcih WT v primerjavi z ostalimi skupinami miši. Od skupno sedmih sta le dva samca WT kopulirala in le en samec WT ejakuliral. Očitno s

testosteronom pri samcih WT nismo uspeli vzpodbuditi celotnega moškega spolnega obnašanja. Podobno so ugotovili že v drugih raziskavah, kjer pri nekaterih linijah miši po odstranitvi mod niso uspeli povrniti ejakulatornih refleksov ali celo vstopov penisa v nožnico (36). Linija C57BL/6J se očitno bolje odziva na testosteron, saj so po vstavljenih vsadkih s testosteronom skoraj pri vseh samcih uspeli vzpodbuditi celotno kopulatorno obnašanje, vključno z ejakulatornimi refleksi (227). V naši raziskavi smo uporabili enako linijo miši in podobne vsadke kot v raziskavi Wersinger in sod. (227), zato predvidevamo, da so imeli samci WT ustrezno koncentracijo testosterona v krvi, ki bi morala vzpodbuditi celotno moško spolno obnašanje. Glede na to, da v vohalnih poskusih prav tako nismo dobili pričakovanega obnašanja. predvidevamo, da je vzrok za manjše izražanje kopulatornega obnašanja odstranitev spolnih žlez pred puberteto. Pri samcih podgane in hrčka je bilo ugotovljeno, da je obdobje pubertete pomembno za popolno izražanje moškega spolnega obnašanja (276, 280). Prav tako smo v naši raziskovalni skupini ugotovili, da samci z odstranjenimi modi pred puberteto, po dodanem testosteronu, ne kažejo privlačnosti do vonja samice, samci z odstranjenimi modi po puberteti pa kažejo normalno obnašanje v poskusu vohalnega prepoznavanja (281). Quadagno in sod. (298) ugotavljajo, da le 30 % samcev, ki so jim odstranili spolne žleze pri starosti 25 dni, kaže ejakulatorne reflekse, medtem ko nobeden od samcev z odstranjenimi spolnimi žlezami prvi dan po rojstvu ne kaže ejakulatornih refleksov kljub dodanim spolnim hormonom. Tudi samci miši brez gena za encim aromatazo (ArKO) kažejo močno zmanjšano izražanje moškega spolnega obnašanja (244). Po dodajanju spolnih hormonov, posebno po kombinaciji estradiol benzoata in dihidrotestosteron propionata, se je moško spolno obnašanje samcev ArKO izboljšalo. Kljub vsemu je število vstopov penisa v nožnico in število ejakulacij še vedno ostalo manjše kot pri samcih WT (299). Rezultati vseh navedenih raziskav in naši rezultati dokazujejo, da moško spolno obnašanje uravnavajo spolni hormoni v različnih obdobjih razvoja. Velik delež obnašanja se da, vsaj pri miših linije C57BL/6J, vzpodbuditi preko aktivacijskih učinkov estrogenih in androgenih hormonov pri obeh spolih. To je v nasprotju z raziskavami pri podganah in dihurjih, kjer so ugotovili, da so organizacijski učinki spolnih hormonov nujno potrebni za izražanje tega obnašanja (300, 301, 302). Pri miših bi bili lahko organizacijski učinki pomembni predvsem za izražanje vstopov penisa v nožnico in ejakulacij. Maskulinizacija teh vzorcev obnašanja pa bi lahko potekla tako med fetalnim obdobjem kot tudi po rojstvu in med puberteto.

5.6.2 Žensko spolno obnašanje miši po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu

V poskusu ženskega spolnega obnašanja smo opazovali spolno sprejemljivost (lordozo) poskusnih miši in nekatere vzorce obnašanja stimulusnih samcev (poskuse naskokov, naskoke, ejakulacijo). Stimulusni samci so večkrat poskusili naskočiti samce v primerjavi s samicami obeh genotipov. To si razlagamo s tem, da so stimulusni samci manj uspešno naskakovali samce kot samice. V številu naskokov ni bilo statistično značilnih razlik med genotipom ali spolom miši. Očitno so bili samci motivirani za začetek parjenja z vsemi mišmi ne glede na spol in genotip. Vseeno to ne pomeni, da so samce enako privlačile vse skupine miši. Privlačnost bi morali dodatno preveriti z vohalnimi poskusi, kjer bi stimulusne samce izpostavili hkrati vonjem različnih spolov in genotipov poskusnih miši po dodanih ženskih spolnih hormonih. Ugotovili smo, da so stimulusni samci največkrat ejakulirali, ko so bili skupaj s samicami obeh genotipov, pri čemer so prejele samice WT največje število ejakulacij v primerjavi z ostalimi skupinami miši. Pri analizi lordoze, edinega vzorca ženskega spolnega obnašanja, smo ugotovili, da so imele samice obeh genotipov višji količnik lordoze (LQ) kot samci obeh genotipov in da so imele samice WT najvišji LQ v primerjavi z drugimi skupinami miši. Naše rezultate lahko razdelimo v tri glavne ugotovitve: Prvič: miši SF-1KO so izražale manj intenzivno žensko spolno obnašanje kot samice WT, kljub temu da podobno kot samice WT niso izpostavljene spolnim hormonom med fetalnim razvojem. Drugič: samice WT so izražale najbolj intenzivno žensko spolno obnašanje v primerjavi z ostalimi tremi skupinami miši. Tretjič: za večino vzorcev obnašanja smo dobili razlike med spoloma ne glede na genotip. Te so pokazale, da so stimulusni samci bolj uspešno naskakovali samice kot samce obeh genotipov in bolje izražali kopulatorno obnašanje do samic obeh genotipov kot do samcev SF-1KO.

Pri miših SF-1KO smo ugotovili slabšo lordozo in posledično manjši LQ kot pri samicah WT. Glavno področje možganov, ki sodeluje pri uravnavanju lordoze, je ventromedialno jedro hipotalamusa (VMH) (147). Pri miših SF-1KO je struktura VMH spremenjena (98, 100) in posledično spremenjena tudi razporeditev teles živčnih celic, ki izražajo različne beljakovine (102, 105, 106). Spremenjena je tudi smer živčnih vlaken, ki potujejo iz VMH v predoptično področje možganov (Büdefeld, neobjavljeno). Vse te spremembe so verjetno glavni razlog za slabše izražanje lordoze pri miših SF-1KO v primerjavi s samicami WT.

Naši rezultati so skladni z rezultati na samicah z izbitim genom za SF-1 samo v centralnem živčnem sistemu (CNS). Samice CNS SF-1KO imajo prisotne jajčnike, vendar imajo podobne spremembe v VMH kot miši SF-1KO iz naše raziskave. Samice CNS SF-1KO imajo motnje v razmnoževanju, ki se kažejo v zmanjšani plodnosti, manjšem številu mladičev, nepravilnem ciklusu jajčnika, zmanjšanem številu ali popolni odsotnosti rumenih teles in zmanjšano lordozo (268). To dodatno potrjuje, da imajo miši SF-1KO zmanjšan LQ verjetno prav zaradi sprememb v VMH jedru. Spremembe v VMH se kažejo tudi v spremenjenem položaju celic, ki izražajo receptorje, pomembne za uravnavanje lordoze. Tako so pri samicah CNS SF-1KO ugotovili spremenjeno lego in zmanjšano število estrogenskih receptorjev α (ERα) in progestinskih receptorjev (PR) (268). Tudi pri miših SF-1KO so bile ugotovljene podobne razlike v izražanju PR (Büdefeld in Grgurevič, neobjavljeno) in ERα (99, 102).

Naslednji razlog, ki bi lahko vplival na zmanjšano spolno sprejemljivost pri miših SF-1KO, je pomanjkanje spolnih hormonov. Možgani ženskega spola naj bi se po do sedaj utrjeni hipotezi razvili v odsotnosti spolnih hormonov (9), vendar so že v preteklosti nekatere raziskave to hipotezo postavile pod vprašaj. V raziskavi so Dohler in sod. (60) ugotovili, da dodajanje antagonista estrogenskega receptorja (tamoxifen) podganjim samicam kmalu po rojstvu povzroči defeminizacijo možganov v smislu spremenjenega izločanja gonadotropinov in ženskega spolnega obnašanja. Ta učinek so preprečili, če so istim samicam dodali majhne količine estradiola. Estrogeni hormoni so nujno potrebni pri samicah podgane tudi za normalen razvoj možganskega prečnika (*corpus callosum).* Odstranitev jajčnikov, vendar ne kasneje kot 16. dan po rojstvu, povzroči povečanje možganskega prečnika, ki postane v odraslem obdobju bolj podoben možganskemu prečniku samcev, medtem ko dodajanje estradiola ta učinek izniči (303). Bakker in sod. (125) ugotavljajo, da imajo samice miši brez gena za encim aromatazo (ArKO) zmanjšan LQ v primerjavi s samicami nespremenjenega genotipa. Bakker in Baumm (10) domnevata, da se možgani ženskega spola miši aktivno feminizirajo med rojstvom in puberteto z estradiolom izločenim iz jajčnikov. Ker miši SF-1KO nimajo razvitih spolnih žlez, bi lahko poleg spremenjenega VMH tudi pomanjkanje spolnih hormonov v obdobju aktivne feminizacije prispevalo k zmanjšanju ženskega spolnega obnašanja. Ker smo samicam WT jajčnike odstranili pred puberteto, lahko domnevamo, da so bile take živali vsaj delno primerne za primerjavo z mišmi SF-1KO in da je verjetno glavni razlog za slabše izražanje lordoze pri miših SF-1KO spremenjen VMH. Še slabše izražanje lordoze v

primerjavi z mišmi SF-1KO smo ugotovili pri samcih WT. Neposredne razlike med samicami WT in samci WT so bile pričakovane, saj dokazujejo, da testosteron med fetalnim obdobjem maskulinizira in defeminizira izražanje ženskih vzorcev obnašanja (38, 230).

Glede na to, da je VMH jedro pri obeh spolih miši SF-1KO spremenjeno in prav tako pri nobenem spolu miši SF-1KO ni prisotnih spolnih žlez, bi se morali samci in samice SF-1KO obnašati podobno. Čeprav nismo dobili statistično značilnih razlik med samci in samicami SF-1KO, smo za večino vzorcev (LQ, poskusi naskokov in število ejakulacij) v poskusu ženskega spolnega obnašanja dobili razlike med spoloma. Iz teh razlik lahko sklepamo, da so samice SF-1KO bolj podobne samicam WT kot samci SF-1KO. Te razlike bi lahko nastale zaradi različnega vpliva genetskih dejavnikov, ki jih opisujemo v poglavju 5.7.

5.7 Genetski in hormonalni dejavniki, ki bi lahko uravnavali nastanek spolnih razlik v obnašanju

Naša raziskava ni v nobenem poskusu pokazala razlik med samicami SF-1KO in samci SF-1KO, skupaj z razlikami med samicami WT in samci WT. Kljub vsemu smo dobili v številnih poskusih, v različnih hormonskih stanjih, razlike med spoloma, neodvisne od genotipa, ki so pokazale, da so se samice SF-1KO obnašale bolj podobno samicam WT in samci SF-1KO bolj podobno samcem WT (Tabela 7). Dejavniki, ki bi lahko vplivali na nastanek razlik med spoloma, so lahko delovali pri vseh vzorcih obnašanja. Predvidevamo, da bi, glede na rezultate, hipoteza o genetskih dejavnikih lahko najbolj držala v primeru ženskega spolnega in starševskega obnašanja.

Tabela 7: Prikaz ugotovljenih statistično značilnih razlik med spoloma ne glede na genotip miši. Hormonsko stanje je označeno kot estradiol benzoat in progesteron (EB+P), brez dodanih spolnih hormonov (/), testosteron (T). Samice so označene kot (f) in samci kot (m).

Poskus/obnašanje	Hormonsko stanje	Aktivnost	Razlike med spoloma
Vohalno prepoznavanje	/	Število prihodov do vseh treh lončkov	m > f
Labirint Y	/	Čas zadrževanja v obeh prostorih	m > f
Žensko spolno obnašanje	EB+P	Poskusi naskokov	m > f
Žensko spolno obnašanje	EB+P	LQ, število ejakulacij	f > m
Vohalno prepoznavanje	T	Privlačnost do vonja samice	Samice izražajo, samci ne izražajo
Labirint Y	T	Privlačnost do vonja samice	Samice izražajo, samci ne izražajo
Agresivno po spolnem obnašanju	T	Ugrizi	f > m
Starševsko	/	Gradnja gnezda, čepenje nad mladiči	f > m

Menimo, da obstajata dve možnosti: samci SF-1KO so lahko delno defeminizirani in/ali nepopolno feminizirani, samice SF-1KO so lahko bolj feminizirane od samcev SF-1KO. Pri samcih SF-1KO bi lahko vplivali na različno obnašanje geni na kromosomu Y, ki ga pri samicah ni. Ugotovili so, da je gen *Sry* izražen v celotnem hipotalamusu in srednjih možganih (*mesencephalon*) pri odraslih samcih miši (304). Pri podganah so uspeli dokazati, da v črni snovi (*substantia nigra*) gen *Sry* neposredno uravnava izraženost encima tirozin hidroksilaze, ki vpliva na proizvodnjo dopamina in s tem vpliva na čutno-gibalne sposobnosti samcev (245). Dopamin uravnava procese motivacije in preko njih uravnava spolno in druga obnašanja (305). Glede na to, da je gen *Sry* pri samcih miši izražen v hipotalamusu, ki uravnava spolno obnašanje, bi lahko pri samcih SF-1KO vplival na zmanjšano žensko spolno obnašanje. Gen *Sry* bi lahko tudi v drugih področjih možganov preko tirozin hidroksilaze (dopaminskega sistema) uravnaval ostale vzorce obnašanja, kjer so se samci SF-1KO obnašali bolj podobno samcem WT kot samicam WT. To bi veljalo pod pogojem, da je izražanje gena *Sry* v možganih samcev SF-1KO nespremenjeno.

Tudi pri samicah bi na spolno diferenciacijo lahko vplivali spolni kromosomi. Samice imajo očetovski kromosom X, ki ga samci nimajo. Skupaj z maternalnim kormosomom X je aktiven le kratek čas embrionalnega razvoja (306, 307), ko bi lahko vplival na različen razvoj možganov. Po tem času pride do naključnega utišanja enega od dveh kromosomov X, tako da je po 10,5 dnevu embrionalnega razvoja pri samicah miši aktiven le eden od dveh kromosomov X. To utišanje uravnava gen *Xist*, ki je pri samicah ves čas izražen (308). Pri moškem spolu je gen *Xist* izražen samo nekaj časa pred začetkom diferenciacije spolnih žlez, v odraslem obdobju pa izraženosti ni več možno zaznati (309). To pa, kot kaže, ne velja za samce SF-1KO, saj so v raziskavah ugotovili, da je pri njih *Xist* izražen tudi v odraslem obdobju, čeprav šibkeje kot pri samicah SF-1KO in samicah WT (Španič, neobjavljeno). To bi lahko pomenilo dvoje. Prvič: ker imajo samci SF-1KO samo en kromosom X, bi lahko gen *Xist* motil izražanje določenih genov, ki ležijo na tem kromosomu in s tem povzročal razlike med samci in samicami SF-1KO. Drugič: glede na to, da je izraženost gena *Xist* pri samcih SF-1KO manjša kot pri samicah SF-1KO, bi lahko prišlo do razlik tudi na ravni uravnavanja izraženosti genov na kromosomu X preko gena *Xist*. Določeni geni normalno uidejo utišanju preko gena *Xist* in ti geni so različno izraženi med spoloma. Če so spolne razlike pri miših SF-1KO prisotne tudi pri uravnavanju teh genov, bi to prav tako lahko povzročilo razlike v obnašanju (306, 307). Vse te razlike v genetskih dejavnikih bi lahko vplivale na defeminizacijo in/ali feminizacijo možganov.

Za razliko od genetskih dejavnikov so hormonalni dejavniki in njihov vpliv na spolno diferenciacijo veliko bolje raziskani. Raziskave kažejo na to, da defeminizacija poteka preko estrogenskega receptorja β (ERβ), čigar izražanje je odvisno od spolnih hormonov v fetalnem obdobju. Samci brez gena za ERβ (ERβKO) bolje izražajo lordozo kot samci z nespremenjenim genotipom. Glede na to, da kažejo le manjše spremembe moškega spolnega in agresivnega obnašanja, predvidevajo, da so normalno maskulinizirani in verjetno nepopolno defeminizrani (230). Prvi dan po rojstvu so pri miših vidne spolne razlike v številu ERβ pozitivnih celic, ki se ohranijo tudi v odraslem življenju. Tako imajo odrasli samci več celic, ki izražajo ERβ, kot samice. Čeprav ne vemo, kakšen je vzorec izražanja ERβ pri odraslih miših SF-1KO, podatki za prvi dan po rojstvu kažejo na to, da je vzorec izražanja bolj podoben samicam WT kot pa samcem WT (310). To kaže, da spolno različno izražanje ERβ uravnavajo predvsem spolni hormoni in po vsej verjetnosti ERβ ni odgovoren za razlike v obnašanju med samci SF-1KO in samicami SF-1KO. V procesu defeminizacije bi lahko bil pomemben tudi progestinski receptor (PR). Uravnavanje

izraženosti PR v medialnem predoptičnem področju (MPOA) možganov poteka pri obeh spolih preko ERα, vendar je pri samcih poleg ERα za popolno izražanje potreben še ERβ (235). Neobjavljeni rezultati kažejo na to, da imajo miši SF-1KO po dodajanju estradiol benzoata in progesterona manj PR pozitivnih celic v področju VMH kot miši WT. Razlike med spoloma v številu pozitivnih celic so prisotne le pri miših WT in ne pri miših SF-1KO (Büdefeld in Grgurevič, neobjavljeno). Očitno tudi izražanje PR v možganih ni povezano z razlikami v obnašanju med samicami SF-1KO in samci SF-1KO.

Vse kaže na to, da obstajajo še drugi, neznani mehanizmi, ki bi lahko prispevali k različnem obnašanju samic in samcev SF-1KO. V raziskavi Büdefeld in sod. (106) smo ugotavljali spolne razlike v izražanju encima, sintaze dušikovih oksidov, ki je značilen za živčni sistem. Razlike med spoloma pri miši SF-1KO so se pokazale v izražanju sintaze dušikovih oksidov v anteroventralnem delu periventrikularnega jedra in v predoptičnem področju možganov. Te razlike so verjetno nastale neodvisno od spolnih hormonov zaradi vpliva genetskih dejavnikov. Dušikov oksid, ki ga sintetizira encim sintaza, deluje kot nevrotransmiter in uravnava številne vzorce obnašanja, kot so: agresivno (66), spolno (311), obnašanja podobna tesnobi, depresiji in sodeluje pri učenju in tvorjenju spomina (312). Ker je izražanje različnih vzorcev obnašanja zelo kompleksno in odvisno od sodelovanja številnih procesov (motivacija, spomin, čustveni procesi itd.) v možganih, bi lahko spolno različno izražanje sintaze dušikovih oksidov pri miših SF-1KO vplivalo na katerekoli spolno različne vzorce obnašanja. Vsekakor je prezgodaj zaključiti, kateri dejavniki točno so vplivali na spolno različno obnašanje v naši raziskavi. Da bi te razlike v prihodnosti bolj natančno razložili, bodo potrebne nadaljnje raziskave obnašanja in možganov.

5.8 Dejavniki, ki bi lahko dodatno vplivali na rezultate vseh poskusov

Poleg spolnih hormonov, ki se izločajo iz spolnih žlez, obstajajo tudi drugi steroidni hormoni ali snovi s podobnim delovanjem, ki bi delno lahko vplivale na spolno diferenciacijo možganov in s tem tudi na naše rezultate. Steroidni hormoni nastajajo tudi v nadledvični žlezi (39), lahko pridejo v telo od sosednjih plodov (42) ali pridejo v obliki kemičnih snovi, ki posnemajo hormone (fitoestrogeni), na primer preko hrane (44, 313, 314). Nadledvična žleza pri miši ne izloča androgenih hormonov (315, 316) in zato iz

vidika spolnih hormonov verjetno ni vplivala na rezultate naše raziskave. Prav tako lahko izločimo vpliv fitoestrogenov, saj so živali dobivale krmo brez fitoestrogenov.

Na spolno diferenciacijo pri miših lahko vpliva tudi položaj plodov v maternici. V tem primeru lahko testosteron, ki se izloča iz plodu moškega spola, prehaja v sosednje plodove in jih maskulinizira ali/in defeminizira (42, 317). Tudi v naši raziskavi bi to lahko delno vplivalo na rezultate poskusov obnašanja, saj brez pridobivanja živali s carskim rezom ne moremo ugotoviti, kateri plodovi so ležali med dvema plodoma moškega spola. Kljub vsemu mislimo, da ta dejavnik ni bistveno spremenil rezultatov, ampak je le prispeval k malo večji variabilnosti posameznih podatkov. Poleg tega naj bi se miši iz naše raziskave rojevale v normalnih deležih in ker plodovi SF-1KO ne izločajo spolnih hormonov, je malo večja možnost, da plod leži med dvema plodovoma, ki ne izločata testosterona.

6 Povzetek

Pri sesalcih je spol določen s prisotnostjo spolnih kromosomov XX ali XY. Ob prisotnosti kromosoma Y, se pod vplivom gena *Sry* razvijejo moda, medtem ko se v odsotnosti gena *Sry* razvijejo jajčniki. Že v času razvoja plodu pri moškem spolu moda začnejo izločati testosteron, ki se v možganih aromatizira v estradiol. Estradiol v nadaljevanju vzpodbudi razvoj nevroendokrinega sistema in obnašanja, ki sta značilna za moški spol (maskulinizira), in zavre razvoj nevroendokrinega sistema in obnašanja, ki sta značilna za ženski spol (defeminizira). Ker so jajčniki med fetalnim razvojem neaktivni, so dolgo časa predvidevali, da se možgani pri ženskem spolu razvijejo v odsotnosti spolnih hormonov. Kljub vsemu nekatere raziskave dokazujejo, da verjetno tudi pri ženskem spolu v možganih poteka aktivni proces feminizacije, ki ga morda prav tako delno uravnavajo estrogeni hormoni (jajčniki jih začnejo izločati v majhnih količinah v zgodnjem obdobju po rojstvu) ali kakšne druge, še neodkrite snovi oziroma hormoni.

Izkazalo se je, da sekundarno spolno diferenciacijo uravnavajo tudi različni genetski dejavniki neodvisno od spolnih hormonov. O teh vplivih je veliko manj znanega, saj v večini raziskav zaradi prisotnosti spolnih žlez ne moremo izključiti prisotnost spolnih hormonov v obdobju fetalnega razvoja. V naši raziskavi smo zato uporabili miši brez gena za steroidogeni faktor 1 (SF-1KO), uradno imenovan NR5A1, ki se rodijo brez spolnih žlez. Poleg pomembne vloge pri razvoju spolnih žlez je SF-1 nujno potreben tudi pri razvoju nadledvičnih žlez in ventromedialnega hipotalamusa (VMH). Kljub temu da so vse miši SF-1KO fenotipsko samice, imajo še vedno prisotne spolne kromosome XX ali XY in so zato lahko genetsko ženskega ali moškega spola. Zaradi zgodnjega propada zametkov spolnih žlez se možgani miši SF-1KO razvijejo v odsotnosti spolnih hormonov. Zato so te miši edinstven model za proučevanje vpliva genetskih dejavnikov, neodvisno od spolnih hormonov, na spolno diferenciacijo živčnega sistema in obnašanja. Poleg odsotnosti spolnih žlez imajo miši SF-1KO tudi spremenjeno strukturo VMH. To področje možganov je pomembno pri uravnavanju socialnega, spolnega in starševskega obnašanja ter pri uravnavanju fizične aktivnosti. Spremembe tega področja lahko s pridom uporabljamo pri proučevanju uravnavanja teh vzorcev obnašanja.

V naši raziskavi smo uporabili miši, ki so se razlikovale glede na prisotnost različnih spolnih kromosomov (XX, XY) in glede na izpostavljenost spolnim hormonom med

fetalnim razvojem: samce SF-1KO (XY, brez spolnih hormonov), samice SF-1KO (XX, brez spolnih hormonov), samce divjega tipa (XY, prisotnost testosterona), samice divjega tipa (XX, brez spolnih hormonov). V primeru da genetski dejavniki vplivajo na obnašanje neodvisno od spolnih hormonov, se bodo samci SF-1KO obnašali podobno kot samci divjega tipa (WT) in samice SF-1KO podobno kot samice WT. V primeru da vplivajo spolni hormoni med fetalnim obdobjem na obnašanje, se bodo miši SF-KO obnašale podobno kot samice WT. Ker so se miši SF-1KO razlikovale od miši WT tudi glede na strukturo VMH, nas je zanimalo, ali ta lastnost vpliva na obnašanje miši SF-1KO. Samce in samice SF-1KO ter samce in samice WT, s predhodno odstranjenimi spolnimi žlezami, smo opazovali v različnih poskusih obnašanja v treh različnih hormonskih stanjih (brez dodanih spolnih hormonov, po dodanem testosteronu ter po dodanem estradiol benzoatu in progesteronu). Obnašanje podobno tesnobi smo proučevali v dvignjenem labirintu, vohalno obnašanje v poskusu vohalnega prepoznavanja in v labirintu Y, socialno obnašanje v poskusu socialnega prepoznavanja, moško in žensko spolno obnašanje v poskusu s stimulusnimi samicami in samci, starševsko obnašanje pa smo vzpodbudili z mladiči.

V večini poskusov brez dodanih spolnih hormonov smo dobili razlike med genotipoma. Miši SF-1KO so imele spremenjeno socialno obnašanje, izražale so več agresivnega obnašanja in obnašanja podobnega tesnobi ter slabše izražale nekatere vzorce starševskega obnašanja kot miši WT. Te razlike so posledica nedelujočega SF-1 in verjetno spremenjenega VMH pri miših SF-1KO. V nobenem poskusu brez dodanih spolnih hormonov nismo dobili razlik med spoloma, razen pri starševskem obnašanju. Tu so samice gnezdenje in čepenje nad mladiči izražale boljše od samcev ne glede na genotip miši. Ker nismo dobili razlik med spoloma znotraj posameznega genotipa, so te razlike verjetno nastale zaradi vpliva genetskih in hormonalnih dejavnikov skupaj. Prinašanje mladičev v gnezdo je bilo spolno različno izraženo le pri miših WT. Ker je bilo bolje izraženo pri samicah kot pri samcih WT, verjetno na ta vzorec obnašanja vpliva predvsem testosteron v obdobju fetalnega razvoja.

Po dodanem testosteronu smo ugotovili razlike med spoloma, ki so pokazale podobno obnašanje samcev SF-1KO in samcev WT. Samci obeh genotipov niso prepoznavali vonja samice in so slabše izražali agresivno obnašanje kot samice obeh genotipov. Predvidevamo, da sta odstranitev mod pred puberteto pri samcih WT in pomanjkanje

spolnih hormonov v fetalnem obdobju pri samcih SF-1KO vplivala na slabše izražanje teh vzorcev. V nadaljnjih raziskavah bo potrebno ugotoviti, ali na to vpliva tudi prisotnost spolnih kromosomov XY pri obeh skupinah samcev. Po dodanem testosteronu so samice obeh genotipov izražale privlačnost do vonja samic, agresivno obnašanje in del moškega spolnega obnašanja, kar dokazuje, da te vzorci pri samicah niso demaskulinizirani in da spolni hormoni med fetalnim razvojem niso nujno potrebni za njihovo izražanje.

Po dodanima estradiol benzoatu in progesteronu smo ugotovili razlike med spoloma, ki so pokazale boljše izražanje ženskega spolnega obnašanja pri samicah v primerjavi s samci obeh genotipov. Spolna sprejemljivost (lordoza) je bila bolj izražena pri samicah kot pri samcih ne glede na genotip miši. Ejakulacija in lordoza sta bili najbolje izraženi pri samicah WT v primerjavi z ostalimi mišmi. Predpostavljamo, da smo dobili razlike med samicami WT in mišmi SF-1KO zaradi vpliva spremenjenega VMH, razlike med spoloma pa so verjetno posledica delovanja genetskih dejavnikov skupaj s spolnimi hormoni. Ker so bile znotraj genotipa razlike med spoloma prisotne le pri miših WT, lahko zaključimo, da je testosteron med fetalnim razvojem defeminiziral samce WT in onemogočil dobro izražanje lordoze. Glede na to, da so bile samice SF-1KO bolj podobne samicam WT (ejakulacija, lordoza) kot samci SF-1KO, verjetno na te vzorce obnašanja delujejo tudi genetski dejavniki. Ker razlik med spoloma pri miših SF-1KO nismo dobili, ne moremo trditi, da te dejavniki delujejo neodvisno od spolnih hormonov.

Rezultati naše raziskave dokazujejo, da genetski dejavniki skupaj s spolnimi hormoni vplivajo na spolno različne vzorce obnašanja. Čeprav v raziskavi nismo dobili dokazov, da genetski dejavniki delujejo neodvisno od spolnih hormonov, menimo, da nekatere razlike med spoloma (starševsko in žensko spolno obnašanje) to nakazujejo. Miši SF-1KO so se izkazale kot zelo kompleksen model za proučevanje obnašanja. Kljub vsemu je zaenkrat to edini model, pri katerem je možno proučevati vpliv genetskih dejavnikov v odsotnosti spolnih hormonov na spolno diferenciacijo živčnega sistema in obnašanja.

7 Summary

In mammals sex is determined by the presence of XX or XY sex chromosomes. If Y-linked gene *Sry* is expressed in the undifferentiated gonad, testes develop, whereas in the absence of *Sry* expression, ovaries are formed. During male fetal development, testosterone is secreted by testes and converted to estradiol within the brain cells. Thereafter, estradiol causes development of the behavioral and neuroendocrine patterns, characteristic of males (masculinization), while at the same time causes suppression of the behavioral and neuroendocrine patterns, typical of females (defeminization). As ovaries are prenatally inactive, it is believed that female brain develops in the absence of any sex hormone influences. However, some recent studies do suggest that active feminization could exist also in females and this process could be regulated by estradiol or some other factors.

It was shown that sexual differentiation of the brain is also regulated by genetic factors, independent of gonadal hormones. There are scarce data about that as until recently, studies without prenatal exposure to sex asteroid hormones were not possible due to lack of appropriate models. In our studies, we used a novel model, steroidogenic factor 1 knockout mice that are born without gonads. Steroidogenic factor 1 gene (SF-1; officially designated NR5A1), is not necessary just for gonadal development but also for adrenal development and for the proper formation of the ventromedial hypothalamus (VMH). Although all SF-1 knockout mice are phenotypically females, they still possess either XX or XY sex chromosome complement which determines their genetic sex. In SF-1KO mice gonads disappear shortly after differentiation of the genital ridge, before steroidogenesis commences in developing testes, consequently these mice develop in the absence of any sex steroid hormones. Steroidogenic factor 1 knockout mice are therefore opportunity model that allows studies of gonadal hormones-independent sexual differentiation of neuroendocrine system and behavior. The absence of SF-1 causes altered structure of the ventromedial hypothalamus in SF-1KO mice. Ventromedial hypothalamus was implicated in many behaviors (social-aggressive, sexual and parental) and it also regulated physical activity. Therefore SF-1KO mice could be used in studies of VMH-dependent behaviors.

The aims of our studies were therefore to examine if any behaviors are expressed differently between SF-1KO females and males in the absence of sex hormone exposure during fetal development and if expression of sexually dimorphic behaviors could be

modulated by different hormonal treatments later in adulthood. Furthermore, we also wanted to establish the behavioral consequences of disrupted VMH structure in SF-1KO mice.

Results of these studies provided several conclusions. In the absence of gonadal sex steroid hormones, in most behavioral tests, differences between WT and SF-1 knockout mice were observed. These differences were probably caused by differences in VMH structure between SF-1KO mice and control mice. Steroidogenic factor-1 knockout mice had altered social behavior, showed more aggression and anxiety-like behavior and their parental behavior was not as strong as in WT female mice. In almost all tests without hormonal treatment, sex differences in behavior were not observed with the exception of parental behavior. In some components of parental behavior (nest building, crouching) females were better parents than males of both genotypes. These sex differences could be caused by both sex chromosomal factors and gonadal hormones. In contrast, sex differences in pup retrieval behavior were observed in wild type mice only, indicating that sex difference in this behavior most likely develops as a consequence of differential sex steroid hormone exposure during fetal development.

After treatment with androgen hormones SF-1KO males displayed similar behavioral pattern as WT control males. Males of both genotypes failed to prefer female scent and expressed less aggression in comparison to females of both genotypes. We predict that castration of control males before puberty and absence of gonadal hormones prenatally in SF-1KO males caused poorer expression of these behaviors under condition of similar genetic factors. Further experiments will therefore be needed to explain if similar mechanisms in males of both genotypes regulate the expression of all these behaviors. In contrast to males, females of both genotypes exhibited high levels of some behaviors usually typical of males, suggesting that female brain are not permanently demasculinized and some male behaviors could be expressed also in adult females after appropriate hormone treatment.

After treatment with estrogens and progesterone most behaviors were differently expressed between males and females of both genotypes. Stimulus males have more mount attempts with males than with females and contrary more ejaculations with females than with males of both genotypes. It seems that capacity to express lordotic behavior is influenced by neonatal exposure to sex hormones since WT males showed the lowest levels of lordosis.

Differences in lordosis were found also between WT females and SF-1KO mice which confirmed an important role of VMH in regulation of this behavior. Although there were no sex differences in SF-1 KO mice, SF-1KO females behaved similar like WT females and SF-1KO males similar like WT males, it is therefore suggested that female sex behavior is feminized through genetic factors, but partially also through hormonal factors.

In conclusion, our study showed that sex differences in behavior are influenced by both hormonal and genetic/sex chromosome factors. Since sex differences were not observed in SF-1KO mice we can not conclude that genetic factors influence sexual differentiation independent of gonadal hormones as it was predicted in the hypotheses. However, SF-1KO mice are a very complex model for studying behavior and so far also the only one, where we can study the processes of sexual differentiation independent of sex hormones.

8 Zaključki

- *Nedelujoči gen za SF-1 je vplival na različne vzorce obnašanja pri miših brez gena za SF-1 (SF-1KO). Predvidevamo, da so bile spremembe v obnašanju pri miših SF-1KO posledica spremenjenega ventromedialnega jedra hipotalamusa.*
- *Spolni hormoni med fetalnim obdobjem niso nujno potrebni za maskulinizacijo in izražanje nekaterih moških vzorcev obnašanja pri miših.*
- *Spolni hormoni med fetalnim obdobjem defeminizirajo in zavrejo izražanje nekaterih ženskih vzorcev obnašanja pri miših.*
- *Genetski dejavniki skupaj s spolnimi hormoni uravnavajo spolno različna obnašanja pri miših, vendar iz naše raziskave ne moremo zaključiti, ali delujejo neodvisno od spolnih hormonov.*

Zahvala

Pa smo tu, pri zahvali namreč, najtežjemu delu doktorske naloge bi lahko rekli. Za spremembo del, ki ne bo tako "objektiven in znanstven".

Mentorju prof. dr. Gregorju Majdiču

Gregor, hvala za pomoč in vodenje v težkih začetkih na moji znanstveni poti. Veliko sem se naučila. Hvala za prijetno družbo na kongresih, za dobre znanstvene pogovore, druženje na izvirnih večerjah in spodbujanje k peki tort. Pot je bila včasih res trnova, a smo zadevo speljali do konca.

Prof. dr. Emilie Rissman

Emilie, you were really like a "scientific mother" to me. Thank you for unforgettable experience in your lab.

Prof. dr. Stuart Tobet

Stuart, thank you for all the knowledge you share with us.

Članom strokovne komisije

Prof. dr. Robert Frangež, prof. dr. Vojteh Cestnik, prof. dr. Marko Živin hvala vam za vašo potrpežljivost in konstruktivne nasvete.

Gospa mag. Gita Grecs-Smole hvala za ves trud pri pregledovanju zares dolge literature.

Prof. dr. Gregor Fazarinc hvala vam za nasvete na področju anatomije možganov.

Tomaž, super je bilo delati s teboj. Hvala za zanimive razprave o rezultatih in za vso pomoč pri delu.

Kolegice Tanja, Katerina in Jasmina hvala za pomoč, prijetno družbo in ženski pridih v naši pisarni.

Petra hvala ti za tako hitro in učinkovito lektoriranje.

Nataša, hvala za pomoč pri angleškem jeziku.

Moji najdražji, družina, Tadej, Gašper, Živa, Dani, Lucija in Maruša hvala vam, da ste mi stali ob strani in mi lepšali trenutke. Vse ostalo si bomo povedali na večerji!

In order for people to meet, they must touch where they are different.

9 Reference

1. Gilbert SF. Developmental biology. 4th ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1994: 754-83.

2. Baum MJ, Erskine MS, Kornberg E, Weaver CE. Prenatal and neonatal testosterone exposure interact to affect differentiation of sexual behavior and partner preference in female ferrets. Behav Neurosci 1990; 104(1): 183-98.

3. Cooke B, Hegstrom CD, Villeneuve LS, Breedlove SM. Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. Front Neuroendocrinol 1998; 19(4): 323-62.

4. DonCarlos LL, McAbee M, Ramer-Quinn DS, Stancik DM. Estrogen receptor mRNA levels in the preoptic area of neonatal rats are responsive to hormone manipulation. Brain Res Dev Brain Res 1995; 84(2): 253-60.

5. Cahill L. Why sex matters for neuroscience. Nat Rev Neurosci 2006; 7(6): 477-84.

6. De Vries GJ. Minireview: sex differences in adult and developing brains: compensation, compensation, compensation. Endocrinology 2004; 145(3): 1063-8.

7. Berthold A. Transplantation der Hoden. Arch Anat Physiol Wissensch 1849; 16: 42-46.

8. Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA, Young WC. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. Endocrinology 1959; 65: 369-82.

9. MacLusky NJ, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system. Science 1981; 211(4488): 1294-302.

10. Bakker J, Baum MJ. Role for estradiol in female-typical brain and behavioral sexual differentiation. Front Neuroendocrinol 2008; 29(1): 1-16.

11. Arnold AP. Mouse models for evaluating sex chromosome effects that cause sex differences in non-gonadal tissues. J Neuroendocrinol 2009; 21(4): 377-86.

12. Dewing P, Shi T, Horvath S, Vilain E. Sexually dimorphic gene expression in mouse brain precedes gonadal differentiation. Brain Res Mol Brain Res 2003; 118(1/2): 82-90.

13. Quinn JJ, Hitchcott PK, Umeda EA, Arnold AP, Taylor JR. Sex chromosome complement regulates habit formation. Nat Neurosci 2007; 10(11): 1398-400.

14. McPhie-Lalmansingh AA, Tejada LD, Weaver JL, Rissman EF. Sex chromosome complement affects social interactions in mice. Horm Behav 2008; 54(4): 565-70.

15. Gatewood JD, Wills A, Shetty S, Xu J, Arnold AP, Burgoyne PS, et al. Sex chromosome complement and gonadal sex influence aggressive and parental behaviors in mice. J Neurosci 2006; 26(8): 2335-42.

16. Smith-Bouvier DL, Divekar AA, Sasidhar M, Du S, Tiwari-Woodruff SK, King JK, et al. A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. J Exp Med 2008; 205(5): 1099-108.

17. Parker KL, Schimmer BP. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. Endocr Rev 1997; 18(3): 361-77.

18. Canteras NS. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. Pharmacol Biochem Behav 2002; 71(3): 481-91.

19. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, et al. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. Nature 1990; 346(6281): 245-50.

20. Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Expression of Sry, the mouse sex determining gene. Development 1995; 121(6): 1603-14.

21. Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M, Ball SG, Strachan T, Salas-Cortes L, et al. SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. Mech Dev 2000; 91(1/2): 403-7.

22. Hammes A, Guo JK, Lutsch G, Leheste JR, Landrock D, Ziegler U, et al. Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. Cell 2001; 106(3): 319-29.

23. Luo X, Ikeda Y, Parker KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. Cell 1994; 77(4): 481-90.

24. Tevosian SG, Albrecht KH, Crispino JD, Fujiwara Y, Eicher EM, Orkin SH. Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. Development 2002; 129(19): 4627-34.

25. Miyamoto Y, Taniguchi H, Hamel F, Silversides DW, Viger RS. A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. BMC Mol Biol 2008; 9: 44.

26. Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. Nature 2008; 453(7197): 930-4.

27. Bouma GJ, Albrecht KH, Washburn LL, Recknagel AK, Churchill GA, Eicher EM. Gonadal sex reversal in mutant Dax1 XY mice: a failure to upregulate Sox9 in pre-Sertoli cells. Development 2005; 132(13): 3045-54.

28. Jeays-Ward K, Dandonneau M, Swain A. Wnt4 is required for proper male as well as female sexual development. Dev Biol 2004; 276(2): 431-40.

29. Meeks JJ, Weiss J, Jameson JL. Dax1 is required for testis determination. Nat Genet 2003; 34(1): 32-3.

30. Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, et al. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. Nature 1994; 372(6507): 635-41.

31. Jeays-Ward K, Hoyle C, Brennan J, Dandonneau M, Alldus G, Capel B, et al. Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad. Development 2003; 130(16): 3663-70.

32. Jordan BK, Shen JH, Olaso R, Ingraham HA, Vilain E. Wnt4 overexpression disrupts normal testicular vasculature and inhibits testosterone synthesis by repressing steroidogenic factor 1/beta-catenin synergy. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100(19): 10866-71.

33. Mizusaki H, Kawabe K, Mukai T, Ariyoshi E, Kasahara M, Yoshioka H, et al. Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1) gene transcription is regulated by wnt4 in the female developing gonad. Mol Endocrinol 2003; 17(4): 507-19.

34. Wilhelm D. R-spondin1--discovery of the long-missing, mammalian female-determining gene? Bioessays 2007; 29(4): 314-8.

35. Piprek RP. Genetic mechanisms underlying male sex determination in mammals. J Appl Genet 2009; 50(4): 347-60.

36. Burns-Cusato M, Scordalakes EM, Rissman EF. Of mice and missing data: what we know (and need to learn) about male sexual behavior. Physiol Behav 2004; 83(2): 217-32.

37. Motelica-Heino I, Edwards DA, Roffi J. Intermale aggression in mice: does hour of castration after birth influence adult behavior? Physiol Behav 1993; 53(5): 1017-9.

38. Bakker J, De Mees C, Douhard Q, Balthazart J, Gabant P, Szpirer J, et al. Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens. Nat Neurosci 2006; 9(2): 220-6.

39. Nguyen AD, Conley AJ. Adrenal androgens in humans and nonhuman primates: production, zonation and regulation. Endocr Dev 2008; 13: 33-54.

40. Amateau SK, Alt JJ, Stamps CL, McCarthy MM. Brain estradiol content in newborn rats: sex differences, regional heterogeneity, and possible de novo synthesis by the female telencephalon. Endocrinology 2004; 145(6): 2906-17.

41. Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM. Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. Hippocampus 2003; 13(2): 226-34.

42. Ryan BC, Vandenbergh JG. Intrauterine position effects. Neurosci Biobehav Rev 2002; 26(6): 665-78.

43. Tilson HA, Kodavanti PR, Mundy WR, Bushnell PJ. Neurotoxicity of environmental chemicals and their mechanism of action. Toxicol Lett 1998; 102/103: 631-5.

44. Lephart ED, West TW, Weber KS, Rhees RW, Setchell KD, Adlercreutz H, et al. Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. Neurotoxicol Teratol 2002; 24(1): 5-16.

45. Breedlove SM, Arnold AP. Hormone accumulation in a sexually dimorphic motor nucleus of the rat spinal cord. Science 1980; 210(4469): 564-6.

46. Breedlove SM, Arnold AP. Hormonal control of a developing neuromuscular system. II. Sensitive periods for the androgen-induced masculinization of the rat spinal nucleus of the bulbocavernosus. J Neurosci 1983; 3(2): 424-32.

47. Breedlove SM, Arnold AP. Sex differences in the pattern of steroid accumulation by motoneurons of the rat lumbar spinal cord. J Comp Neurol 1983; 215(2): 211-6.

48. Breedlove SM. Neonatal androgen and estrogen treatments masculinize the size of motoneurons in the rat spinal nucleus of the bulbocavernosus. Cell Mol Neurobiol 1997; 17(6): 687-97.

49. Lisk RD. Copulatory activity of the male rat following placement of preoptic-anterior hypothalamic lesions. Exp Brain Res 1968; 5(4): 306-13.

50. Szechtman H, Caggiula AR, Wulkan D. Preoptic knife cuts and sexual behavior in male rats. Brain Res 1978; 150(3): 569-95.

51. Madeira MD, Lieberman AR. Sexual dimorphism in the mammalian limbic system. Prog Neurobiol 1995; 45(4): 275-333.

52. Segovia S, Guillamon A. Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. Brain Res Brain Res Rev 1993; 18(1): 51-74.

53. Gorski RA, Gordon JH, Shryne JE, Southam AM. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. Brain Res 1978; 148(2): 333-46.

54. Morris JA, Gobrogge KL, Jordan CL, Breedlove SM. Brain aromatase: dyed-in-the-wool homosexuality. Endocrinology 2004; 145(2): 475-7.

55. Swaab DF, Fliers E. A sexually dimorphic nucleus in the human brain. Science 1985; 228(4703): 1112-5.

56. Allen LS, Hines M, Shryne JE, Gorski RA. Two sexually dimorphic cell groups in the human brain. J Neurosci 1989; 9(2): 497-506.

57. Young JK. A comparison of hypothalami of rats and mice: lack of gross sexual dimorphism in the mouse. Brain Res 1982; 239(1): 233-9.

58. Shah NM, Pisapia DJ, Maniatis S, Mendelsohn MM, Nemes A, Axel R. Visualizing sexual dimorphism in the brain. Neuron 2004; 43(3): 313-9.

59. Dohler KD, Coquelin A, Davis F, Hines M, Shryne JE, Gorski RA. Pre- and postnatal influence of testosterone propionate and diethylstilbestrol on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. Brain Res 1984; 302(2): 291-5.

60. Dohler KD, Srivastava SS, Shryne JE, Jarzab B, Sipos A, Gorski RA. Differentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat brain is inhibited by postnatal treatment with an estrogen antagonist. Neuroendocrinology 1984; 38(4): 297-301.

61. Arendash GW, Gorski RA. Effects of discrete lesions of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area or other medial preoptic regions on the sexual behavior of male rats. Brain Res Bull 1983; 10(1): 147-54.

62. De Jonge FH, Louwerse AL, Ooms MP, Evers P, Endert E, van de Poll NE. Lesions of the SDN-POA inhibit sexual behavior of male Wistar rats. Brain Res Bull 1989; 23(6): 483-92.

63. Jacobson CD, Terkel J, Gorski RA, Sawyer CH. Effects of small medial preoptic area lesions on maternal behavior: retrieving and nest building in the rat. Brain Res 1980; 194(2): 471-8.

64. Dorner G, Staudt J. Structural changes in the hypothalamic ventromedial nucleus of the male rat, following neonatal castration and androgen treatment. Neuroendocrinology 1969; 4(4): 278-81.

65. Matsumoto A, Arai Y. Male-female difference in synaptic organization of the ventromedial nucleus of the hypothalamus in the rat. Neuroendocrinology 1986; 42(3): 232-6.

66. Nelson RJ, Trainor BC. Neural mechanisms of aggression. Nat Rev Neurosci 2007; 8(7): 536-46.

67. De Vries GJ, Panzica GC. Sexual differentiation of central vasopressin and vasotocin systems in vertebrates: different mechanisms, similar endpoints. Neuroscience 2006; 138(3): 947-55.

68. De Vries GJ, Rissman EF, Simerly RB, Yang LY, Scordalakes EM, Auger CJ, et al. A model system for study of sex chromosome effects on sexually dimorphic neural and behavioral traits. J Neurosci 2002; 22(20): 9005-14.

69. Simerly RB. Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. Annu Rev Neurosci 2002; 25: 507-36.

70. Simerly RB, Swanson LW, Handa RJ, Gorski RA. Influence of perinatal androgen on the sexually dimorphic distribution of tyrosine hydroxylase-immunoreactive cells and

fibers in the anteroventral periventricular nucleus of the rat. Neuroendocrinology 1985; 40(6): 501-10.

71. Segovia S, Guillamon A. Effects of sex steroids on the development of the vomeronasal organ in the rat. Brain Res 1982; 281(2): 209-12.

72. Segovia S, Orensanz LM, Valencia A, Guillamon A. Effects of sex steroids on the development of the accessory olfactory bulb in the rat: a volumetric study. Brain Res 1984; 318(2): 312-4.

73. Halpern M. The organization and function of the vomeronasal system. Annu Rev Neurosci 1987; 10: 325-62.

74. Kondo Y, Sachs BD, Sakuma Y. Importance of the medial amygdala in rat penile erection evoked by remote stimuli from estrous females. Behav Brain Res 1997; 88(2): 153-60.

75. Rajendren G, Moss RL. The role of the medial nucleus of amygdala in the mating-induced enhancement of lordosis in female rats: the interaction with luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system. Brain Res 1993; 617(1): 81-6.

76. Vochteloo JD, Koolhaas JM. Medial amygdala lesions in male rats reduce aggressive behavior: interference with experience. Physiol Behav 1987; 41(2): 99-102.

77. Meaney MJ, McEwen BS. Testosterone implants into the amygdala during the neonatal period masculinize the social play of juvenile female rats. Brain Res 1986; 398(2): 324-8.

78. Hines M, Allen LS, Gorski RA. Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. Brain Res 1992; 579(2): 321-6.

79. Morris JA, Jordan CL, King ZA, Northcutt KV, Breedlove SM. Sexual dimorphism and steroid responsiveness of the posterodorsal medial amygdala in adult mice. Brain Res 2008; 1190: 115-21.

80. Nishizuka M, Arai Y. Organizational action of estrogen on synaptic pattern in the amygdala: implications for sexual differentiation of the brain. Brain Res 1981; 213(2): 422-6.

81. Guillamon A, Segovia S, del Abril A. Early effects of gonadal steroids on the neuron number in the medial posterior region and the lateral division of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. Brain Res Dev Brain Res 1988; 44(2): 281-90.

82. Allen LS, Gorski RA. Sex difference in the bed nucleus of the stria terminalis of the human brain. J Comp Neurol 1990; 302(4): 697-706.

83. Lala DS, Rice DA, Parker KL. Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. Mol Endocrinol 1992; 6(8): 1249-58.

84. Zhao L, Bakke M, Hanley NA, Majdic G, Stallings NR, Jeyasuria P, et al. Tissue-specific knockouts of steroidogenic factor 1. Mol Cell Endocrinol 2004; 215(1-2): 89-94.

85. Correa RV, Domenice S, Bingham NC, Billerbeck AE, Rainey WE, Parker KL, et al. A microdeletion in the ligand binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY sex reversal without adrenal insufficiency. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89(4): 1767-72.

86. Li Y, Choi M, Cavey G, Daugherty J, Suino K, Kovach A, et al. Crystallographic identification and functional characterization of phospholipids as ligands for the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1. Mol Cell 2005; 17(4): 491-502.

87. Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA, Parker KL. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. Mol Endocrinol 1994; 8(5): 654-62.

88. Hanley NA, Ikeda Y, Luo X, Parker KL. Steroidogenic factor 1 (SF-1) is essential for ovarian development and function. Mol Cell Endocrinol 2000; 163(1/2): 27-32.

89. Majdic G, Sharpe RM, O'Shaughnessy PJ, Saunders PT. Expression of cytochrome P450 17alpha-hydroxylase/C17-20 lyase in the fetal rat testis is reduced by maternal exposure to exogenous estrogens. Endocrinology 1996; 137(3): 1063-70.

90. Shen WH, Moore CC, Ikeda Y, Parker KL, Ingraham HA. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. Cell 1994; 77(5): 651-61.

91. Lynch JP, Lala DS, Peluso JJ, Luo W, Parker KL, White BA. Steroidogenic factor 1, an orphan nuclear receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues. Mol Endocrinol 1993; 7(6): 776-86.

92. Ingraham HA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Shen WH, Nachtigal MW, et al. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. Genes Dev 1994; 8(19): 2302-12.

93. Ninomiya Y, Okada M, Kotomura N, Suzuki K, Tsukiyama T, Niwa O. Genomic organization and isoforms of the mouse ELP gene. J Biochem (Tokyo) 1995; 118(2): 380-9.

94. Sadovsky Y, Crawford PA, Woodson KG, Polish JA, Clements MA, Tourtellotte LM, et al. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92(24): 10939-43.

95. Barnhart KM, Mellon PL. The orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1, regulates the glycoprotein hormone alpha-subunit gene in pituitary gonadotropes. Mol Endocrinol 1994; 8(7): 878-85.

96. Duval DL, Nelson SE, Clay CM. A binding site for steroidogenic factor-1 is part of a complex enhancer that mediates expression of the murine gonadotropin-releasing hormone receptor gene. Biol Reprod 1997; 56(1): 160-8.

97. Halvorson LM, Kaiser UB, Chin WW. Stimulation of luteinizing hormone beta gene promoter activity by the orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1. J Biol Chem 1996; 271(12): 6645-50.

98. Ikeda Y, Luo X, Abbud R, Nilson JH, Parker KL. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. Mol Endocrinol 1995; 9(4): 478-86.

99. Majdic G, Young M, Gomez-Sanchez E, Anderson P, Szczepaniak LS, Dobbins RL, et al. Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. Endocrinology 2002; 143(2): 607-14.

100. Shinoda K, Lei H, Yoshii H, Nomura M, Nagano M, Shiba H, et al. Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. Dev Dyn 1995; 204(1): 22-9.

101. Tran PV, Lee MB, Marin O, Xu B, Jones KR, Reichardt LF, et al. Requirement of the orphan nuclear receptor SF-1 in terminal differentiation of ventromedial hypothalamic neurons. Mol Cell Neurosci 2003; 22(4): 441-53.

102. Dellovade TL, Young M, Ross EP, Henderson R, Caron K, Parker K, et al. Disruption of the gene encoding SF-1 alters the distribution of hypothalamic neuronal phenotypes. J Comp Neurol 2000; 423(4): 579-89.

103. McClellan KM, Parker KL, Tobet S. Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. Front Neuroendocrinol 2006; 27(2): 193-209.

104. Kleyn PW, Fan W, Kovats SG, Lee JJ, Pulido JC, Wu Y, et al. Identification and characterization of the mouse obesity gene tubby: a member of a novel gene family. Cell 1996; 85(2): 281-90.

105. Büdefeld T, Grgurevič N, Tobet S, Majdič G. Expression of metabolic peptides AgRP, NPY and CART in the hypothalamus of obese SF-1 knockout mice. In: Neuroscience 2009. Chicago: Society for neuroscience, 2009: 502.6. program number.

106. Budefeld T, Grgurevic N, Tobet SA, Majdic G. Sex differences in brain developing in the presence or absence of gonads. Dev Neurobiol 2008; 68(7): 981-95.

107. Hinde A. Animal behaviour: a synthesis of ethology and comparative psychology. International student edition London: McGraw-Hill, 1966: 9-14.

108. Crawley JN. What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. New York: Wiley-Liss, 2000: 253.

109. Crawley JN. What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. New York: Wiley-Liss, 2000: 179-209.

110. Crawley JN. What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. New York: Wiley-Liss, 2000: 83-131.

111. Crawley JN. What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. New York: Wiley-Liss, 2000: 209-27.

112. Crawley JN. What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. New York: Wiley-Liss, 2000: 31-47.

113. Crawley JN. What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. New York: Wiley-Liss, 2000: 47-65.

114. Crawley JN. What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. New York: Wiley-Liss, 2000: 65-83.

115. Nelson RJ. An introduction to behavioral enodcrinology. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2005: 319-85.

116. Bakker J. Sexual differentiation of the neuroendocrine mechanisms regulating mate recognition in mammals. J Neuroendocrinol 2003; 15(6): 615-21.

117. Baum MJ, Kelliher KR. Complementary roles of the main and accessory olfactory systems in mammalian mate recognition. Annu Rev Physiol 2009; 71: 141-60.

118. Nelson RJ. An introduction to behavioral endocrinology. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2005: 235-316.

119. Halem HA, Baum MJ, Cherry JA. Sex difference and steroid modulation of pheromone-induced immediate early genes in the two zones of the mouse accessory olfactory system. J Neurosci 2001; 21(7): 2474-80.

120. Keverne EB. Mammalian pheromones: from genes to behaviour. Curr Biol 2002; 12(23): R807-9.

121. Leypold BG, Yu CR, Leinders-Zufall T, Kim MM, Zufall F, Axel R. Altered sexual and social behaviors in trp2 mutant mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99(9): 6376-81.

122. Wersinger SR, Rissman EF. Oestrogen receptor alpha is essential for female-directed chemo-investigatory behaviour but is not required for the pheromone-induced luteinizing hormone surge in male mice. J Neuroendocrinol 2000; 12(2): 103-10.

123. Wersinger SR, Rissman EF. Dopamine activates masculine sexual behavior independent of the estrogen receptor alpha. J Neurosci 2000; 20(11): 4248-54.

124. Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J. Sexual partner preference requires a functional aromatase (cyp19) gene in male mice. Horm Behav 2002; 42(2): 158-71.

125. Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J. The aromatase knock-out mouse provides new evidence that estradiol is required during development in the female for the expression of sociosexual behaviors in adulthood. J Neurosci 2002; 22(20): 9104-12.

126. Bodo C, Rissman EF. Androgen receptor is essential for sexual differentiation of responses to olfactory cues in mice. Eur J Neurosci 2007; 25(7): 2182-90.

127. Crawley JN. What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. New York: Wiley-Liss, 2000: 151-67.

128. Kennedy TG. Reproductive performance of young female mice following vaginal opening. J Reprod Fertil 1973; 35(2): 385-7.

129. Meisel R, Sachs B. The physiology of male sexual behavior. In: Knobil E, Neill J, eds. The physiology of reproduction. New York: Raven Press, 1994: 3-107.

130. James PJ, Nyby JG. Testosterone rapidly affects the expression of copulatory behavior in house mice (*Mus musculus*). Physiol Behav 2002; 75(3): 287-94.

131. Nyby JG. Reflexive testosterone release: a model system for studying the nongenomic effects of testosterone upon male behavior. Front Neuroendocrinol 2008; 29(2): 199-210.

132. McGill TE, Manning A. Genotype and retention of the ejaculatory reflex in castrated male mice. Animal Behaviour 1976; 24: 507-18.

133. Mas M. Neurobiological correlates of masculine sexual behavior. Neurosci Biobehav Rev 1995; 19(2): 261-77.

134. Twiggs DG, Popolow HB, Gerall AA. Medial preoptic lesions and male sexual behavior: age and environmental interactions. Science 1978; 200(4348): 1414-5.

135. Nyby J, Matochik JA, Barfield RJ. Intracranial androgenic and estrogenic stimulation of male-typical behaviors in house mice (Mus domesticus). Horm Behav 1992; 26(1): 24-45.

136. Sipos ML, Nyby JG. Concurrent androgenic stimulation of the ventral tegmental area and medial preoptic area: synergistic effects on male-typical reproductive behaviors in house mice. Brain Res 1996; 729(1): 29-44.

137. Coolen LM, Peters HJ, Veening JG. Anatomical interrelationships of the medial preoptic area and other brain regions activated following male sexual behavior: a combined fos and tract-tracing study. J Comp Neurol 1998; 397(3): 421-35.

138. Erskine MS. Solicitation behavior in the estrous female rat: a review. Horm Behav 1989; 23(4): 473-502.

139. Perkins MS, Perkins MN, Hitt JC. Effects of stimulus female on sexual behavior of male rats given olfactory tubercle and corticomedial amygdaloid lesions. Physiol Behav 1980; 25(4): 495-500.

140. Garey J, Kow LM, Huynh W, Ogawa S, Pfaff DW. Temporal and spatial quantitation of nesting and mating behaviors among mice housed in a semi-natural environment. Horm Behav 2002; 42(3): 294-306.

141. Pak TR, Handa RJ. Steroid hormone receptors and sex differences in behavior. In: Becker J, Berkley K, eds. Sex differences in the brain: from genes to behavior. New York: Oxford University Press, 2008: 109-39.

142. Zipse LR, Brandling-Bennett EM, Clark AS. Paced mating behavior in the naturally cycling and the hormone-treated female rat. Physiol Behav 2000; 70(1/2): 205-9.

143. Clark AS, Pfeifle JK, Edwards DA. Ventromedial hypothalamic damage and sexual proceptivity in female rats. Physiol Behav 1981; 27(4): 597-602.

144. Yamanouchi K. Inhibitory and facilitatory neural mechanisms involved in the regulation of lordosis behavior in female rats: effects of dual cuts in the preoptic area and hypothalamus. Physiol Behav 1980; 25(5): 721-5.

145. Rubin BS, Barfield RJ. Induction of estrous behavior in ovariectomized rats by sequential replacement of estrogen and progesterone to the ventromedial hypothalamus. Neuroendocrinology 1983; 37(3): 218-24.

146. Hoshina Y, Takeo T, Nakano K, Sato T, Sakuma Y. Axon-sparing lesion of the preoptic area enhances receptivity and diminishes proceptivity among components of female rat sexual behavior. Behav Brain Res 1994; 61(2): 197-204.

147. Pfaff DW. Lordosis. In: Knobil E, Neill J, eds. Encyclopedia of reproduction. San Diego: Academic Press, 1998: 1074-76.

148. Mani SK, Blaustein JD, O'Malley BW. Progesterone receptor function from a behavioral perspective. Horm Behav 1997; 31(3): 244-55.

149. Ogawa S, Olazabal UE, Parhar IS, Pfaff DW. Effects of intrahypothalamic administration of antisense DNA for progesterone receptor mRNA on reproductive behavior and progesterone receptor immunoreactivity in female rat. J Neurosci 1994; 14(3 Pt 2): 1766-74.

150. Meisel RL. Copulation, mammals. In: Knobil E, Neill J, eds. Encyclopedia of reproduction. San Diego: Academic Press, 1998: 675-80.

151. Nelson RJ. An introduction to behavioral endocrinology. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2005: 387-454.

152. Manning CJ, Wakeland EK, Potts WK. Communal nesting patterns in mice implicate MHC genes in kin recognition. Nature 1992; 360(6404): 581-3.

153. Bridges RS, Robertson MC, Shiu RP, Sturgis JD, Henriquez BM, Mann PE. Central lactogenic regulation of maternal behavior in rats: steroid dependence, hormone specificity, and behavioral potencies of rat prolactin and rat placental lactogen I. Endocrinology 1997; 138(2): 756-63.

154. Nelson EE, Panksepp J. Brain substrates of infant-mother attachment: contributions of opioids, oxytocin, and norepinephrine. Neurosci Biobehav Rev 1998; 22(3): 437-52.

155. Neuman M. Parental behavior, mammals. In: Knobil E, Neill J, eds. Encyclopedia of reproduction. San Diego: Academic Press, 1998: 684-95.

156. Sheehan T, Numan M. Estrogen, progesterone, and pregnancy termination alter neural activity in brain regions that control maternal behavior in rats. Neuroendocrinology 2002; 75(1): 12-23.

157. Olazabal DE, Young LJ. Species and individual differences in juvenile female alloparental care are associated with oxytocin receptor density in the striatum and the lateral septum. Horm Behav 2006; 49(5): 681-7.

158. Fleming AS, Korsmit M. Plasticity in the maternal circuit: effects of maternal experience on Fos-Lir in hypothalamic, limbic, and cortical structures in the postpartum rat. Behav Neurosci 1996; 110(3): 567-82.

159. Furuta M, Bridges RS. Effects of maternal behavior induction and pup exposure on neurogenesis in adult, virgin female rats. Brain Res Bull 2009; 80(6): 408-13.

160. Lonstein JS, De Vries GJ. Sex differences in the parental behavior of rodents. Neurosci Biobehav Rev 2000; 24(6): 669-86.

161. Gandelman R. Induction of maternal nest building in virgin female mice by the presentation of young. Horm Behav 1973; 4(3): 191-7.

162. Lonstein JS, Gammie SC. Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. Neurosci Biobehav Rev 2002; 26(8): 869-88.

163. Gubernick DJ, Sengelaub DR, Kurz EM. A neuroanatomical correlate of paternal and maternal behavior in the biparental California mouse (*Peromyscus californicus*). Behav Neurosci 1993; 107(1): 194-201.

164. Fahrbach SE, Pfaff DW. Effect of preoptic region implants of dilute estradiol on the maternal behavior of ovariectomized, nulliparous rats. Horm Behav 1986; 20(3): 354-63.

165. Ogawa S, Taylor JA, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW. Reversal of sex roles in genetic female mice by disruption of estrogen receptor gene. Neuroendocrinology 1996; 64(6): 467-70.

166. Sheehan T, Paul M, Amaral E, Numan MJ, Numan M. Evidence that the medial amygdala projects to the anterior/ventromedial hypothalamic nuclei to inhibit maternal behavior in rats. Neuroscience 2001; 106(2): 341-56.

167. Nishimori K, Young LJ, Guo Q, Wang Z, Insel TR, Matzuk MM. Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(21): 11699-704.

168. Champagne F, Diorio J, Sharma S, Meaney MJ. Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98(22): 12736-41.

169. Pedersen CA, Vadlamudi SV, Boccia ML, Amico JA. Maternal behavior deficits in nulliparous oxytocin knockout mice. Genes Brain Behav 2006; 5(3): 274-81.

170. Ferguson JN, Aldag JM, Insel TR, Young LJ. Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. J Neurosci 2001; 21(20): 8278-85.

171. Rosenblatt JS, Hazelwood S, Poole J. Maternal behavior in male rats: effects of medial preoptic area lesions and presence of maternal aggression. Horm Behav 1996; 30(3): 201-15.

172. Lee AW, Brown RE. Medial preoptic lesions disrupt parental behavior in both male and female California mice (*Peromyscus californicus*). Behav Neurosci 2002; 116(6): 968-75.

173. Wang Z, Ferris CF, De Vries GJ. Role of septal vasopressin innervation in paternal behavior in prairie voles (*Microtus ochrogaster*). Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91(1): 400-4.

174. Nelson RJ. An introduction to behavioral endocrinology. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2005: 455-520.

175. Goodson JL, Bass AH. Social behavior functions and related anatomical characteristics of vasotocin/vasopressin systems in vertebrates. Brain Res Brain Res Rev 2001; 35(3): 246-65.

176. Young LJ, Wang Z. The neurobiology of pair bonding. Nat Neurosci 2004; 7(10): 1048-54.

177. Egashira N, Mishima K, Iwasaki K, Oishi R, Fujiwara M. New topics in vasopressin receptors and approach to novel drugs: role of the vasopressin receptor in psychological and cognitive functions. J Pharmacol Sci 2009; 109(1): 44-9.

178. Jard S, Barberis C, Audigier S, Tribollet E. Neurohypophyseal hormone receptor systems in brain and periphery. Prog Brain Res 1987; 72: 173-87.

179. Insel TR, Wang ZX, Ferris CF. Patterns of brain vasopressin receptor distribution associated with social organization in microtine rodents. J Neurosci 1994; 14(9): 5381-92.

180. Insel TR, Shapiro LE. Oxytocin receptor distribution reflects social organization in monogamous and polygamous voles. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89(13): 5981-5.

181. Insel TR, Gelhard R, Shapiro LE. The comparative distribution of forebrain receptors for neurohypophyseal peptides in monogamous and polygamous mice. Neuroscience 1991; 43(2/3): 623-30.

182. Choleris E, Clipperton-Allen AE, Phan A, Kavaliers M. Neuroendocrinology of social information processing in rats and mice. Front Neuroendocrinol 2009; 30(4): 442-59.

183. Bielsky IF, Hu SB, Ren X, Terwilliger EF, Young LJ. The V1a vasopressin receptor is necessary and sufficient for normal social recognition: a gene replacement study. Neuron 2005; 47(4): 503-13.

184. Wersinger SR, Ginns EI, O'Carroll AM, Lolait SJ, Young WS, 3rd. Vasopressin V1b receptor knockout reduces aggressive behavior in male mice. Mol Psychiatry 2002; 7(9): 975-84.

185. Choleris E, Gustafsson JA, Korach KS, Muglia LJ, Pfaff DW, Ogawa S. An estrogen-dependent four-gene micronet regulating social recognition: a study with oxytocin and estrogen receptor-alpha and -beta knockout mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100(10): 6192-7.

186. Choleris E, Kavaliers M, Pfaff DW. Functional genomics of social recognition. J Neuroendocrinol 2004; 16(4): 383-9.

187. Calhoun JB. Population density and social pathology. Sci Am 1962; 206: 139-48.

188. Field EF, Whishaw IQ, Pellis SM, Watson NV. Play fighting in androgen-insensitive tfm rats: evidence that androgen receptors are necessary for the development of adult playful attack and defense. Dev Psychobiol 2006; 48(2): 111-20.

189. Edwards DA. Early androgen stimulation and aggressive behavior in male and female mice. Physiol Behav 1969; 4(3): 333-8.

190. Demas GE, Moffatt CA, Drazen DL, Nelson RJ. Castration does not inhibit aggressive behavior in adult male prairie voles (Microtus ochrogaster). Physiol Behav 1999; 66(1): 59-62.

191. Trainor BC, Marler CA. Testosterone, paternal behavior, and aggression in the monogamous California mouse (*Peromyscus californicus*). Horm Behav 2001; 40(1): 32-42.

192. Trainor BC, Greiwe KM, Nelson RJ. Individual differences in estrogen receptor alpha in select brain nuclei are associated with individual differences in aggression. Horm Behav 2006; 50(2): 338-45.

193. Johnson F, Whalen RE. Testicular hormones reduce individual differences in the aggressive behavior of male mice: a theory of hormone action. Neurosci Biobehav Rev 1988; 12(2): 93-9.

194. Albert DJ, Jonik RH, Watson NV, Gorzalka BB, Walsh ML. Hormone-dependent aggression in male rats is proportional to serum testosterone concentration but sexual behavior is not. Physiol Behav 1990; 48(3): 409-16.

195. Simon NG, Cologer-Clifford A, Lu SF, McKenna SE, Hu S. Testosterone and its metabolites modulate 5HT1A and 5HT1B agonist effects on intermale aggression. Neurosci Biobehav Rev 1998; 23(2): 325-36.

196. Ogawa S, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW. Behavioral effects of estrogen receptor gene disruption in male mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94(4): 1476-81.

197. Ogawa S, Washburn TF, Taylor J, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW. Modifications of testosterone-dependent behaviors by estrogen receptor-alpha gene disruption in male mice. Endocrinology 1998; 139(12): 5058-69.

198. Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(26): 15677-82.

199. Wommack JC, Taravosh-Lahn K, David JT, Delville Y. Repeated exposure to social stress alters the development of agonistic behavior in male golden hamsters. Horm Behav 2003; 43(1): 229-36.

200. Huhman KL, Solomon MB, Janicki M, Harmon AC, Lin SM, Israel JE, et al. Conditioned defeat in male and female Syrian hamsters. Horm Behav 2003; 44(3): 293-9.

201. Kruk MR. Ethology and pharmacology of hypothalamic aggression in the rat. Neurosci Biobehav Rev 1991; 15(4): 527-38.

202. de Bruin JP, van Oyen HG, Van de Poll N. Behavioural changes following lesions of the orbital prefrontal cortex in male rats. Behav Brain Res 1983; 10(2/3): 209-32.

203. Swanson LW. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. Brain Res 2000; 886(1/2): 113-64.

204. Chiavegatto S, Dawson VL, Mamounas LA, Koliatsos VE, Dawson TM, Nelson RJ. Brain serotonin dysfunction accounts for aggression in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98(3): 1277-81.

205. Miczek KA, Maxson SC, Fish EW, Faccidomo S. Aggressive behavioral phenotypes in mice. Behav Brain Res 2001; 125(1/2): 167-81.

206. Saudou F, Amara DA, Dierich A, LeMeur M, Ramboz S, Segu L, et al. Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT1B receptor. Science 1994; 265(5180): 1875-8.

207. Zhuang X, Gross C, Santarelli L, Compan V, Trillat AC, Hen R. Altered emotional states in knockout mice lacking 5-HT1A or 5-HT1B receptors. Neuropsychopharmacology 1999; 21(2 Suppl): 52S-60S.

208. Kriegsfeld LJ, Dawson TM, Dawson VL, Nelson RJ, Snyder SH. Aggressive behavior in male mice lacking the gene for neuronal nitric oxide synthase requires testosterone. Brain Res 1997; 769(1): 66-70.

209. Kerr JE, Allore RJ, Beck SG, Handa RJ. Distribution and hormonal regulation of androgen receptor (AR) and AR messenger ribonucleic acid in the rat hippocampus. Endocrinology 1995; 136(8): 3213-21.

210. Nunez JL, Huppenbauer CB, McAbee MD, Juraska JM, DonCarlos LL. Androgen receptor expression in the developing male and female rat visual and prefrontal cortex. J Neurobiol 2003; 56(3): 293-302.

211. Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. J Comp Neurol 1990; 294(1): 76-95.

212. Zhou L, Blaustein JD, De Vries GJ. Distribution of androgen receptor immunoreactivity in vasopressin- and oxytocin-immunoreactive neurons in the male rat brain. Endocrinology 1994; 134(6): 2622-7.

213. Handa RJ, Kerr JE, DonCarlos LL, McGivern RF, Hejna G. Hormonal regulation of androgen receptor messenger RNA in the medial preoptic area of the male rat. Brain Res Mol Brain Res 1996; 39(1/2): 57-67.

214. McAbee MD, Doncarlos LL. Estrogen, but not androgens, regulates androgen receptor messenger ribonucleic acid expression in the developing male rat forebrain. Endocrinology 1999; 140(8): 3674-81.

215. Yeh S, Tsai MY, Xu Q, Mu XM, Lardy H, Huang KE, et al. Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99(21): 13498-503.

216. Scordalakes EM, Rissman EF. Aggression and arginine vasopressin immunoreactivity regulation by androgen receptor and estrogen receptor alpha. Genes Brain Behav 2004; 3(1): 20-6.

217. Zhou X. Roles of androgen receptor in male and female reproduction: lessons from global and cell-specific androgen receptor knockout (ARKO) mice. J Androl 2009; 31(3): 235-43.

218. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(12): 5925-30.

219. Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, Pear L, Wilkinson HA, Hayashi S, et al. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. Endocrinology 2003; 144(5): 2055-67.

220. Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. J Comp Neurol 1997; 388(4): 507-25.

221. Suzuki S, Handa RJ. Estrogen receptor-beta, but not estrogen receptor-alpha, is expressed in prolactin neurons of the female rat paraventricular and supraoptic nuclei: comparison with other neuropeptides. J Comp Neurol 2005; 484(1): 28-42.

222. Patisaul HB, Fortino AE, Polston EK. Neonatal genistein or bisphenol-A exposure alters sexual differentiation of the AVPV. Neurotoxicol Teratol 2006; 28(1): 111-8.

223. Ogawa S, Chester AE, Hewitt SC, Walker VR, Gustafsson JA, Smithies O, et al. Abolition of male sexual behaviors in mice lacking estrogen receptors alpha and beta (alpha beta ERKO). Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97(26): 14737-41.

224. Kudwa AE, Rissman EF. Double oestrogen receptor alpha and beta knockout mice reveal differences in neural oestrogen-mediated progestin receptor induction and female sexual behaviour. J Neuroendocrinol 2003; 15(10): 978-83.

225. Ogawa S, Eng V, Taylor J, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW. Roles of estrogen receptor-alpha gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. Endocrinology 1998; 139(12): 5070-81.

226. Rissman EF, Early AH, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB. Estrogen receptors are essential for female sexual receptivity. Endocrinology 1997; 138(1): 507-10.

227. Wersinger SR, Sannen K, Villalba C, Lubahn DB, Rissman EF, De Vries GJ. Masculine sexual behavior is disrupted in male and female mice lacking a functional estrogen receptor alpha gene. Horm Behav 1997; 32(3): 176-83.

228. Scordalakes EM, Rissman EF. Aggression in male mice lacking functional estrogen receptor alpha. Behav Neurosci 2003; 117(1): 38-45.

229. Ogawa S, Chan J, Chester AE, Gustafsson JA, Korach KS, Pfaff DW. Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96(22): 12887-92.

230. Kudwa AE, Bodo C, Gustafsson JA, Rissman EF. A previously uncharacterized role for estrogen receptor beta: defeminization of male brain and behavior. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102(12): 4608-12.

231. Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. Embo J 1990; 9(5): 1603-14.

232. Auger AP, Moffatt CA, Blaustein JD. Reproductively-relevant stimuli induce Fos-immunoreactivity within progestin receptor-containing neurons in localized regions of female rat forebrain. J Neuroendocrinol 1996; 8(11): 831-8.

233. Greco B, Allegretto EA, Tetel MJ, Blaustein JD. Coexpression of ER beta with ER alpha and progestin receptor proteins in the female rat forebrain: effects of estradiol treatment. Endocrinology 2001; 142(12): 5172-81.

234. Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the rat medial preoptic nucleus by estrogenic and antiestrogenic compounds: an in situ hybridization study. Endocrinology 1997; 138(12): 5476-84.

235. Kudwa AE, Gustafsson JA, Rissman EF. Estrogen receptor beta modulates estradiol induction of progestin receptor immunoreactivity in male, but not in female, mouse medial preoptic area. Endocrinology 2004; 145(10): 4500-6.

236. Quadros PS, Pfau JL, Goldstein AY, De Vries GJ, Wagner CK. Sex differences in progesterone receptor expression: a potential mechanism for estradiol-mediated sexual differentiation. Endocrinology 2002; 143(10): 3727-39.

237. Ciliax BJ, Nash N, Heilman C, Sunahara R, Hartney A, Tiberi M, et al. Dopamine D(5) receptor immunolocalization in rat and monkey brain. Synapse 2000; 37(2): 125-45.

238. Lonstein JS, Blaustein JD. Immunocytochemical investigation of nuclear progestin receptor expression within dopaminergic neurones of the female rat brain. J Neuroendocrinol 2004; 16(6): 534-43.

239. Phelps SM, Lydon JP, O'Malley B W, Crews D. Regulation of male sexual behavior by progesterone receptor, sexual experience, and androgen. Horm Behav 1998; 34(3): 294-302.

240. Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. Endocr Rev 1994; 15(3): 342-55.

241. Roselli CE, Abdelgadir SE, Ronnekleiv OK, Klosterman SA. Anatomic distribution and regulation of aromatase gene expression in the rat brain. Biol Reprod 1998; 58(1): 79-87.

242. Roselli CE, Horton LE, Resko JA. Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. Endocrinology 1985; 117(6): 2471-7.

243. Toda K, Saibara T, Okada T, Onishi S, Shizuta Y. A loss of aggressive behaviour and its reinstatement by oestrogen in mice lacking the aromatase gene (Cyp19). J Endocrinol 2001; 168(2): 217-20.

244. Matsumoto T, Honda S, Harada N. Neurological effects of aromatase deficiency in the mouse. J Steroid Biochem Mol Biol 2003; 86(3/5): 357-65.

245. Dewing P, Chiang CW, Sinchak K, Sim H, Fernagut PO, Kelly S, et al. Direct regulation of adult brain function by the male-specific factor SRY. Curr Biol 2006; 16(4): 415-20.

246. Arnold AP, Chen X. What does the "four core genotypes" mouse model tell us about sex differences in the brain and other tissues? Front Neuroendocrinol 2009; 30(1): 1-9.

247. Carruth LL, Reisert I, Arnold AP. Sex chromosome genes directly affect brain sexual differentiation. Nat Neurosci 2002; 5(10): 933-4.

248. Gioiosa L, Chen X, Watkins R, Klanfer N, Bryant CD, Evans CJ, et al. Sex chromosome complement affects nociception in tests of acute and chronic exposure to morphine in mice. Horm Behav 2008; 53(1): 124-30.

249. Klein S. Sex differences in infectious and autoimmune diseases. In: Becker J, Berkley K, eds. Sex differences in the brain. New York: Oxford University Press, 2008: 329-55.

250. Palaszynski KM, Smith DL, Kamrava S, Burgoyne PS, Arnold AP, Voskuhl RR. A yin-yang effect between sex chromosome complement and sex hormones on the immune response. Endocrinology 2005; 146(8): 3280-5.

251. Altemus M, Epstein L. Sex differences in anxiety disorders. In: Becker J, Berkley K, eds. Sex differences in the brain. New York: Oxford University Press, 2008: 397-405.

252. Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. Prog Neurobiol 2003; 70(2): 83-244.

253. Mayer E, Labus J, Berkley K. Hormones and mood. In: Becker J, Berkley K, eds. Sex differences in the brain. New York: Oxford University Press, 2008: 405-27.

254. Johnston AL, File SE. Sex differences in animal tests of anxiety. Physiol Behav 1991; 49(2): 245-50.

255. Lucion AB, Charchat H, Pereira GA, Rasia-Filho AA. Influence of early postnatal gonadal hormones on anxiety in adult male rats. Physiol Behav 1996; 60(6): 1419-23.

256. Galeeva A, Tuohimaa P. Analysis of mouse plus-maze behavior modulated by ovarian steroids. Behav Brain Res 2001; 119(1): 41-7.

257. Aikey JL, Nyby JG, Anmuth DM, James PJ. Testosterone rapidly reduces anxiety in male house mice (Mus musculus). Horm Behav 2002; 42(4): 448-60.

258. Baker DG, West SA, Nicholson WE, Ekhator NN, Kasckow JW, Hill KK, et al. Serial CSF corticotropin-releasing hormone levels and adrenocortical activity in combat veterans with posttraumatic stress disorder. Am J Psychiatry 1999; 156(4): 585-8.

259. Charney DS, Redmond DE, Jr. Neurobiological mechanisms in human anxiety. Evidence supporting central noradrenergic hyperactivity. Neuropharmacology 1983; 22(12B): 1531-6.

260. Heim C, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. Persistent changes in corticotropin-releasing factor systems due to early life stress: relationship to the pathophysiology of major depression and post-traumatic stress disorder. Psychopharmacol Bull 1997; 33(2): 185-92.

261. Eckel L, Arnold A, Hampson E, Becker J, Blaustein J, Herman J. Research and methodological issues in the study of sex differences and hormone-bahavior relation. In: Becker JB, Berkley KJ, eds. Sex differences in the brain: from genes to behavior. New York: Oxford University press, 2008: 741-52.

262. Dominguez-Salazar E, Bateman HL, Rissman EF. Background matters: the effects of estrogen receptor alpha gene disruption on male sexual behavior are modified by background strain. Horm Behav 2004; 46(4): 482-90.

263. Crawley JN. What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. New York: Wiley-Liss, 2000: 167-79.

264. Liebenauer LL, Slotnick BM. Social organization and aggression in a group of olfactory bulbectomized male mice. Physiol Behav 1996; 60(2): 403-9.

265. Grgurevic N, Budefeld T, Rissman EF, Tobet SA, Majdic G. Aggressive behaviors in adult SF-1 knockout mice that are not exposed to gonadal steroids during development. Behav Neurosci 2008; 122(4): 876-84.

266. Takahashi A, Shimamoto A, Boyson CO, DeBold JF, Miczek KA. GABA(B) receptor modulation of serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus and escalation of aggression in mice. J Neurosci 2010; 30(35): 11771-80.

267. Zhao L, Kim KW, Ikeda Y, Anderson KK, Beck L, Chase S, et al. Central nervous system-specific knockout of steroidogenic factor 1 results in increased anxiety-like behavior. Mol Endocrinol 2008; 22(6): 1403-15.

268. Kim KW, Li S, Zhao H, Peng B, Tobet SA, Elmquist JK, et al. CNS-specific ablation of steroidogenic factor 1 results in impaired female reproductive function. Mol Endocrinol 2010; 24(6): 1240-50.

269. Palanza P, Gioiosa L, Parmigiani S. Social stress in mice: gender differences and effects of estrous cycle and social dominance. Physiol Behav 2001; 73(3): 411-20.

270. Kercmar J, Budefeld T, Grgurevic N, Tobet SA, Majdic G. Adolescent social isolation changes social recognition in adult mice. Behav Brain Res 2010; 216(2): 647-51.

271. Zuloaga DG, Morris JA, Jordan CL, Breedlove SM. Mice with the testicular feminization mutation demonstrate a role for androgen receptors in the regulation of

anxiety-related behaviors and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Horm Behav 2008; 54(5): 758-66.

272. Galeeva AY, Pivina SG, Tuohimaa P, Ordyan NE. Involvement of nuclear progesterone receptors in the formation of anxiety in female mice. Neurosci Behav Physiol 2007; 37(8): 843-8.

273. Pierman S, Douhard Q, Balthazart J, Baum MJ, Bakker J. Attraction thresholds and sex discrimination of urinary odorants in male and female aromatase knockout (ArKO) mice. Horm Behav 2006; 49(1): 96-104.

274. Baum MJ, Keverne EB. Sex difference in attraction thresholds for volatile odors from male and estrous female mouse urine. Horm Behav 2002; 41(2): 213-9.

275. Hurst JL. Female recognition and assessment of males through scent. Behav Brain Res 2009; 200(2): 295-303.

276. Romeo RD, Richardson HN, Sisk CL. Puberty and the maturation of the male brain and sexual behavior: recasting a behavioral potential. Neurosci Biobehav Rev 2002; 26(3): 381-91.

277. Schulz KM, Sisk CL. Pubertal hormones, the adolescent brain, and the maturation of social behaviors: lessons from the Syrian hamster. Mol Cell Endocrinol 2006; 254/255: 120-6.

278. Bakker J, Van Ophemert J, Slob AK. Sexual differentiation of odor and partner preference in the rat. Physiol Behav 1996; 60(2): 489-94.

279. Portillo W, Paredes RG. Sexual and olfactory preference in noncopulating male rats. Physiol Behav 2003; 80(1): 155-62.

280. Schulz KM, Richardson HN, Zehr JL, Osetek AJ, Menard TA, Sisk CL. Gonadal hormones masculinize and defeminize reproductive behaviors during puberty in the male Syrian hamster. Horm Behav 2004; 45(4): 242-9.

281. Močnik M, Tratnjek A. Vpliv pubertete na socialno obnašanje pri miših. Ljubljana:Veterinarska fakulteta, 2008; Prešernova naloga.

282. Keller M, Pierman S, Douhard Q, Baum MJ, Bakker J. The vomeronasal organ is required for the expression of lordosis behaviour, but not sex discrimination in female mice. Eur J Neurosci 2006; 23(2): 521-30.

283. Xiao K, Kondo Y, Sakuma Y. Sex-specific effects of gonadal steroids on conspecific odor preference in the rat. Horm Behav 2004; 46(3): 356-61.

284. Bakker J, De Mees C, Szpirer J, Szpirer C, Balthazart J. Exposure to oestrogen prenatally does not interfere with the normal female-typical development of odour preferences. J Neuroendocrinol 2007; 19(5): 329-34.

285. Ramm SA, Cheetham SA, Hurst JL. Encoding choosiness: female attraction requires prior physical contact with individual male scents in mice. Proc Biol Sci 2008; 275(1644): 1727-35.

286. Svare B, Mann M. Infanticide: genetic, developmental and hormonal influences in mice. Physiol Behav 1981; 27(5): 921-7.

287. vom Saal FS. Variation in infanticide and parental behavior in male mice due to prior intrauterine proximity to female fetuses: elimination by prenatal stress. Physiol Behav 1983; 30(5): 675-81.

288. Keller M, Pawluski JL, Brock O, Douhard Q, Bakker J. The alpha-fetoprotein knock-out mouse model suggests that parental behavior is sexually differentiated under the influence of prenatal estradiol. Horm Behav 2010; 57(4/5): 434-40.

289. Gandelman R, vom Saal F. Exposure to early androgen attenuates androgen-induced pup-killing in male and female mice. Behav Biol 1977; 20(2): 252-60.

290. Gandelman R, Vom Saal FS. Pup-killing in mice: the effects of gonadectomy and testosterone administration. Physiol Behav 1975; 15(6): 647-51.

291. Nomura M, Durbak L, Chan J, Smithies O, Gustafsson JA, Korach KS, et al. Genotype/age interactions on aggressive behavior in gonadally intact estrogen receptor beta knockout (betaERKO) male mice. Horm Behav 2002; 41(3): 288-96.

292. Grossman SP. Aggression, avoidance, and reaction to novel environments in female rats with ventromedial hypothalamic lesions. J Comp Physiol Psychol 1972; 78(2): 274-83.

293. Colpaert FC. The ventromedial hypothalamus and the control of avoidance behavior and aggression: fear hypothesis versus response-suppression theory of limbic system function. Behav Biol 1975; 15(1): 27-44.

294. Goyens J, Noirot E. Effects of cohabitation with females on aggressive behavior between male mice. Dev Psychobiol 1975; 8(1): 79-84.

295. Moya-Albiol L, Calvo-Torrent A, Marti-Lianes Y, Salvador A, Martinez M. Cohabitation with a female induces the same level of aggression as isolation. Psicothema 1999; 11(2): 351-56.

296. Jyotika J, McCutcheon J, Laroche J, Blaustein JD, Forger NG. Deletion of the Bax gene disrupts sexual behavior and modestly impairs motor function in mice. Dev Neurobiol 2007; 67(11): 1511-9.

297. Bodo C. A role for the androgen receptor in the sexual differentiation of the olfactory system in mice. Brain Res Rev 2008; 57(2): 321-31.

298. Quadagno DM, Wolfe HG, Kan Wha Ho G, Goldman BD. Influence of neonatal castration or neonatal anti-gonadotropin treatment on fertility, phallus development, and male sexual behavior in the mouse. Fertil Steril 1975; 26(9): 939-44.

299. Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J. Restoration of male sexual behavior by adult exogenous estrogens in male aromatase knockout mice. Horm Behav 2004; 46(1): 1-10.

300. Bakker J, Brand T, van Ophemert J, Slob AK. Hormonal regulation of adult partner preference behavior in neonatally ATD-treated male rats. Behav Neurosci 1993; 107(3): 480-7.

301. Baum MJ. Differentiation of coital behavior in mammals: a comparative analysis. Neurosci Biobehav Rev 1979; 3(4): 265-84.

302. Bonthuis PJ, Cox KH, Searcy BT, Kumar P, Tobet S, Rissman EF. Of mice and rats: key species variations in the sexual differentiation of brain and behavior. Front Neuroendocrinol 2010; 31(3): 341-58.

303. Fitch RH, Denenberg VH. A role for ovarian hormones in sexual differentiation of the brain. Behav Brain Sci 1998; 21(3): 311-27; discussion 27-52.

304. Lahr G, Maxson SC, Mayer A, Just W, Pilgrim C, Reisert I. Transcription of the Y chromosomal gene, Sry, in adult mouse brain. Brain Res Mol Brain Res 1995; 33(1): 179-82.

305. Pak TR, Chung WC, Lund TD, Hinds LR, Clay CM, Handa RJ. The androgen metabolite, 5alpha-androstane-3beta, 17beta-diol, is a potent modulator of estrogen receptor-beta1-mediated gene transcription in neuronal cells. Endocrinology 2005; 146(1): 147-55.

306. Xu J, Disteche CM. Sex differences in brain expression of X- and Y-linked genes. Brain Res 2006; 1126(1): 50-5.

307. Arnold AP, Burgoyne PS. Are XX and XY brain cells intrinsically different? Trends Endocrinol Metab 2004; 15(1): 6-11.

308. Tan SS, Williams EA, Tam PP. X-chromosome inactivation occurs at different times in different tissues of the post-implantation mouse embryo. Nat Genet 1993; 3(2): 170-4.

309. Navarro P, Avner P. An embryonic story: analysis of the gene regulative network controlling Xist expression in mouse embryonic stem cells. Bioessays; 32(7): 581-8.

310. Wolfe CA, Van Doren M, Walker HJ, Seney ML, McClellan KM, Tobet SA. Sex differences in the location of immunochemically defined cell populations in the mouse preoptic area/anterior hypothalamus. Brain Res Dev Brain Res 2005; 157(1): 34-41.

311. Hull EM, Dominguez JM. Getting his act together: roles of glutamate, nitric oxide, and dopamine in the medial preoptic area. Brain Res 2006; 1126(1): 66-75.

312. Zhou L, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. Nitric Oxide 2009; 20(4): 223-30.

313. Tilson HA. Developmental neurotoxicology of endocrine disruptors and pesticides: identification of information gaps and research needs. Environ Health Perspect 1998; 106 (Suppl 3): 807-11.

314. Kudwa AE, Boon WC, Simpson ER, Handa RJ, Rissman EF. Dietary phytoestrogens dampen female sexual behavior in mice with a disrupted aromatase enzyme gene. Behav Neurosci 2007; 121(2): 356-61.

315. Keeney DS, Jenkins CM, Waterman MR. Developmentally regulated expression of adrenal 17 alpha-hydroxylase cytochrome P450 in the mouse embryo. Endocrinology 1995; 136(11): 4872-9.

316. van Weerden WM, Bierings HG, van Steenbrugge GJ, de Jong FH, Schroder FH. Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. Life Sci 1992; 50(12): 857-61.

317. vom Saal FS. Variation in phenotype due to random intrauterine positioning of male and female fetuses in rodents. J Reprod Fertil 1981; 62(2): 633-50.