

*Elżbieta Nowakowska, Alfons Chodera, Krzysztof Kus*

## **Zwierzęce modele lęku – działanie anksjolityczne reprezentatywnych leków psychotropowych**

Katedra Farmakologii Akademii Medycznej w Poznaniu

### **Streszczenie**

Próba dostosowania zwierzęcych modeli lęku do klinicznych jednostek chorobowych związanych ze stresem jest trudna, gdyż ocena stanu emocjonalnego zwierząt jest subiektywna, a jednoznaczna interpretacja zagadnienia często niemożliwa. Eksperymentalne modele lęku można podzielić ze względu na charakter stosowanej metodyki do wywołania lęku u zwierząt – na testy konfliktu oraz testy oparte na naturalnych, niejako „etologicznych” zasadach.

Test dwuprzeciąłowy wg Crawley’a okazał się czułym modelem lęku do badania aktywności anksjolitycznej leków o różnym mechanizmie działania i potwierdzonym klinicznie działaniu przeciwlękowym.

### **Summary**

The comparison of anxiety models used in animals to clinical syndromes of anxiety and stress is difficult, because the evaluation of emotional states of animals is subjective and prone to differing interactions.

The experimental models of anxiety can be divided depending on the method used into Punishment Induced Suppression Tests and Novelty Induced Inhibition. The Two Compartment Exploratory Test of Crawley has proved to be a very sensitive test for drugs with different action mechanisms and confirmed usefulness in human anxiety diseases.

W obrazie klinicznym objawy depresji i lęku często występują równocześnie lub wzajemnie się uzupełniają.

Lęk jest jednym z objawów zaburzeń psychicznych – towarzyszących wielu psychozom schizofrenicznym, jest również jednym z objawów osiowych depresji endogennej (1). Pojęcie lęku wiąże się ze stanem emocjonalnym człowieka (6), chociaż różne formy lęku spotykamy także u zwierząt (12).

Z klinicznego punktu widzenia lęk jest zespołem wielu patologicznych objawów (behawioralnych, psychicznych, wegetatywnych i somatycznych) (1).

Zmiany w klasyfikacji diagnostycznej zaburzeń lękowych niewątpliwie wpływają na poszukiwanie nowych, zwierzęcych modeli lęku. Trudno jest jednak dostosować konkretny model do konkretnej jednostki diagnostycznej zaburzeń lękowych. Podłoże neurobiologiczne zaburzeń lękowych nie do końca jest poznane, stąd nie zawsze testy zwierzęce mogą odzwierciedlać subiektywne różnice klinicznych zaszeregowania.

W założeniu każdy model użyty w badaniach nad lękiem winien być wrażliwy na leki skuteczne w terapii lęku u ludzi (głównie benzodiazepiny); stąd powinno się porównać w wybranym modelu zwierzęcym badany lek o spodziewanym działaniu anksjolitycznym z klasyczną 1,4-benzodiazepiną, np. z diazepamem. Istotne jest również, aby do oceny działania anksjolitycznego leku wybrać taką dawkę, która nie będzie wywoływała działania sedatywnego u badanych zwierząt, gdyż może ono przesłaniać efekt anksjolityczny. Ważne jest również określenie czasu, w którym dany lek wykazuje największą aktywność farmakologiczną (szczyt działania).

Ograniczone ramy pracy nie pozwoliły na prezentację wszystkich stosowanych testów anksjolitycznych; pozwolimy więc sobie na omówienie tylko tych najczęściej stosowanych, które uważa się za reprezentatywne w badaniach nad działaniem przeciwłękowym leków.

Eksperymentalne modele lęku można podzielić ze względu na charakter stosowanej metodyki do wywołania lęku u zwierząt.

**Testy konfliktowe** stanowią najważniejszą grupę modeli lęku. Do tej grupy testów należy m.in. test Gellera-Seiftera, czy też test Vogela.

Test Gellera-Seiftera (5) w modyfikacji Carli (2) opiera się na wytworzeniu konfliktowej sytuacji przez zastosowanie sygnału dźwiękowego i szoku elektrycznego znoszącego odruch picia u szczurów pozbawionych przez pewien czas swobodnego dostępu do wody pitnej. Ta konfliktowa sytuacja może ulec osłabieniu lub zniesieniu przez zastosowanie odpowiednich dawek, np. benzodiazepin.

Doświadczenia przeprowadza się w specjalnej klatce o wymiarach  $30 \times 30 \times 40$  cm, w której podłoga wykonana jest z metalowych prętów. Ta metalowa podłoga jest dodatkowym polem elektrycznym dla łap szczura. W jednej ze ścian klatki umieszcza się plastikową butelkę z wodą ze specjalnym metalowym dozownikiem, która jest podłączona do prądu elektrycznego. Podczas sesji z szokiem elektrycznym stosuje się prąd o natężeniu  $90\text{--}200 \mu\text{A}$  (220V). Każdy kontakt szczura z butelką jest rejestrowany przez fotokomórkę.

Według Gellera-Seiftera przeciwłękowe parametry w tym teście mierzone są przez przedłużenie okresu picia szczurów w okresie „kary” (szok elektryczny i sygnał dźwiękowy), a zachowanie szczurów w okresie, w którym szczur nie jest karany bodźcem elektrycznym odpowiada działaniu sedatywnemu, które jednocześnie winno być oceniane w innych testach.

Tylko te zwierzęta, które próbują dotknąć butelki w okresie „kary” otrzymują wstrząs elektryczny. Dodatkowym stresem jest sygnał dźwiękowy prezentowany przez urządzenie zamontowane w suficie klatki.

Specjalnie zaprogramowany zegar, podczas 10-minutowych codziennych sesji dla każdego szczura, reguluje dwa istotne cykle:

- kary – sygnał dźwiękowy włączony przez okres 2,5 sek. oraz sygnał dźwiękowy i szok elektryczny prezentowany przez 8 sek.,
- bez kary – 20-sekundowy okres ciszy bez szoku elektrycznego i sygnału dźwiękowego.

W pierwszym etapie zwierzęta (uprzednio pozbawione przez 14 godz. swobodnego dostępu do wody pitnej) umieszcza się indywidualnie w opisanej klatce bez włączania sygnału dźwiękowego i szoku elektrycznego. Podczas codziennych 10-minutowych sesji przyzwyczajają się szczury najpierw do klatki i picia wody z butelki z metalowym dozownikiem. Po 12 dniach włącza się epizody „kary” (sygnał dźwiękowy plus szok elektryczny).

Każdego dnia natężenie prądu zwiększa się lub zmniejsza w zależności od zniesienia odruchu picia dla każdego testowanego szczura. Po każdej sesji szczurom podłącza się wodę przez okres 2 godzin. Szczury przyzwyczajają się do picia w stresowej sytuacji po 10–12 dniach codziennych 10-minutowych sesji. Po tym okresie zwierzętom podaje się leki o spodziewanym działaniu anksjolitycznym i poddaje ocenie w opisanym teście.

Test Vogela jest podobny do testu Gellera-Seiftera, z tym, że nie ma w nim bodźca negatywnego – sygnału dźwiękowego.

W wyżej opisanych modelach lęku bezwarunkowe, czy uprzednio wyuczone reakcje pokarmowe są hamowane przez zastosowanie bodźców awersyjnych (bodziec bólowy wywołany prądem elektrycznym lub bodziec dźwiękowy skojarzony z bodźcem bólowym).

**Inne modele lęku** to testy oparte na naturalnych, niejako „etologicznych” zasadach, np. obawa przed otwartym i oświetlonym polem, strach przed uniesioną i otwartą przestrzenią, obawa przed nowym, nieznanym osobnikiem, czy stworzenie takiej sytuacji społecznej, gdzie wykorzystuje się jako bodziec zatłoczenie klatki. W tych testach wykorzystuje się naturalną, spontaniczną tendencję zwierząt do unikania „niesprzyjającego” im środowiska. Do tych testów możemy zaliczyć, m.in.:

- test „uniesionego labiryntu krzyżowego” wg metody S. Pellow,
- test dwuprzędziałowy wg J.N. Crawley’a.

Reprezentatywnym i czułym testem do badań aktywności anksjolitycznej lęków z różnych grup jest test dwuprzędziałowy opisany przez Crawley’a (4).

Według protokołu Crawley’a szczury umieszcza się indywidualnie w zmodyfikowanym otwartym polu o wymiarach 100 × 100 cm, którego podłoga została podzielona za pomocą czarnej farby na 25 równych kwadratów (o wymiarach 5 × 5 cm). Wymienioną powierzchnię podzielono na dwa kompartymenty:

1. „biały” – oświetlony lampą, którego powierzchnia stanowiła 21 równych kwadratów;
2. „czarny” – stanowiący czarną skrzynkę zabudowaną z trzech stron o wysokości 35 cm i podłodze podzielonej za pomocą białej farby na 4 równe kwadraty.

Otwarte powierzchnie pozwalają na swobodne przechodzenie zwierząt do oświetlonego kompartymentu.

Opisana czarna skrzynka umieszczona zostaje w narożniku otwartego pola. W dniu badania zwierzęta otrzymują badany lek (grupa badana) lub rozpuszczalnik (grupa kontrolna) i w odpowiednim czasie (szczyt działania leku)

szczury umieszcza się w zmodyfikowanym, otwartym polu, zawsze w tym samym kwadracie w oświetlonym kompartmencie. Każdy szczur poddawany jest ocenie w opisanym teście tylko raz. Eksperymenty przeprowadza się zawsze w stałym czasie, np. między godz. 10<sup>00</sup> a 14<sup>00</sup>.

Dwie osoby siedzące w odległości 2 metrów od aparatu dokonują niezależnych pomiarów przekraczanych przez szczury kwadratów w kompartmencie oświetlonym – białym (WSE), czarnym (BSE) oraz przejść między jednym a drugim kompartmencie (BWT) w ciągu 5 minut. Po zakończeniu sesji dla każdego szczura podłogę aparatu dokładnie się czyści.

Test ten okazał się czułym testem do oceny działania przeciwłękowego leków o różnych mechanizmach działania, np.: risperidonu – antagonisty receptora DA<sub>2</sub> i 5-HT<sub>2</sub> (8) buspironu – agonisty receptora 5-HT<sub>1A</sub> (3), ondansetronu – antagonisty receptora 5-HT<sub>3</sub> (9), fluoksetyny – inhibitora wychwytu zwrotnego serotoniny (10), moklobemidu – inhibitora MAO-A (7) czy klasycznych 1,4-BZ (9, 11).

Przykłady działania anksjolitycznego leków z różnych grup w teście dwu-przedziałowym przedstawia tabela 1.

Tabela 1. Działanie anksjolityczne reprezentatywnych leków psychotropowych (w teście Crawley'a)

Lek	Dawka [mg/kg]	WSE [ $\pm$ SEM]	BWT [ $\pm$ SEM]	BSE [ $\pm$ SEM]
Kontrola (CMC)	0,5%	1,2 $\pm$ 0,4	2,6 $\pm$ 0,5	9,5 $\pm$ 1,2
Oxazepam	5,0	24,1* $\pm$ 3,9 [F=34,1]	12,1* $\pm$ 2,1 [F=19,4]	14,2* $\pm$ 2,1 [F=3,8]
Ondansetron	0,1	15,2* $\pm$ 1,2 [F=122,5]	6,7* $\pm$ 1,1 [F=11,5]	11,4 $\pm$ 1,9 [F=1,2]
Buspiron	0,2	15,4* $\pm$ 1,2 [F=126,0]	7,8* $\pm$ 1,1 [F=18,5]	13,4 $\pm$ 1,8 [F=3,3]
Moklobemid	10,0	35,1* $\pm$ 5,1 [F=23,9]	8,1* $\pm$ 1,2 [F=17,9]	15,1* $\pm$ 2,1 [F=42,3]
Risperidon	0,15	18,3* $\pm$ 2,0 [F=14,2]	2,8 $\pm$ 0,8 [F=0,1]	10,0 $\pm$ 1,8 [F=0,5]
Fluoksetyna	5,0	54,8* $\pm$ 6,4 [F=48,4]	12,4* $\pm$ 1,8 [F=27,5]	23,6* $\pm$ 2,4 [F=84,8]

BSE – liczba przekroczeń kwadratów w polu czarnym

WSE – liczba przekroczeń kwadratów w polu białym

BWT – liczba przekroczeń pomiędzy kwadratami białymi i czarnymi

\* różnica statystycznie znamienne (p < 0,05) względem grupy kontrolnej

Innym testem z grupy tzw. testów naturalnych jest test „uniesionego labiryntu krzyżowego”.

Metoda opiera się na zwyczajowym, naturalnym preferowaniu przez szczury ciemnego pomieszczenia. Według Pellow (13) zwierzęta przed właściwym

testem umieszcza się w drewnianej skrzynce o wymiarach  $60 \times 60 \times 35$  cm na okres 5 minut. Po okresie adaptacji, szczura umieszcza się na skrzyżowaniu otwartych i zamkniętych ramion labiryntu krzyżowego (zamontowanego na stojaku, 50 cm od podłogi) głową skierowaną do ramienia zamkniętego. Labirynt oświetlony jest żarówką o mocy 150 W, umieszczoną centralnie nad labiryntem w odległości 1 m. W ciągu 5 minut testu ilość wejść oraz czas przebywania szczura w otwartych ramionach labiryntu notowana jest przez dwóch obserwatorów siedzących w odległości 1 m od otwartych ramion labiryntu. Badania wykonuje się każdorazowo dla grupy kontrolnej i badanej (po podaniu leku o spodziewanym działaniu anksjolitycznym).

Istotą wszystkich stosowanych zwierzęcych modeli lęku jest stworzenie sytuacji konfliktowej, w wyniku której dochodzi do zderzenia się i antagonizmu popędów, np. pokarmowego lub ciekawości (eksplorowanie nowego otoczenia) z popędem strachu (przed otwartym i oświetlonym polem), jak to ma miejsce, np. w teście otwartego pola czy w teście „uniesionego labiryntu krzyżowego”. Podobnie w teście konfliktu Vogela, czy Gellera-Seiftera dochodzi do antagonizmów popędu głodu lub pragnienia z popędem strachu (lękiem przed karą – bodźcem bólowym wywołanym prądem elektrycznym). Wskutek lęku reakcje wykonawcze związane z popędem są hamowane, a klasyczne leki przeciwlękowe, jak np. benzodiazepiny „odblokowują” stłumione reakcje.

Należy dodać, że nie wszystkie testy są „specyficzne” do badania aktywności anksjolitycznej leków. Praktycznie tylko benzodiazepiny są aktywnymi anksjolitykami we wszystkich zwierzęcych modelach lęku; inne leki, takie jak buspiron (agonista receptora  $5\text{-HT}_{1A}$ ), czy selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI) lub ondansetron (antagonista receptora  $5\text{-HT}_3$ ), są aktywne w jednym z modeli lęku, w innym nie wykazują działania, chociaż aktywność przeciwlękowa tych leków została potwierdzona klinicznie.

Przyjęty i coraz częściej uzupełniany podział zaburzeń lękowych u człowieka nie zawsze znajduje odzwierciedlenie w testach zwierzęcych. Wprawdzie badacze starają się stworzyć sytuacje eksperymentalne stanowiące modele lęku u ludzi, jednak mechanizmy tego zjawiska u ludzi są o wiele bardziej skomplikowane. Wydaje się być prawie pewne, że reakcja wywołująca strach u zwierząt może być odpowiednikiem prostych fobii u ludzi. Za model lęku uogólnionego można uznać testy wprowadzające konflikt pomiędzy przeciwstawnymi potrzebami, np. potrzeba eksploracji w pomieszczeniu oświetlonym a potrzeba przebywania w ciemności, potrzeba przebywania na otwartej przestrzeni, czy na wysokości a potrzeba przebywania w ciemnym ramieniu labiryntu. Tego rodzaju sytuacje zwiększają poczucie niepewności i prowadzą do lęku u szczurów. Za model lęku panicznego (napadowego) można uznać, np. wymuszoną reakcję na zapach prześladowcy – test nie opisany w niniejszej pracy. Trudno jest jednak znaleźć eksperymentalny model lęku odpowiadający zespołom obsesyjno-kompulsyjnym u ludzi.

Eksperymentalne modele lęku dostosowane do niektórych jednostek chorobowych związanych ze stresem przedstawia tabela 2 (12).

Tabela 2. Aktywność anksjolityczna poszczególnych grup leków w zależności od modelu użytego testu

Rodzaj testu	Agoniści receptora BZ	Agoniści receptora 5-HT <sub>1A</sub>	SSRIs	Antagoniści receptora 5-HT <sub>3</sub>	Odpowiednik leku u ludzi
Testy konfliktu	+++	+ / 0	+ / 0	0	GAD
Test labiryntu krzyżowego	++	+ / 0 / -	+ / 0	0	GAD
Test socjalnej interakcji	++	+	+ / 0	+ / 0	GAD
Test dwuprzędziłowy	+++	++	+ / 0	++ / 0	GAD

+++ bardzo silne działanie anksjolityczne

++ silne działanie anksjolityczne

+ umiarkowane działanie anksjolityczne

0 bez efektu

- działanie anksjogenne

GAD – lek uogólniony

SSRIs – selektywne inhibitory wychwytu serotoniny

**W podsumowaniu** chcielibyśmy stwierdzić, iż w dobie wprowadzania na rynek coraz nowszych leków stosowanych w terapii lęku, konieczna jest farmakologiczna analiza lęku. Należy jednak pamiętać, że żaden ze stosowanych eksperymentalnie zwierzęcych modeli lęku nie jest doskonały, gdyż ocena stanu emocjonalnego zwierząt jest bardzo subiektywna i trudna do jednoznacznej interpretacji.

## Piśmiennictwo

1. Beck A., Emery G., Greenberg R.L.: Anxiety disorders and phobias. Basic Books, Harper Collins Publ. USA, 1985.
2. Carli M., Bollabio M., Caccia S., Garattini S., Samanin R.: Studies on some pharmacological activities of 7-nitro-2 amino-5 phenyl-3H-1,5 benzodiazepine (CP-141HS) in the rat. *Arzneim. Forsch. Drug Res.* 1981, 31 (II), 10, 1721–1723.
3. Chodera A., Nowakowska E., Bartczak G.: Tolerance to a new class of non-benzodiazepine anxiolytics. *Pol. J. Pharmacol.* 1994, 46, 479–481.
4. Crawley J.N.: Neuropsychopharmacological specificity of a single animal model for the behavioral action of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1981, 15, 695–699.
5. Geller I., Seifter S.: Relative potencies of benzodiazepines as measured by their effects on conflict behavior. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1964, 149, 243–247.
6. Kępiński A.: Lęk. PZWL, Warszawa 1977.
7. Nowakowska E., Chodera A., Kus K., Rybakowski J.: Anxiolytic and memory improving effects of moclobemide. *Arzneim.-Forsch. Drug. Res.* 1998, 48 (I), 6, 625–628.
8. Nowakowska E., Kus K., Chodera A., Rybakowski J.: The influence of risperidone on cognitive function in rats. *Europ. Neuropsychopharmacol.* 1998, 1, 45.
9. Nowakowska E., Chodera A., Kus K.: An anxiolytic-like effect of ondansetron disappears in oxazepam-tolerant rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1998, 59, 935–938.
10. Nowakowska E., Chodera A., Kus K.: Anxiolytic and memory improving activity of fluoxetine. *Pol. J. Pharmacol.* 1996, 48, 255–260.
11. Nowakowska E., Chodera A., Kus K.: Pharmacological aspects of withdrawal from certain benzodiazepines. *Pol. J. Pharmacol.* 1997, 49, 89–95.
12. Olivier B., Molewijk E., Oorschot R.: New animal models of anxiety. *Europ. Neuropsychopharm.* 1994, 4, 93–102.
13. Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M.: Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 1985, 14, 149–167.
14. Vogel J.R., Beer B., Clody D.E.: A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. *Psychopharmacologia* 1971, 21, 1–7.