

# Modeli za testiranje potencijalnih anksiolitika na "anksioznom" mišu in vivo

---

Petanjek, Tin Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:392337>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-12**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Tin Luka Petanjek**

**Modeli za testiranje potencijalnih anksiolitika  
na "anksioznom" mišu in vivo**

**Diplomski rad**



**Zagreb, 2020.**

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom Izv.prof.dr.sc. Ante Tvrdeića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2019/2020.

## **POPIS I OBJAŠNENJE KRATICA**

DSM-5 - Dijagnostički i statistički priručnik za duševne poremećaje

MKB-10 - Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema

OKP - Opsesivno kompulzivni poremećaj

PTSP - Post traumatski stresni poremećaj

CSTC - Kortiko-strijato-talamo-kortikalni

DLPFC - Dorzolateralni prefrontalni korteks

AMG - Amigdala

PFC - Prefrontalni korteks

OFC - Orbitofrontalni korteks

ACC - Prednji cingularni korteks

PAG - Periakveduktalna siva tvar

HTM - Hipotalamus

PBN - Parabrahijalna jezgra

LC - Locus coeruleus

HPC - Hipokampus

NR - Jezgre rafe

AMPA -  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina

NMDA - N-metil-D-aspartat

NA - Noradrenalin

5HT - Serotonin

SERT - Serotoninski transporter

SSRI - Selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina

SNRI - Selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina i noradrenalina

TCA - Triciklički antidepresivi

HAB - Model srođenih štakora sa puno anksioznog ponašanja

NAB - Model srođenih štakora sa normalnom količinom anksioznog ponašanja.

LAB - Model srođenih štakora sa malo anksioznog ponašanja

## SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| Sažetak.....  | I  |
| Summary.....  | II |
| 1. ANKSIOZNI POREMEĆAJI.....  | 1  |
| 1.1 Klinički entiteti iz spektra anksioznih poremećaja.....                                     | 1  |
| 1.2 Neuroanatomija straha i anksioznosti.....   | 3  |
| 1.3 Neurotransmiteri uključeni u kontrolu straha i anksioznosti.....                            | 6  |
| 1.4 Farmakologija anksioznosti.....   | 8  |
| 2. MODELI PONAŠANJA NALIK NA ANKSIOZNOST U POKUSNIH ŽIVOTINJA –<br>IMA LI OD NJIH KORISTI?..... | 13 |
| 2.1 Pojavna vrijednost modela nalik na anksioznost u pokusnih životinja.....                    | 14 |
| 2.2 Prediktivna vrijednost modela nalik na anksioznost u pokusnih životinja.....                | 14 |
| 2.3 Konstruktivna vrijednost modela nalik na anksioznost u pokusnih životinja..                 | 15 |
| 3. KLASIFIKACIJA I SUBKLASIFIKACIJA MODELA NALIK NA ANKSIOZNOST U<br>POKUSNIH ŽIVOTINJA.....    | 16 |
| 3.1 “Trenutni”, prolazni, akutni modeli nalik na anksioznost, subklasifikacija.....             | 17 |
| 3.2 “Trajni”, stabilni ili kronični modeli nalik na anksioznost, subklasifikacija.....          | 18 |
| 4. “TRENUTNI”, PROLAZNI ILI AKUTNI MODELI NALIK NA ANKSIOZNOST.....                             | 19 |
| 4.1 Test u uzdignutom labirintu u obliku znaka plus .....                                       | 19 |
| Opis uređaja.....   | 20 |

|  |    |
|--|----|
| Prikupljanje podataka.....   | 20 |
| Vrijednost modela.....   | 21 |
| 4.2 Test otvorenog prostora.....   | 21 |
| Opis uređaja.....  | 22 |
| Prikupljanje podataka.....   | 23 |
| Vrijednost modela.....   | 23 |
| 4.3 Test u kutiji sa svijetlim i tamnim odjeljkom.....   | 24 |
| Opis uređaja.....  | 25 |
| Prikupljanje podataka.....   | 25 |
| Vrijednost modela.....   | 25 |
| 4.4 Kondicionirani strah.....  | 26 |
| Opis uređaja.....  | 27 |
| Prikupljanje podataka.....   | 28 |
| Vrijednost modela.....   | 29 |
| 5. “TRAJNI”, STABILNI ILI KRONIČNI MODELI NALIK NA ANKSIOZNOST.....  | 31 |
| 5.1 Trajni modeli nalik na anksioznost izazvani genetskim ili kemijskim<br>manipulacijama.....   | 31 |
| 5.2 Trajni modeli nalik na anksioznost izazvani stresom.....   | 33 |
| 5.3 Wistar Zagreb štakori, sublinija visoki serotonin - primjer „trajnog” modela<br>nalik na anksioznost izazvan genetičkom manipulacijom..... | 34 |

|  |    |
|--|----|
| 6. RAZLIČITE VRSTE POKUSNIH ŽIVOTINJA U MODELIMA ZA PONAŠANJE NALIK NA ANKSIOZNOST.....  | 35 |
| 6.1 Koje se vrste pokusnih životinja najčešće koriste kao model za istraživanje u pokusima ponašanja nalik na anksioznost? PubMed pretraga literature..... | 35 |
| 6.2 Zebra ribica u istraživanju anksioznosti. Zašto ju trebamo koristiti?.....   | 36 |
| Opće prednosti modela zebra ribice.....  | 36 |
| Specifične prednosti zebra ribice kao modela za istraživanje anksioznosti.....   | 37 |
| Ograničenja.....   | 38 |
| 7. ZAKLJUČCI.....  | 40 |
| Zahvale.....   | 41 |
| Literatura.....  | 42 |
| Životopis.....   | 48 |



## Sažetak

Naslov: Modeli za testiranje potencijalnih anksiolitika na "anksioznom" mišu in vivo

Autor: Tin Luka Petanjek

Anksiozni poremećaji smatraju se jednim od najčešćih duševnih poremećaja te se vjeruje da će velik dio populacije tijekom života ispuniti kriterije za barem jedan od anksioznih poremećaja. Karakterizirani su situacijski neprimjerenim strahom, panikom ili uz njih vezanim ponašanjem. Anksiozni poremećaji se međusobno razlikuju ovisno o situaciji u kojoj se pojavljuju ili simptomima koje iskazuju, te ih je moguće kategorizirati prema DSM-5 ili MKB-10 klasifikacijama. Smatra se kako do anksioznih poremećaja dolazi zbog disfunkcije u amigdala ili CSTC krugovima te njihovim neuronskim vezama s mnogim moždanim strukturama. Među neurotransmitere uključene u anksiozne poremećaje ubrajamo GABA-u, serotonin i kateholamine. Sustavi neurotransmitera ujedno su i cilj terapije anksioznih poremećaja te su danas najčešće upotrebljavani benzodiazepini, SSRI ili SNRI te buspiron čiji učinak je usmjeren na modulaciju, te spojevi s djelovanjem na periferne adrenergičke receptore koji imaju utjecaj na simptome anksioznih poremećaja. Kako bismo analizirali anksiozne poremećaje i uz njih vezane obrasce ponašanja te djelovanje farmakoloških pripravaka upotrebljavamo životinjske modele. Modele je potrebno vrjednovati kako bi se odredila njihova učinkovitost u analizi određenog poremećaja, djelovanja određenog anksiolitika ili primjenjivost opažanja u životinjskim modelima na ljude. U upotrebi su mnoge životinjske vrste poput štakora, miševa, zebra ribice i zamoraca, te razni oblici uređaja za testiranje.

Ključne riječi: Anksiozni poremećaji, amigdala, anksiolitici, životinjski modeli.

## Summary

Title: Models for in vivo testing of potential anxiolytics in an "anxious" mouse

Author: Tin Luka Petanjek

Anxiety disorders are considered to be one of the most common mental disorders and it is believed that a large portion of the population will meet criteria for at least one anxiety disorder during their lifetime. They are characterized by situationally inappropriate fear, panic, or related behavior. Anxiety disorders differ from each other depending on the situation in which they occur or symptoms they exhibit and can be categorized according to DSM-5 or ICD-10 classifications. Anxiety disorders are thought to occur due to dysfunction in the amygdala or CSTC circuits and their neural connections to many brain structures. Neurotransmitters involved in anxiety disorders include GABA, serotonin, and catecholamines. Neurotransmitter systems are also the goal of anxiety disorder therapy. Today the most commonly used medicines are benzodiazepines, SSRIs or SNRIs and buspirone, whose effect is directed at modulation, and compounds with effects on peripheral adrenergic receptors that affect the symptoms of anxiety disorders. In order to analyze anxiety disorders and related behavioral patterns and the action of pharmacological agents, we use animal models. Models need to be evaluated to determine their effectiveness in analyzing a particular disorder, the action of a particular anxiolytic, or the applicability of observations in animal models to humans. Many animal species such as rats, mice, zebra fish and guinea pigs, and various forms of testing devices are in use.

Key words: Anxiety disorders, amygdala, anxiolytics, animal models.

## 1. ANKSIOZNI POREMEĆAJI

Anksiozni poremećaji pripadaju među najčešće duševne poremećaje. Karakterizira ih pojava u okolnostima neprimjerene anksioznosti, panike i straha te uz njih povezanih ponašanja, poput primjerice izbjegavajućeg ponašanja. Tokom života najmanje 25% pučanstva ispuniti će dijagnostičke kriterije za neki od anksioznih poremećaja (1). Istraživanje European Brain Council (EBC) i European College of Neuropsychopharmacology (ECNP) objavljeno 2011. pokazuje da je jednogodišnja prevalencija svih anksioznih poremećaja na razini Europske unije iznosila 14,0%. Šezdeset i jedan milijun ljudi u EU bio je obolio od nekog od anksioznih poremećaja, a trošak zbog onesposobljenosti je iznosio 71 milijardu €. Istraživanje je obuhvatilo 27 članica EU plus Švicarsku, Norvešku i Island (Republika Hrvatska tada nije bila u EU). Također u tom istraživanju uočena je povećana učestalost anksioznih poremećaja kod žena naspram muškaraca s omjerom 2,5 :1 u korist ženskog spola (2). Anksiozne poremećaje možemo razlikovati prema vrsti situacija i objekata koji izazivaju tjeskobu, strah, paniku ili izbjegavajuće ponašanje te njima pridružene načine razmišljanja. Kod oboljelih se nerijetko uočava i istodobna prisutnost kriterija za dva ili više anksioznih poremećaja (1), prema tome međusobni komorbiditet anksioznih poremećaja razmjerno je učestala pojava.

### 1.1 Klinički entiteti iz spektra anksioznih poremećaja

Kliničke entitete iz spektra anksioznih poremećaja razvrstavamo prema 2 klasifikacije, DSM-5 Američke udruge psihijatara (3) i MKB-10 Svjetske zdravstvene organizacije (4). U nastavku biti će navedeni anksiozni poremećaji i njihova kratka definicija prema DSM-5 klasifikaciji iz 2013. godine. **Separacijski anksiozni poremećaj** očituje se kao dugotrajan, snažan i za stadij razvoja neodgovarajući

strah ili anksioznost zbog odvajanja od roditeljske figure ili mjesta za koje je bolesnik posebno vezan (1). **Selektivni mutizam** označava stanje u kojemu osoba u točno određenim socijalnim situacijama (npr. škola) nije sposobna govoriti, dok se u drugima potpuno normalno verbalno izražava (1). **Specifične fobije** označavaju stalni, nerealni, pretjerani i nelogični strah od specifičnih situacija (poput agorafobije gdje se strah očituje u prisutnosti otvorenog prostora ili akrofobije gdje se strah očituje zbog visine) ili objekata (1). **Socijalni anksiozni poremećaj** podrazumijeva iracionalni strah, anksioznost ili izbjegavanje socijalnih situacija u kojima su bolesnici u centru pažnje i promatranja (kod nastupa u javnosti, jela, govora) (1). **Panični poremećaj** označava spontane, neočekivane i opetovane napadaje paničnog straha koji nisu uvjetovani životno opasnom situacijom te nekom drugom psihijatrijskom ili somatskom bolešću (1). **Generalizirani anksiozni poremećaj** očituje se trajnom, generaliziranom i neodređenom tjeskobom o različitim aspektima života (posao, karijera, prihodi, školovanje, zdravlje itd.) (1). Iako prema DSM-5 više ne pripadaju skupini anksioznih poremećaja **Opsesivno-kompulzivni poremećaj** (OKP) i **posttraumatski stresni poremećaj** (PTSP) i dalje su u bliskoj povezanosti sa anksioznim poremećajima (3). Opsesivno-kompulzivni poremećaj podrazumijeva prisutnost prisilnih misli i radnji koje bolesnik doživljava stranima i nametnutima (1), dok posttraumatski stresni poremećaj označava opetovana i nametljiva prisjećanja teškog traumatskog događaja uz negativno raspoloženje, napetost ili kombinaciju kliničkih slika (5). Prema MKB – 10 klasifikaciji anksiozni poremećaji pripadaju kategoriji neurotskih, sa stresom povezanih i somatoformnih poremećaja te uključuju: fobične anksiozne poremećaje ( agorafobija, socijalna fobija, jednostavna odnosno specifična fobija ), druge anksiozne poremećaje ( panični poremećaj, generalizirani anksiozni poremećaj, mješoviti anksiozno - depresivni poremećaj ) te

anksiozne uz stres povezane poremećaje (1). Od iznimne važnosti je razlikovanje normalne fiziološke tjeskobe i straha koji pomažu u izbjegavanju potencijalno opasnih situacija imajući tako upozoravajuću ulogu ,od patološke tjeskobe i straha koji pripadaju u neku od skupina anksioznih poremećaja (1). Patološkim tjeskobama i strahom smatramo situacije u kojima se strah/anksioznost pojavljuje bez stvarne prijetnje po osobu koja ga doživljava (anticipirajući strah) i kada upravlja životom pojedinca na način da utječe na svakodnevni život oboljele osobe.

## **1.2 Neuroanatomija straha i anksioznosti**

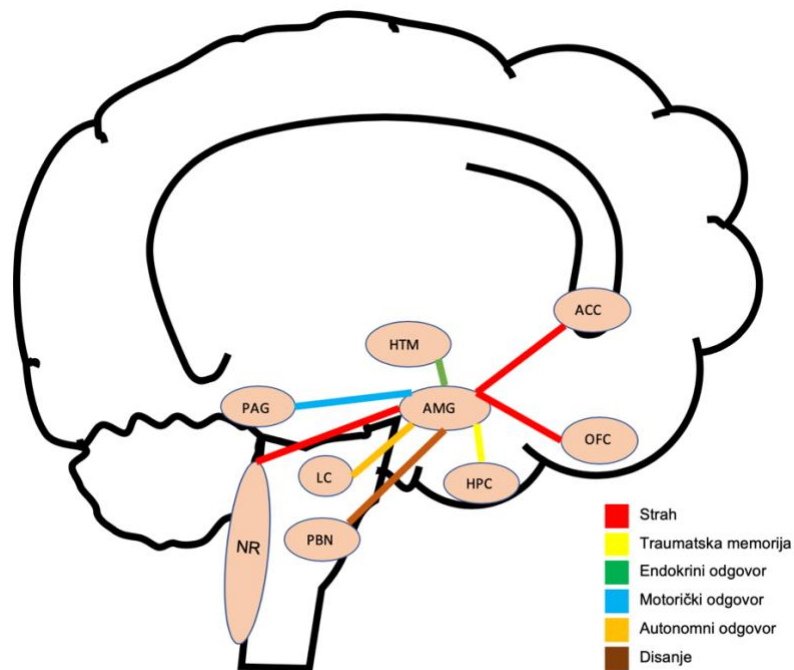
Strah kao složeni fiziološki, kognitivni i bihevioralni odgovor na ugrozu evolucijski se razvio kao odgovor na stvarnu opasnost. Anksioznost je dugotrajni odgovor na signale opasnost i proizlazi ili iz neposrednih okolnosti koje signaliziraju određenu opasnost, ili potencijalno ugrožavajućeg događaja za koji postoji sumnja na nepoželjne posljedice. Anksioznost je visoko prilagodljiva te omogućava veće preživljavanje opasnih situacija, ali obzirom da mnoge situacije nemaju jasne garancije sigurnosti ona može perzistirati. Kada ona perzistira nakon stvarne opasnosti, ili stvara odgovor koji je u nesrazmjeru sa stvarnom ugrozom učinak može biti nepoželjan. Određeni poremećaji poput paničnog poremećaja, generaliziranog paničnog poremećaja, fobija i opsesivno kompulzivnog poremećaja u studijama provedenim na blizancima pokazali su da geni nose velik utjecaj na njihovu pojavnost, dok je u PTSP-u pokazan dvojak učinak gena, na rizik razvoja bolesti te vjerojatnost izlaganja pojedinca opasnosti. Animalni modeli mogli bi pomoći u razumijevanju humanih anksioznih poremećaja jer se mnogi odgovori na podražaje strahom zadržavaju između različitih sisavaca. Također pogodni su jer je podražaje koji dovode do straha i anksioznosti lako simulirati u laboratorijskom okruženju. Pomoću animalnih studija postavljene su mnoge hipoteze o patofiziologiji humanih

anksioznih poremećaja (6). Simptome anksioznih poremećaja možemo podijeliti na simptome straha i simptome zabrinutosti. Od velike je važnosti naglasiti kako simptome straha poput panika i fobija prvenstveno povezujemo uz funkciju amigdala, dok simptome zabrinutosti poput opsesija, iščekivanja i jada povezujemo pretežito uz CSTC krugove. Amigdala (AMG) posjeduju važne anatomske veze kojima integriraju osjetne i spoznajne informacije te zatim odabiru hoće li biti odgovora na strah. Regulacija osjeta straha vrši se uzajamnim vezama amigdala sa ključnim dijelovima prefrontalnog korteksa (PFC) za regulaciju emocija, orbitofrontalnog korteksa (OFC) i prednjeg cingulatnog korteksa (ACC). Međutim osim osjetnih i spoznajnih odgovora, strah dovodi i do motoričkih odgovora uzrokovanih povezanošću amigdala i periakveduktalne sive tvari (PAG) moždanog debla, koji ovisno o kontekstu mogu dovesti do reakcije borbe, bijega ili „zamrzavanja“ u određenom položaju (7).

Endokrina zbijanja pripisujemo vezama između amigdala i hipotalamusa (HTM), te utjecaju na hipotalamo-hipofizno-adrenalnu os koja dovodi do promjena u razinama lučenja stresnog hormona kortizola. Promjene u disanju uzrokovane su vezama između amigdala i parabrahijalne jezgre (PBN) moždanog debla, dovodeći tako do povišene respiratorne frekvencije u životno ugrožavajućim situacijama. Amigdala su također povezana sa locus coeruleusom (LC), čime ostvaruju utjecaj na kardiovaskularni i autonomni živčani sustav. Povezana su uzajamno i sa serotonergičkim rafe (NR) jezgrama u moždanom stablu. Rafe jezgre i serotonergičke projekcije u mozgu sudjeluju u regulaciji osjeta straha i tjeskobe.

Važno je ukazati i na značenje hipokampusa (HPC), koji zbog svoje uloge u pamćenju i povezanosti sa amigdalama može dovesti do aktivacije anksioznih odgovora prilikom prisjećanja traumatskih događaja, primjerice u posttraumatskom stresnom poremećaju (7). Hipokampus i amigdala su važni za kondicionirani strah.

Na slici 1 prikazani su navedeni neuronski krugovi amigdala.

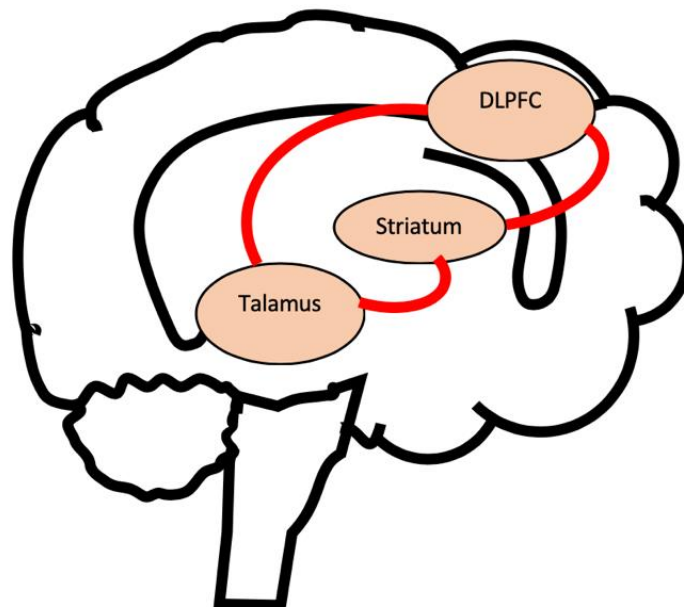


Slika 1. Neuronski krugovi amigdala sa djelovanjem na osjet straha.

AMG – amigdala, HTM – hipotalamus, ACC – prednji cingularni korteks, NR – jezgre rafe OFC – orbitofrontalni korteks, HPC – hipokampus, PBN – parabrahijalna jezgra, LC – locus coeruleus, PAG – periakveduktalna siva tvar

U zdravih osoba pokazano je kako se amigdala aktiviraju kao odgovor na osjetne podražaje koji pouzdano dovode do straha, dok je u osoba sa anksioznim poremećajima pokazana pojačana aktivnost amigdala (6). Simptomi zabrinutosti poput jada, negativnog razmišljanja i opsesija, koji kako je već navedeno proizlaze iz CSTC krugova drugi su osnovni simptomi anksioznosti. Ovaj krug započinje u PFC te šalje informacije u ventralni strijatum i ventralni talamus gdje prolaze obradu i bivaju poslane nazad u PFC.

Na slici 2 prikazan je ovaj neuronski krug.



Slika 2. Kortiko-strijato-talamo-kortikalni neuronski krug.

DLPFC - dorzolateralni prefrontalni korteks

Iako ovi neuronski krugovi dijele mnoge neurotransmitere sa neuronskim krugovima amigdala, razlikuju se od njih po uporabi dopamina. Dostupnost dopamina regulirana je aktivnošću katehol-O-metil transferaze, čije bi različite genetske izoforme Met i Val i njihov različit utjecaj na sintezu dopamina mogle biti rizičan faktor za razvoj anksioznih poremećaja (7).

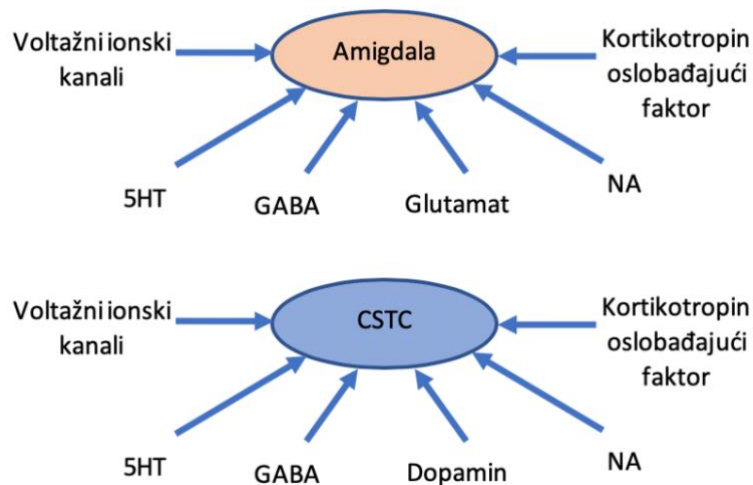
### 1.3 Neurotransmiteri uključeni u kontrolu straha i anksioznosti

U eksperimentalnim modelima na životinjama GABA se pokazala kao važan modulator ponašanja povezanog uz anksioznost u amigdalama (8) i CSTC krugu (7). GABA je glavni inhibitorni neurotransmiter središnjeg živčanog sustava i ima ključnu ulogu u kontroli ekscitabilnosti neurona. Većina gabaergičkih neurona pripada



skupini interneurona te time kontrolira ekscitabilnost neuronskih krugova u ključnim regijama mozga. Unosom GABA-e u pokusne životinje pokazano je anksiolitičko djelovanje dok je unos antagonista GABA-e doveo do anksioznog efekta (8). Iako se uloga GABA-e smatra ključnom u regulaciji anksioznosti te je zato velik dio terapijskih mogućnosti usmjeren na njen receptor važno je naglasiti da nije jedini neurotransmiter sa ulogom u modulaciji anksioznosti (8).

Na slici 3 prikazani su neki neurotransmiteri i neuropeptidi čija disfunkcija ima važnu ulogu u kontroli anksioznosti u amigdala i CSTC krugu.



Slika 3. Neurotransmiteri i neuropeptidi sa ulogom u anksioznim poremećajima u amigdala i CSTC krugu

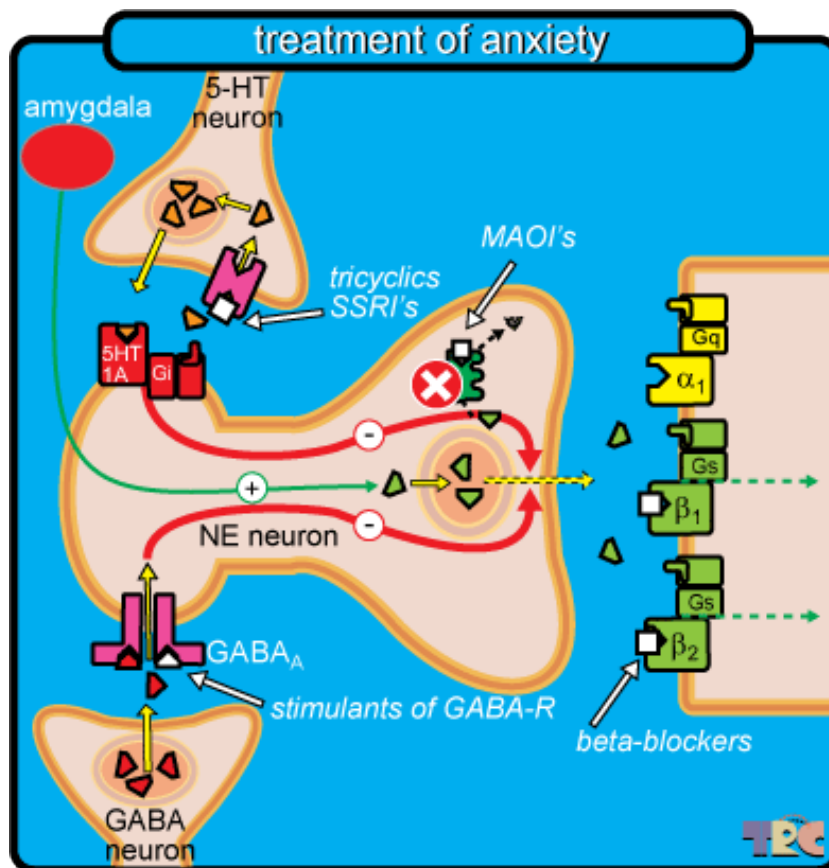
Simptomi, neuronski krugovi i neurotransmiteri povezani sa anksioznim poremećajima uvelike se poklapaju sa onima depresivnih poremećaja (7). Serotonin inervirajući dijelove amigdala i CSTC krugova tako ostvaruje ulogu u regulaciji straha i zabrinutosti, te iako su lijekovi sa djelovanjem na serotoninergički sustav tradicionalno korišteni u liječenju depresivnih poremećaja danas se upotrebljavaju i za kontrolu većine anksioznih poremećaja (7). Noradrenalin se primarno proizvodi u

locusu coeruleusu (9), zajedno sa kortikotropin oslobađajućim faktorom je uključen u ponašanja kao odgovor na okolišne i unutarnje stresore. Imaju ulogu u povećanoj razini anksioznosti kao odgovor na ustezanje opijata, a anksiolitički je učinak uočen pri administraciji njihovih antagonista (10). Glutamat je glavni ekscitatorni neurotransmiter, djeluje na AMPA, kainat i NMDA receptore ionske kanale i na mGLU G protein spregnute receptore. Djelujući na NMDA receptore glutamat uzrokuje povećanu propusnost za ione natrija i kalcija (11). Glutamat pokazuje važnu ulogu u patogenezi anksioznosti i kondicioniranog straha te bi se djelovanjem na različite sinaptičke proteine glutamatne neurotransmisije mogao postići anksiolitički učinak (12). Dopamin je glavni kateholamin mozga sisavaca, pokazuje ulogu brojnim funkcijama organizma i njegova uloga u patofiziologiji brojnih psihijatrijskih poremećaja već je dobro poznata (13). D<sub>1</sub> i D<sub>2</sub> dopaminski receptori imaju ulogu u regulaciji anksioznosti te je razina dopamina i njegovih metabolita, te aktivnost MAO-A i MAO-B povezana sa anksioznim ponašanjem (13).

#### **1.4 Farmakologija anksioznosti**

Kao što je već opisano u prethodnim poglavljima u anksiozne poremećaje uključeni su brojni neurotransmiteri i neuropeptidi na raznim lokacijama središnjeg živčanog sustava, prema tome mogućnosti farmakološkog zbrinjavanja anksioznih poremećaja su također brojne.

Na slici 4 prikazani su neki od lijekova korištenih u farmakološkoj regulaciji anksioznih poremećaja i njihovo mjesto djelovanja.



Slika 4. Farmakoterapija anksioznih poremećaja.

Anonimni autori, The Teaching Resource Centre Pharmacology Database, Leiden University Medical Center, The Netherlands.

<https://coo.lumc.nl/TRC/Graphic/txanxiety.gif> (slika s Interneta). Version 5-4-2018

(pristupljeno 30.05.2020) Dostupno na:

<https://coo.lumc.nl/TRC/default.aspx?direct=true>

Kao što je prikazano na slici 4, danas se u farmakoterapiji anksioznih poremećaja koriste lijekovi s učinkom na tri neurotransmitterska sustava: serotonergički, noradrenergički i GABA (14). Djelovanjem na 5HT sinapsu i GABA<sub>A</sub> receptore pokušava se postići inhibicija hiperekscitiranih amigdala i smanjiti povećano otpuštanje noradrenalina iz locus coeruleusa, dok se pomoću antagonista beta adrenoreceptora smanjuju simptomi uzrokovani aktivacijom receptora za

noradrenalin (slika 4) (14). Postoje tri glavna tipa GABA receptora, ionotropni GABA<sub>A</sub> i GABA<sub>C</sub> (7) te G protein spregnuti GABA<sub>B</sub> receptori (11). Aktivacijom GABA<sub>A</sub> receptora neurotransmiterom, dolazi do trenutnog porasta provodljivosti kloridnih iona kroz membranu i nastanka postsinaptičkog inhibicijskog potencijala. U terapiji anksioznih poremećaja koriste se benzodiazepini koji se vezuju za GABA<sub>A</sub> receptor (15). GABA<sub>A</sub> receptor sadrži pet peptidnih podjedinica u pentamernoj strukturi oko središnjeg kloridnog kanala (7). Podjedinice mogu biti  $\alpha$  ( $\alpha_1$  do  $\alpha_6$ ),  $\beta$  ( $\beta_1$  do  $\beta_3$ ),  $\gamma$  ( $\gamma_1$  do  $\gamma_3$ ),  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ , i  $\rho$ . Farmakologija GABA<sub>A</sub> receptora značajno varira ovisno o prisutnosti određenih podjedinica (7). GABA<sub>A</sub> receptori sa  $\delta$  umjesto  $\gamma$  i  $\alpha_4$  ili  $\alpha_6$  podjedinicama ne mogu vezati benzodiazepine i zato nisu značajni za terapiju anksioznih poremećaja. Međutim na te receptore vežu se neki drugi spojevi poput alkohola ili određenih općih anestetika (7). Između  $\alpha$  podjedinica ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  i  $\alpha_5$ ) i  $\gamma$  podjedinica ( $\gamma_2$  ili  $\gamma_3$ ) formira se benzodiazepinsko vezno mjesto. Sama GABA se veže za vlastito vezno mjesto, između  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica (7). Benzodiazepinski GABA<sub>A</sub> receptori locirani su postsinaptički i ondje vrše inhibiciju neurona, te tako u amigdala i CSTC krugovima smanjuju pretjerano okidanje i uspostavljaju anksiolitički učinak (7). Potrebno je spomenuti i flumazenil, sintetski derivat benzodiazepina koji djeluje kao kompetitivni antagonist na benzodiazepinskom veznom mjestu te blokira učinke benzodiazepina i imidazopiridina (zolpidem, zaleplon, zopiklon, eszopiklon) koji dijele vezno mjesto sa benzodiazepinima, dok ne djeluje na ligande GABA<sub>A</sub> receptora koji se ne vezuju za to vezno mjesto (barbiturati, GABA i agonisti, neurosteroidi) (15). Kao što je već spomenuto simptomi, zahvaćene regije mozga (amigdala, cingularni korteks, PFC, hipotalamus, hipokampus) i neurotransmiteri (serotonin, noradrenalin, GABA, glutamat) u velikom se dijelu preklapaju između depresivnih i anksioznih poremećaja te se stoga danas neki lijekovi prethodno

razvijeni kao antidepresivi uspješno upotrebljavaju u liječenju anksioznih poremećaja (7). 5-HT receptore nalazimo, među ostalim, u amigdalama te prefrontalnom korteksu, striatumu i talamusu ( CSTC krug ) (7). Antidepresivi sa djelovanjem na 5-HT transporter, selektivni inhibitori ponovnog unosa serotonina (SSRI) i selektivni inhibitori ponovnog unosa serotonina i noradrenalina (SNRI), učinkoviti su liječenju generaliziranog anksioznog poremećaja, paničnog poremećaja, socijalne anksioznosti, OKP i PTSP-a (7). Njihovo djelovanje dovodi do povišene razine serotonina u sinapsi akutno i posljedičnog smanjenja broja postsinaptičkih receptora (regulacije receptora na niže) kod dugotrajne terapije tijekom više tjedana (14). Tako se postiže smanjen odgovor na signale hiperaktivnih amigdala i smanjenje simptoma anksioznih poremećaja djelovanjem na veze sa locus coeruleusom i hipotalamo-hipofiznom osi (14). Zbog svoje specifičnosti i manjeg broja nuspojava SSRI i SNRI su terapija prvog izbora za anksiozne poremećaje. Međutim TCA i MAOI također mogu biti korišteni zbog sličnog mehanizma djelovanja, ali obično kod bolesnika rezistentnih na terapiju sa SSRI ili SNRI (14). Buspiron je parcijalni agonist postsinaptičkih 5-HT<sub>1A</sub> receptora za koje se smatra da su odgovorni za najveći dio njegove kliničke funkcije (16). Buspiron također ima slabi afinitet za 5-HT<sub>2C</sub> serotonininski receptor i slabo antagonističko djelovanje na dopaminski D2 receptor, a njegov aktivni metabolit djeluje i na presinaptički adrenergički α<sub>2</sub> receptor (17). Učinak mu se pripisuje povećanju razine serotonina u amigdala, PFC, striatumu i talamusu ( CSTC krug ) veoma nalik modulatorima SERT (7,17). Učinak se pojavljuje sa latencijom od 7-14 dana, u kontrastu na brzo djelovanje benzodiazepina koji djeluju vežući se na GABA<sub>A</sub> receptor (7,17). Konačno valja spomenuti i lijekove sa djelovanjem na adrenergičke receptore. Blokadam perifernih β adrenergičkih receptora moguće je djelovati na neke od tjelesnih simptoma

anksioznih poremećaja posredovanih tim receptorima. Međutim kako su simptomi anksioznih poremećaja posredovani mnogim različitim postsinaptičkim receptorima, blokada samo jednog tipa receptora neće biti primjenjiva na sve simptome i oblike anksioznosti (14). Propranolol, neselektivni  $\beta$  blokator pokazao se dobar u prekidanju simptoma poput palpitacija i hiperventilacija kod paničnih ataka i u terapiji anksioznosti prilikom javnog nastupa ( „performance anxiety“, tip socijalne anksioznosti) (18). Poznato je da primjena johimbina (antagonist  $\alpha_2$  presinaptičkih autoinhibitornih receptora za NA), kokaina (inhibira povratni unos kateholamina) i amfetamina (povećava otpuštanje NA reverznom akcijom prijenosnika) izazivaju panične napadaje u ljudi i pokusnih životinja.

## 2. MODELI PONAŠANJA NALIK NA ANKSIOZNOST U POKUSNIH ŽIVOTINJA – IMA LI OD NJIH KORISTI?

Kako bi nam bili od koristi kao modeli za testiranje potencijalnih anksiolitika za primjenu u humanoj medicini animalni modeli psihijatrijskih stanja trebali bi ispuniti nekoliko vrijednosnih kriterija. Interna vrijednost modela odnosi se na konzistentnost u dizajnu eksperimenta, reproducibilnost, pouzdanost, randomizaciju, odabir testne i kontrolne skupine (19). Ta pitanja nisu specifična samo za animalne studije.

Međutim pitanje eksterne vrijednosti modela obuhvaća primjenjivost rezultata istraživanja testne populacije (pokusnih životinja) za ciljanu populaciju – ljude. Zato je od posebnog interesa da animalni budu analogni humanim modelima bolesti (19). Stoga postoji potreba definiranja specifičnih pretpostavki kojima bi se osigurala eksterna vrijednost određenog modela. Predloženi su brojni kriteriji, međutim najveći broj autora danas se poziva na **3 kriterija vrijednosti** koja je 1984 postavio P.

Willner: **pojavnju vrijednost, prediktivnu vrijednost i konstruktivnu vrijednost** (19). Što se tiče koristi modela ponašanja, njihova vrijednost može se pronaći u razumijevanju različitog reagiranja na određene modalitete farmakoterapije. Kao primjer možemo uzeti farmakoterapiju depresije i anksioznosti. Benzodiazepini imaju ograničenu ulogu u terapiji depresije, a u anksioznosti se ubrajaju u osnovnu farmakoterapiju. Međutim SSRI su se pokazali učinkoviti u oba poremećaja, a pomoću animalnih modela omogućeno nam je proučavanje neuronskih krugova u obje bolesti i razvoj novih pristupa njihovoj terapiji (20). Također važno je upamtiti da se vrijednost modela oslanja na kliničko znanje o poremećaju i da je bolje razumijevanje prirode poremećaja ključno za njegovu korisnost (20). Naravno gledajući u budućnost veća vrijednost modela anksioznosti na pokusnim životinjama očekuje se kada zbog napredaka u tehnologiji (genomika, proteomika,

transkriptomika, tehnike oslikavanja mozga) dođe do boljeg razumijevanja danas ograničenog znanja o samoj prirodi anksioznih poremećaja u ljudi, te do raširenog korištenja jednako sofisticiranih metoda istraživanja (optogenetika, PET tomografija i MRI oslikavanje mozga) mehanizama ponašanja u pokusnih životinja (21).

## **2.1 Pojavna vrijednost modela nalik na anksioznost u pokusnih životinja**

Pojavna vrijednost modela se odnosi na sličnost ponašanja u modela (pokusne životinje) sa simptomima anksioznosti u bolesnika. Nužno je razlučiti dali model predstavlja bolest u nizu aspekata, te koji aspekti djelovanja su specifični za bolest i stvarno postoje u određenoj podgrupi bolesti (21). Konačno model ne bi trebao pokazivati obilježja koja nisu prisutna u kliničkoj slici bolesti za koju služi kao model (21). Time pojavna vrijednost obuhvaća neke aspekte terapijskog i simptomatskog djelovanja, odnosno doseg vrijednosti između modela i bolesti, na što većem rasponu simptoma i znakova. Ti su kriteriji najčešće bihevioralne i kognitivne prirode te ne ulaze u etiološku ili biološku podlogu poremećaja čime uvelike nalikuju dijagnostičkim kriterijima bolesti u MKB-10 ili DSM-V klasifikacijama (21). Međutim postavlja se pitanje trebaju li modeli oponašati cjelokupni poremećaj ili se fokusirati na određeni aspekt ili simptom bolesti.

## **2.2 Prediktivna vrijednost modela nalik na anksioznost u pokusnih životinja**

Prema Willneru kod prediktivne vrijednosti modela postavlja se pitanje: dali model ispravno predviđa ishod liječenja poremećaja bez stvaranja lažno pozitivnih rezultata (specifičnost modela) ili lažno negativnih rezultata (osjetljivost modela) (21). Kod prediktivne se vrijednosti isključivo fokusira na farmakološki efekt terapije, dok se na nefarmakološke metode uglavnom ne primjenjuje (21). Iz toga možemo zaključiti da kod prediktivne vrijednosti na modelu nije cilj protumačiti aspekte humane patologije



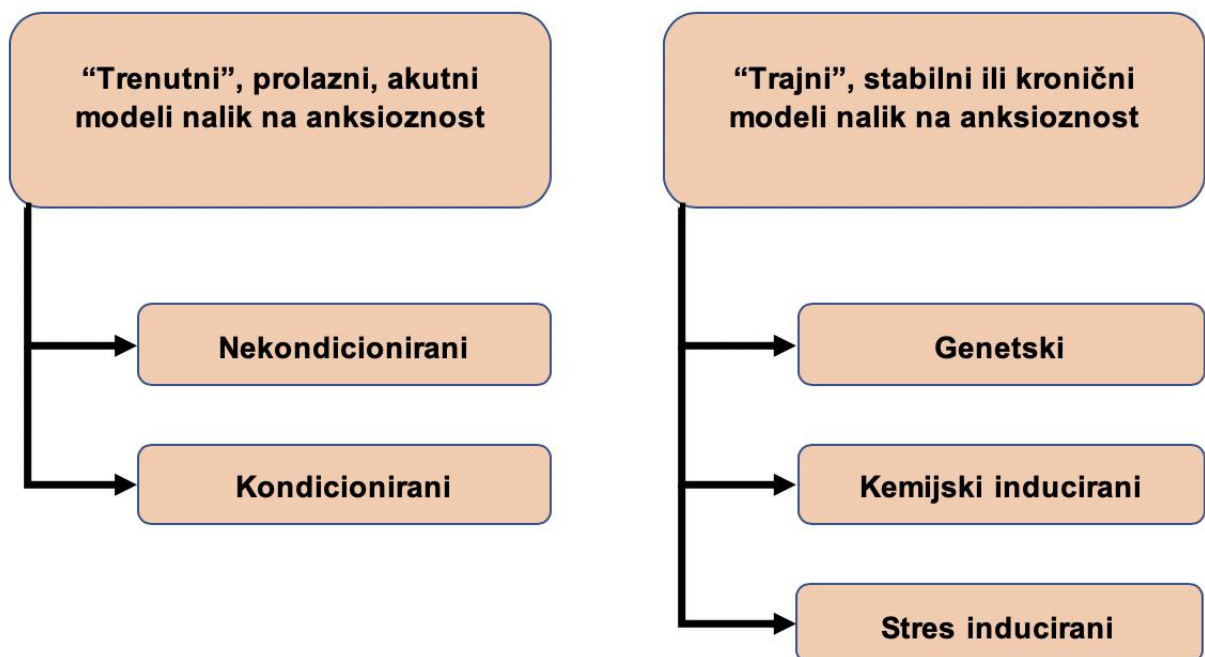
na testnoj životinji već isključivo njegovu farmakološku specifičnost i osjetljivost (21). Međutim iako se uglavnom njome procjenjuje sposobnost modela da precizno prikazuje efikasnost terapije, neki autori proširuju njeno značenje na sposobnost da predvidi specifične markere bolesti (21).

### **2.3 Konstruktivna vrijednost modela nalik na anksioznost u pokusnih životinja**

Konstruktivna vrijednost modela označava podudarnost nastajanja i razvijanja (tj. mehanizama) poremećaja u animalnom modelu sa nastajanjem i razvojem (tj. mehanizmima) kod samog poremećaja u ljudi (22). Primjer je uporaba štakora sa deficijencijom monoamina kao modela za monoaminski deficit u bolesnika sa depresijom. Prema tome konstruktivna vrijednost omogućava stvaranje teorije o zajedničkom mehanizmu i zatim testiranje najistaknutijih aspekata određenog poremećaja (23). Također postavlja se nekoliko dodatnih zahtjeva. Sličnost biološke abnormalnosti u animalnom modelu i humanoj populaciji sa dotičnim poremećajem je osnovica kriterija konstruktivne vrijednosti (19). Sama sličnost između procesa prikazanih modelom nije dovoljna za uzročno-posljedičnu povezanost (19). Prema tome odnos postojanja patološkog straha i disfunkcije dijela mozga, u slučaju anksioznosti to je (pojednostavljeno, slika 4) hiperekscitacija amigdala i hiperfunkcija noradrenergičke neurotransmisije u mozgu, trebao bi biti jednak u humanih i animalnih subjekata, odnosno osoba sa anksioznim poremećajima i životinjama podvrgnutim modelu nalik na anksioznost (19).

### 3. KLASIFIKACIJA I SUBKLASIFIKACIJA MODELA NALIK NA ANKSIOZNOST U POKUSNIH ŽIVOTINJA

Kod eksperimentalne evaluacije potencijalnog anksiolitičkog učinka terapije možemo koristiti dvije grupe animalnih modela nalik na anksioznost promatrajući princip po kojem se poremećaj razvija na modelu. Modeli u kojima se životinja suočava sa situacijama koje provociraju strah/anksioznost u određenom trenutku prilikom suočenja sa opasnošću nazivaju se „**trenutnim**“, **prolaznim ili akutnim modelima** (24). Druga grupa modela koja se upotrebljava zasnovana je na postojanju određene značajke anksioznosti koja je relativno stabilna tokom vremena, a naziva se „**trajnim**“, **stabilnim ili kroničnim modelom** nalik na anksioznost (24).



Slika 5. Klasifikacija modela nalik na anksioznost u pokusnih životinja

### 3.1 “Trenutni”, prolazni, akutni modeli nalik na anksioznost, subklasifikacija

Temelj ovih modela je normalni, fiziološki strah/anksioznost koji je kvantitativno ili kvalitativno promijenjen. Životinje nemaju trajni patološki strah, biokemijske ili morfološke promjene niti pri ulasku u test, niti pri izlasku iz njega. Razlikujemo dvije vrste trenutnih, akutnih modela za anksioznost **kondicionirane i nekondicionirane** modele. Kod **nekondicioniranih modela** odgovor na različite anksiozne podražaje je ono što bi se smatralo prirodnim strahom kao reakcijom životinje na prijetnju, bez izazivanja i učenja uvjetovanih refleksa. Simptomi nekondicioniranog straha/anksioznosti u glodavaca nalik su onima u ljudi (izbjegavanje, bježanje, smanjenje lokomotorne aktivnosti, ukočeni stav tijela, napetost mišića, budnost, pojačani autonomni odgovor, mokrenje, defekacija). Ovi modeli (testovi) imaju veliku vrijednost u razumijevanju ponašanja i omogućuju detaljniju analizu bihevioralnih promjena prouzročenih testom (25). Izlaganje životinje nepoznatom okruženju koje istovremeno evocira strah i nagon za istraživanjem predstavlja sukob oprečnih nagona (25). U psihološkoj teoriji to je mehanizam koji dovodi do anksioznih poremećaja. Neki od modela koji pripadaju ovoj skupini su najčešće korišteni modeli/testovi za anksioznost, poput testa u uzdignutom labirintu oblika znaka plus, testa otvorenog prostora te testa u kutiji sa svijetlim i tamnim odjeljkom. Njima ćemo veću više pozornosti posvetiti u sljedećem poglavlju. Osim njih u nekondicionirane, akutne modele nalik na anksioznost ubrajamo i test zatrpavanja špekula (u nekim elementima nalikuje na OKP), test socijalne interakcije (nalikuje socijalnoj anksioznosti), test ultrazvučnog glasanja mladunaca glodavaca (nalikuje separacijskoj anksioznosti) i druge.

**Kondicionirani modeli** bave se kondicioniranim odgovorom životinje na neki pozitivan (ukusna hrana npr.) ili negativan podražaj (npr. neugodni udar strujom na

šape). Ovaj model za razliku od nekondicioniranih modela uključuje trening. Naime, životinju se mora naučiti da kondicionirani podražaj (zvuk ili svjetlo ili kontekst) u fazi treninga upari sa nekondicioniranim pozitivnim (ugodnim) ili puno češće negativnim (averzivnim) podražajem. Ako je životinja uspješno naučila upariti kondicionirani sa nekondicioniranim, averzivnim podražajem, taj kondicionirani podražaj izazvati će potpuno samostalno uvjetovani odgovor i bez averzivnog podražaja (25). Uvjetovani odgovor je uključen u etiologiju anksioznosti u ljudi, pogotovo kod fobija i PTSP. U kondicionirane modele za akutnu anksioznost ubrajaju se Vogel-ov test, Geller-Seifter test i kondicionirani strah, kojeg ćemo detaljnije opisati u testu ispod.

### **3.2 “Trajni”, stabilni ili kronični modeli nalik na anksioznost, subklasifikacija**

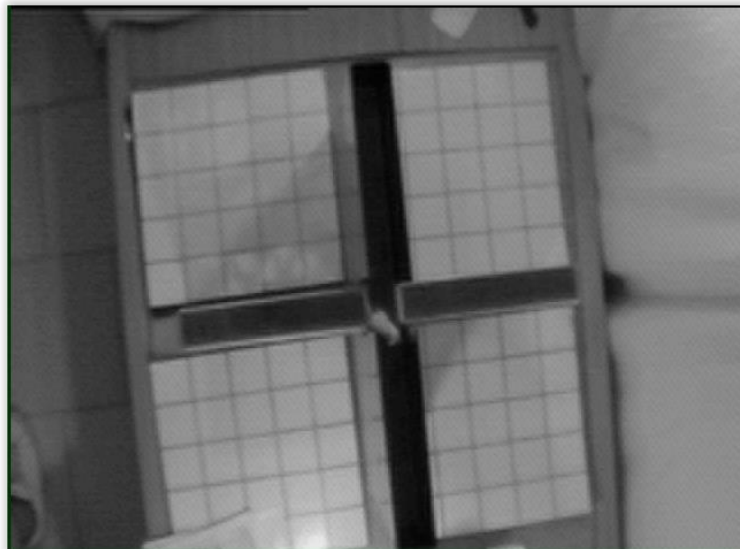
Trajna anksioznost označava stabilnu, trajnu odnosno kroničnu prisutnost simptoma anksioznosti i straha unutar različitih situacija (26). Ovi modeli nastoje reproducirati patofiziologiju humane anksioznosti utjecajem na gene (transgenične životinje, srođivanje po karakteristikama ponašanja), neurokemiju (manipulacija lijekovima) ili na faktore okoliša (stresovi, manipulacija nutrijentima). Za razliku od akutnih modela, ovdje je anksioznost prisutna prije nego se životinju stavi u test i nakon što se test završi. Njena karakteristika je stabilna anksioznost i strah, bez obzira na stvarnu prisutnost mogućeg prijetećeg podražaja. Stoga je manifestacija anksioznosti/straha moguća i u situacijama koje inače ne bi bile percipirane kao opasne (26). Zato trajni modeli anksioznosti nalikuju patološkom strahu/anksioznosti, što im daje dodatnu vrijednost. Trajnu anksioznost možemo podijeliti prema načinu na koji je postignuto anksiozno stanje dalje podijeliti na: genetske modele, kemijski inducirane modele (lijekovima, toksinima, deficitom u prehrani) i modele inducirane različitim stresnim situacijama.

#### 4. "TRENUTNI", PROLAZNI ILI AKUTNI MODELI NALIK NA ANKSIOZNOST

Kod trenutnih modela nalik na anksioznost analiziraju se situacije koje provociraju anksioznost u specifičnom momentu, uzrokovane određenom situacijom (24). U skupinu trenutnih/akutnih modela nalik na anksioznost ubrajamo **nekondicionirane testove** poput testa u uzdignutom labirintu u obliku znaka plus, testa otvorenog prostora i testa sa svijetlim i tamnim odjeljkom, te **kondicionirane testove** poput testa kondicioniranja straha u kontekstu, na zvučni i/ili svjetlosni signal (25).

##### 4.1 Test u uzdignutom labirintu u obliku znaka plus

Test u uzdignutom labirintu u obliku znaka plus (engl. „elevated plus maze“) je najkorišteniji animalni model nalik na anksioznost. Prvi su ga predložili Handley i Mithani, a kasnije je dalje evaluiran i modificiran (25). Međutim njegova uporaba ograničena je najčešće na ne-patološku anksioznost i mogućnost modela u razumijevanju mehanizama patološke anksioznosti je ograničena (26).



Slika 6. Video snimka miša za vrijeme testa u labirintu oblika znaka plus visine 40 cm. Video kamera je 1,6 m iznad uređaja. Vidi se miš koji je u središnjem, spojnom kvadrantu i procjenjuje rizik naginjući se glavom prema otvorenom, nesigurnom i

anksioznom kraku. Slika iz arhive pokusa izv.prof.dr.sc. Ante Tvrdeića, uz njegovo dopuštenje.

### **Opis uređaja**

Test u uzdignutom labirintu u obliku znaka plus temelji se na prirodnom nagonu glodavaca da istražuju za njih nepoznati okoliš (22). Uređaj je uzdignut od tla za 40-50 cm (miševi) ili 70 - 100 cm (štakori). Miš ili štakor ne može iskočiti iz uređaja zbog prirodnog straha od visine. Uređaj je u obliku znaka plus. Sastoji se od 2 nasuprotna otvorena i 2 nasuprotna zatvorena kraka (duljina x širina je 50x10 cm štakori, 30x5 cm miševi) koji se sastaju u središnjem kvadrantu pod pravim kutom. Otvoreni krakovi nemaju zidove i stvaraju anksiozni stimulans nesigurnog, otvorenog prostora. Duž otvorenih krakova obično postoji mala ograda visine 0.5 - 1 cm da životinje imaju taktilni osjet ruba krakova kako ne bi ispale iz uređaja. Zatvoreni krakovi imaju istu duljinu i širinu kao i otvoreni krakovi i sa 3 strane omeđeni su visokim vertikalnim zidovima (20 cm miševi, 30 cm štakori), pružajući tako sigurno okruženje životinji. Krakovi nemaju poklopce (22). Središnja zona je svojevrsno neutralno područje jer nije niti otvoreno niti zatvoreno te služi životinji kao područje procjene rizika (27). Valja naglasiti kako sama konstrukcija uređaja u određenim parametrima poput visine i širine, materijala (drvo, plastika, metal) i boje zidova (prozirni ili crno obojani) varira među laboratorijima (27).

### **Prikupljanje podataka**

Životinju se stavi u središnji, spojni kvadrant labirinta, glavom prema otvorenom kraku. Pusti ju se da u periodu od 5-10 minuta slobodno istražuje prostor uređaja. Glavni parametar od interesa u testu u uzdignutom labirintu u obliku znaka plus jest

aktivnost na anksioznim, otvorenim krakovima. Definiramo parametre u tri kategorije broj ulazaka, vrijeme i prijeđeni put u otvorenim kracima (22). Pritom se povećan broj ulazaka, produženo vrijeme boravka i dulji prijeđeni put u otvorenim kracima interpretira kao „manja anksioznost“ ili anksiolitički učinak kada se radi o lijeku (27). Također važno je uzeti u obzir i nekoliko sekundarnih parametara poput ukupne pređene udaljenosti i ukupnog broja prijelaza između sva četiri kraka kao potencijalna mjerila za lokomotorne nuspojave određenog anksiolitika (27). (sedacija – ↓lokomotorna aktivnost; psihostimulantni učinak – ↑lokomotorna aktivnost)

### **Vrijednost modela**

Pojavna vrijednost ovog modela je dobra. Ponašanjem poput „zamrzavanja“ i izbjegavanja nepoznatog, otvorenog i od tla uzdignutog prostora postignuta je analogija neofobiji (strah od novoga), agorafobiji (strah od otvorenog prostora) i akrofobiji (strah od visine) u ljudi (28). Prediktivna vrijednost ovog modela je zadovoljavajuća za benzodiazepine i 5-HT<sub>1A</sub> agoniste (20), ali je upitna za antidepresive (SSRI, SNRI i druge). Konstruktivna vrijednost modela je također upitna jer se temelji na normalnim, fiziološkim strahovima od nesigurnog, novog prostora ili od ozljeđivanja zbog skoka sa visine u inače zdravih životinja. Kod anksioznih poremećaja u ljudi strah i tjeskoba su patološki. Time biološki mehanizam u modelu ne odražava nužno biološki mehanizam anksioznog poremećaja (29).

### **4.2 Test otvorenog prostora**

Test otvorenog prostora (engl. „open field“ test) često je korišten u ispitivanjima na miševima i štakorima (22). Temelji se na činjenici da nepoznati, otvoreni i osvjetljeni prostor izaziva prirodni, nagoni strah u glodavaca (20).



Slika 7. Video snimka 4 miša istovremeno testiranih u 4 uređaja za test otvorenog prostora. Uređaji su od prozirnog pleksiglasa, bez poklopaca. Između uređaja vidi se labirint u obliku znaka plus koji je poslužio da se životinje ne vide i ne ometaju jedna drugu. Svaki uređaj je osvijetljen jednom lampom od 40W. Video kamera je na 2 m visine iznad dna uređaja. Tri miša na slici su se zadržavala u perifernoj zoni (1 kvadrat uz stijenku), a jedan miš je procjenjivao rizik naginjući se glavom iz periferne zone prema centralnoj, otvorenoj, nesigurnoj i anksioznoj zoni (3x3 kvadratića u sredini). Slika iz arhive pokusa izv.prof.dr.sc. Ante Tvrdeića, uz njegovo dopuštenje.

### Opis uređaja

Uređaj za test otvorenog prostora je ograničeni prostor koji u tlocrtu ima oblik kruga, elipse, kvadrata ili pravokutnika. Nema poklopca, ali zidovi uređaja su dostatne visine kako životinja ne bi mogla uteći iz njega. Podijeljen je virtualno (bez zidova) u dvije zone. Jedna zona je **periferna zona**, uza zid, širine dostatne da se životinja može okrenuti. Druga zona je **centralna zona**, nalazi se u sredini uređaja, znatno je veća površinom od periferne zone i bolje je osvijetljena. Ukupnom veličinom prostor



uređaja nadmašuje uobičajena staništa u kojima je testirana životinja obično smještena. Veličina uređaja u raznim laboratorijima varira ovisno o veličini ispitanika u rasponu od kutije za cipele (miš) pa sve do sobe (čovjek, čovjekoliki majmuni). Također varira intenzitet osvjetljenosti uređaja u rasponu od potpunog mraka do visokih intenziteta osvjetljenja (22,30). Variraju materijali od kojih je uređaj napravljen (drvo, pleksiglas, plastika, kaširani karton) i boje kojim su obojani zidovi (prozirni, obojani bijelo, sivo itd.).

### **Prikupljanje podataka**

Životinju se stavi u kut uređaja glavom prema zidu i pusti ju se da u periodu od 5-15 minuta slobodno istražuje uređaj. Anksiozna životinja tipično provodi znatno više vremena u perifernoj zoni uz zidove i malo pristupa istraživanju središnjeg, nesigurnog dijela uređaja. Sukladno tome veoma je važan početni smještaj životinje u uređaj. Kada ju se postavi u samo središte uređaja postoji rizik da životinja ostane nepomična na tom položaju ukoliko pokazuje visoke razine anksioznosti. Glavni parametri u ovome testu su broj ulaza, vrijeme provedeno u zoni i duljina prijeđenog puta u centralnoj zoni u središtu uređaja. Također važan parametar kod proučavanja potencijalnih lokomotornih nuspojava lijekova (sedacija, psihostimulacija) jest i ukupna prijeđena udaljenost u obje zone aparata (22).

### **Vrijednost modela**

Pojavna vrijednost ovog modela je dobra kao analogija neofobiji zbog izlaganja životinje novom nepoznatom prostoru i kao analogija agorafobiji zbog izlaganja otvorenom, nepokrivenom prostoru. Prediktivna vrijednost ovog modela je zadovoljavajuća za korištenje benzodiazepina, 5HT1A liganada (buspiron) i

propranolola (20). Konstruktivna vrijednost modela je upitna zbog istih razloga kao kod testa u uzdignutom labirintu oblika znaka plus (29).

### 4.3 Test u kutiji sa svijetlim i tamnim odjeljkom

Temelj ovog testa (engl. „light dark box“ ili „black white box“) je činjenica kako su glodavci primarno aktivni noću što je potpuna suprotnost ljudskom ponašanju.

Sukladno tomu ljudi izbjegavaju boravak u slabo osvijetljenom okruženju dok će glodavac izbjegavati dobro osvijetljeno područje (20,22).



Slika 8. Video snimka 2 miša istovremeno testiranih u 2 uređaja za test u kutiji sa tamnim i svijetlim odjeljkom. Tamni odjeljak je od crnog pleksiglasa (2 x5 kvadrata), ima prozirni poklopac i umetnut je u uređaj za test otvorenog prostora od prozirnog pleksiglasa (5x5 kvadrata). Na sredini tamnog odjeljka nalaze se vrata za slobodni prolaz u odjeljke. Svijetli odjeljak je osvijetljen lampom od 40W. Video kamera je postavljena na 2 m iznad dna uređaja. Miš u desnom uređaju na slici se zadržavao u tamnom, neanksioznom odjeljku, a miš u lijevom uređaju na slici je izišao iz tamnog odjeljka i istraživao je svijetli, anksiozni odjeljak. Slika iz arhive pokusa izv.prof.dr.sc. Ante Tvrdeića, uz njegovo dopuštenje.

## **Opis uređaja**

Sam uređaj sastoji se od 2 stvarna odjeljka odvojena zidovima. Svijetli je dobro osvijetljen (100-800 lumena), a tamni je crne boje i slabo osvijetljen (0-30 lumena) sa prolazom koji ih povezuje. Veličinom tamni odjeljak je podjednak ili manji od osvijetljenog, a ukupna površina uređaja je veća od uobičajenog staništa u kojem životinja boravi (20,22). Među laboratorijima variraju odnosi veličine tamnog i svijetlog odjeljka, prisutnost poklopca na tamnom odjeljku, materijali od kojih je uređaj napravljen (drvo, pleksiglas, plastika) i boje kojim su obojani zidovi svijetlog odjeljka (prozirni ili bijeli)

## **Prikupljanje podataka**

Životinju se stavi u tamni odjeljak pokriven poklopcem i sa zatvorenim prolazom među odjeljcima. Po otvaranju prolaza pusti ju se da u periodu od 5-10 minuta slobodno istražuje prostor uređaja. Početna pozicija igra ulogu time što ukoliko se glodavac postavi u dobro osvijetljeni odjeljak, te ukoliko pokazuje visoke razine anksioznosti postoji mogućnost životinja ostane nepomična i nikada ne kroči u „sigurno“ tamno područje. Ključni parametri za analizu u ovome testu su broj ulazaka, vrijeme provedeno i prevaljen put u nesigurnom, svijetlom i otvorenom odjeljku uređaja. Također, važno je zabilježiti i ukupnu prijeđenu udaljenost i broj prijelaza među odjeljcima kako bi se mogli iskoristiti kao potencijalna mjerila za lokomotorne nuspojave (sedacija, psihostimulacija) potencijalnih anksiolitika (22).

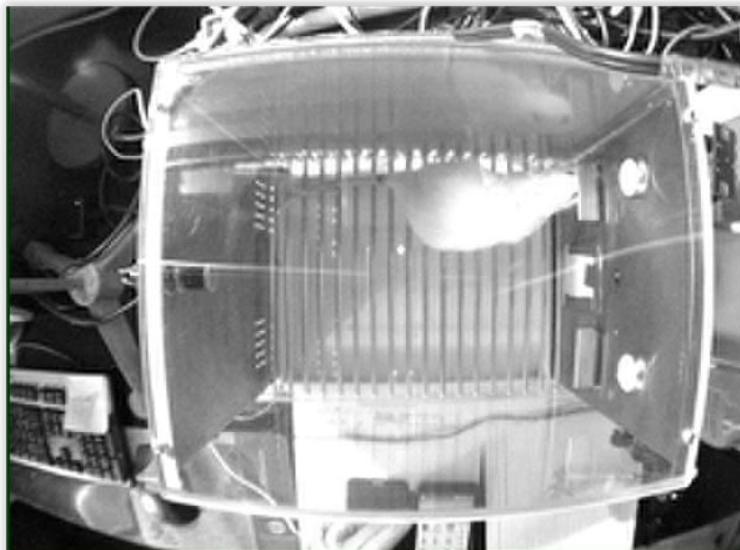
## **Vrijednost modela**

Pojavna vrijednost ovog modela je dobra kao analogija neofobiji i agorafobiji. Ovaj model pokazuje dobru prediktivnu vrijednost za benzodiazepine i 5HT1A ligande

(buspiron) (20). Konstruktivna vrijednost modela je upitna na isti način kao test u uzdignutom labirintu oblika znaka plus i kao test otvorenog prostora (29).

#### 4.4 Kondicionirani strah

Kod ovih testova (engl. „fear conditioning“) promatra se uvjetovani odgovor životinje na promjene u njenom okolišu odnosno poticaje, koji mogu biti pozitivni i negativni. Pozitivan poticaj ili nagrada povećava i vjerojatnost budućeg odgovora na taj podražaj, dok negativan poticaj smanjuje vjerojatnost budućeg odgovora na isti podražaj (25). U klasičnim kondicioniranim testovima upotrebljava se asocijacijsko učenje gdje se kondicionirani podražaj (zvuk, svjetlo ili kontekst) povezuje sa nekondicioniranim podražajem (neugodni udar struje na šape životinje). Učenjem asociiranja kondicioniranog podražaja i averzivnog stimulusa u fazi treninga postiže se da kondicionirani podražaj samostalno ishodi odgovor (25).



Slika 9. Štakor soja Wistar u komori za kondicioniranje tijekom testa kondicioniranja straha. Test kondicioniranja straha se odvija u 3 ili više faza, a faze su međusobno odvojene periodom od 24 sata. U prvoj fazi **habituacije na uređaj** cilj je da se štakor navikne na nepoznati prostor komore za kondicioniranje kako bi se izbjeglo

interferiranje neofobne reakcije sa kondicioniranjem straha. Druga faza je **kondicioniranje**. Štakor treba naučiti upariti kondicionirani stimulus (kontekst komore, zvučni ili svjetlosni signal) sa averzivnim, nekondicioniranim stimulusom (strujni udar na šape) što se očituje kao zamrzavanje (engl. "freezing"). To je defenzivno ponašanje sa niskim stavom na 4 šape (engl. "crouching") pri kojem se štakor ne pomiče i nema nikakvih pokreta glave, vrata, trupa, šapa ili repa, osim onih koji su vezani uz disanje. U trećoj fazi, **testnoj fazi ili prisjećanju** na kondicionirani stimulus, ako je uspješno uparen kondicionirani stimulus sa averzivnim stimulusom, štakor će prezentacijom kondicioniranog stimulusa, bez prezentacije averzivnog stimulusa, pokazivati intenzivno zamrzavanje u komori. Četvrta je **faza ekstinkcije prisjećanja** na kondicionirani stimulus. Faza je opcionalna, a cilj ove faze je da se izbriše sjećanje na averzivni stimulus i kondicionirani odgovor, opetovanom prezentacijom kondicioniranom stimulusu bez kazne. Slika iz arhive pokusa izv.prof.dr.sc. Ante Tvrdeića, uz njegovo dopuštenje.

### **Opis uređaja**

Uređaj se sastoji od komore za kondicioniranje (ENV-001; MED Associates, St. Albans, USA ili nekog drugog proizvođača) i elektrošokera (ENV414 S MED Associates, St. Albans, USA ili nekog drugog proizvođača) . Komora ima pod od metalnih rešetaka koje su spojene na elektrošoker, a aktiviranje šokera isporučuje nepredvidive udare struje na rešetke i šape životinje koje su u dodiru sa rešetkama. Prednji, stražnji zid i krov komore su od prozirnog pleksiglasa što omogućuje snimanje video kamerom i promatranje životinje golim okom. Bočni zidovi su metalni. Komore su osvijetljene žutim svjetlom slabijeg intenziteta izvana ili iznutra. Sama

unutrašnjost komore može biti kondicionirani stimulus kod kondicioniranja straha na kontekst (engl. „context fear conditioning“). Komora za kondicioniranje može imati zvuk i/ili svjetla za kondicioniranje straha na zvučni ili svjetlosni signal (engl. „cued fear conditioning (20,30)).

### **Prikupljanje podataka**

Podaci se prikupljaju izravnom opservacijom ispitivača ili video nadzorom uz upotrebu posebnog softvera za pokuse kondicioniranja. Postupci koji su opisani u tekstu dalje su standardni protokol za kondicioniranje straha u kontekstu koji se koristi na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Protokoli kondicioniranja straha variraju među laboratorijima u broju faza kondicioniranja, duljini trajanja pojedine faze i načinu prikupljanja parametara kondicioniranja

Ukratko, u habituaciji na komoru za kondicioniranje štakora se stavi u komoru da ju 10 minuta slobodno istražuje. U fazi kondicioniranja od 12 minuta po životinji, štakora se opet stavi u komoru za kondicioniranje, zatvore se vrata komore i aktivira se štoperica. Točno u trećoj, šestoj i devetoj minuti štakoru se udijeli blagi, ali neugodni (0,8 mA) i kratki (1 sekunda) udar struje na šape. Svakih 3 minute se kumulativno bilježi zamrzavanje. Testna faza ili prisjećanje na kondicionirani stimulus traje 8 minuta po životinji. Štakora se stavi ponovno u komoru za kondicioniranje, uključi štopericu i svakih 2 minute se kumulativno bilježi zamrzavanje, ali ovaj puta bez primjene udara struje na šape. U fazi ekstinkcije od 8 minuta po štakoru, životinju se stavi opet u komoru za kondicioniranje, uključi štopericu i svakih 2 minute se kumulativno bilježi zamrzavanje, ponovno bez primjene udara struje na šape. Po isteku svake faze testa štakora se vadi iz komore i vraća ga se u kućni kavez. Između dva štakora komora se čisti od urina i fecesa i prebriše iznutra 70% etanolom da se uklone mirisi. Glavni parametri svih faza testa su broj epizoda

zamrzavanja i vrijeme trajanja zamrzavanja (mjere se kumulativno) te latencija do prve pojave zamrzavanja. U fazi habituacije obično ima malo ili ništa zamrzavanja. Intenzivnije zamrzavanje se može izmjeriti, ako se koriste anksiozniji sojevi štakora ili miševa. U fazi kondicioniranja parametri zamrzavanja se intenziviraju u promatranim vremenskim periodima u odnosu na prvi trominutni period bez šoka, ali i ukupno (↑broj epizoda, ↑trajanje, ↓latencija zamrzavanja). U testnoj fazi/prisjećanju na kondicionirani stimulus, ako je uspješno uparen kondicionirani stimulus sa averzivnim stimulusom (udar na šape) parametri zamrzavanja (broj epizoda, trajanje, kratke latencije zamrzavanja) ostaju na visokoj razini kao u fazi kondicioniranja i u promatranim vremenskim periodima i ukupno. Kod faze ekstinkcije pak dolazi do brisanja prisjećanja na averzivni stimulus i smanjenja uvjetovanog odgovora (↓broj epizoda, ↓trajanje, ↑latencije zamrzavanja) u odnosu na fazu kondicioniranja ) sa svakim ponovnim izlaganjem kondicioniranom stimulusu (kontekst, zvuk ili svjetlo) u komori za kondicioniranje. Višestrukim, opetovanim izlaganjima kondicioniranom stimulusu može doći do potpune ekstinkcije prisjećanja na averzivni stimulus, što je baza za bihevioralnu terapiju PTSP u ljudi. Kondicionirani strah i zamrzavanje se može reinstalirati ponovnim uvođenjem faze kondicioniranja. Anksioznost je u ovim testovima to veća što su epizode zamrzavanja dulje i u promatranim vremenskim periodima i ukupno (kao zbroj svih zamrzavanja), što je broj epizoda zamrzavanja veći i što su latencije do prvog zamrzavanja kraće. Anksiolitici djeluju suprotno kod kondicioniranja i prisjećanja (↓broj epizoda, ↓trajanje, ↑latencije zamrzavanja), a mogu i ubrzati ekstinkciju.

### **Vrijednost modela**

Pojavna vrijednost ovog modela je dobra kao analogija za PTSP zbog sposobnosti da se kondicionirani podražaj poveže s traumatskim nekondicioniranim podražajem i

tako izazove anksiozno ponašanje (31). Prediktivna vrijednost ovog modela dobra je za uporabu benzodiazepina, 5HT1A liganada (buspiron) i SSRI antidepresiva (20). Model kondicioniranog straha pokazuje dobru konstruktivnu vrijednost, a mehanizmi kondicioniranog straha i anksioznosti dobro su opisani u literaturi sa anatomskog i neurokemijskog stanovišta (32).



## **5. "TRAJNI", STABILNI ILI KRONIČNI MODELI NALIK NA ANKSIOZNOST**

Trajni modeli nalik na anksioznost imaju stabilne, odnosno trajne karakteristike obzirom na razvoj anksioznosti u vremenu (33). Nalikuju patološkom strahu/anksioznosti jer su životinje anksiozne prije i nakon testiranja na anksioznost. Prema načinu na koji je postignuto stanje kronične anksioznosti razlikujemo nekoliko različitih tipova trajnih modela nalik na anksioznost: genetske modele, kemijski inducirane modele i stresom inducirane modele.

### **5.1 Trajni modeli nalik na anksioznost izazvani genetskim ili kemijskim manipulacijama**

Genetskim manipulacijama srođivanja unutar jednog soja životinja, srođivanja po specifičnim fenotipskim ili drugim karakteristikama i stvaranjem transgeničnih životinja (isključivanjem ili nokautom gena te prekomjernom ekspresijom gena) omogućeno nam je dobivanje pokusnih životinja specifičnih fenotipskih i genotipskih karakteristika. Na primjer, srođeni sojevi (inbred, genetski homogeni) miševa Balb/CJ i DBA2/J u istraživanju ponašanja 33 različita soja miševa u testu otvorenog prostora bili su među 20% sojeva s najanksioznijim fenotipom (34). Srođivanjem životinja sa specifičnim osobinama ponašanja možemo postići sojeve sa željenim fenotipskim osobinama, poput anksioznog HAB modela, normalno anksioznog NAB i nisko anksioznog LAB modela miševa razvijenog na Max-Planck Institutu za Psihijatriju u Muenchen-u (35). Anksiozno ponašanje kod HAB miševa, normalno kod NAB miševa i neanksiozno u LAB miševa određeno je njihovim ponašanjem u testu uzdignutog labirinta oblika znaka plus. Njihov fenotip stabilan je u odnosu na spol, dob i period godine te potvrđen u više Europskih laboratorija (35). Prediktivna vrijednost ovih modela je značajna i anksiolitici su se pokazali kao efektivni u kontroli

ponašanja HAB fenotipa (35). Najvažniji genetski inducirani modeli danas su transgenične životinje, tj. umjetno stvorene mutacije isključivanjem određenog gena važnog za razvoj straha/anksioznosti iz genetskog repertoara štakora ili miša. Kao primjer navesti ću miševe sa nokautiranim genom za 5-HT<sub>1A</sub> receptore. Zbog izbacivanja 5-HT<sub>1A</sub> podtipa serotonergičkog receptora, čija je uloga u modulaciji anksioznosti u ljudi i životinja dobro istražena, miševi tog soja pokazuju smanjenu aktivnost u situacijama nalik stresu u usporedbi sa miševima divljeg tipa što ukazuje na postojanje anksioznog fenotipa (36). 5HT1A nokaut miševi rezistentni su na anksiolitike koji djeluju putem 5HT1A receptora, poput buspirona. Ipak, najzanimljiviji transgenični model nalik na anksioznost sa stanovišta etiopatologije i farmakologije anksioznosti su štakori i miševi sa nokautom gena za membranski prijenosnika serotonina (SERT). Štakori i miševi sa nokautom SERT gena imaju hiperserotonergički fenotip u regijama mozga odgovornim za anksioznost i anksiozni fenotip ponašanja u različitim testovima za anksioznost (uzdignuti labirint u obliku znaka plus, otvoreni prostor, socijalna anksioznost, kondicionirani strah) (37). To je takozvani serotoninski paradoks. Naime, dok u ljudi inhibitori SERT poput fluoksetina podižu razinu koncentracije 5HT u mozgu i imaju anksiolitički učinak, kod životinja sa nokautiranim SERT genom životinje imaju visoku razinu serotonina u mozgu, ali se ponašaju anksiozno. Naravno, štakori i miševi sa nokautom SERT gena su rezistentni na anksiolitičko djelovanje SSRI antidepressiva. Kao takav, ovaj model ima veliku pojavnu, prediktivnu i konstruktivnu vrijednost. Kada govorimo o kemijski induciranim modelima, možemo razlikovati modele temeljene na modifikaciji unosa prehrambenih tvari te modele bazirane na farmakološkoj manipulaciji. Primjer modela koji je posljedica modificiranog unosa prehrambenih tvari je deficit magnezija. Miševi se u tom modelu hrane peletima koji imaju 10% normalnog

dnevnog unosa magnezija. Hranjeni smanjenom količinom magnezija, miševi razvijaju anksiozno ponašanje (38). Primjeri lijekovima inducirane anksioznosti su miševi kojima se kronično primjenjuje injekciju kortikosterona svaki dan ili miševi kod kojih se izazove ovisnost o benzodiazepinima višednevnom primjenom injekcije benzodiazepina, a onda se obustavi davanje benzodiazepina i izazove apstinencijski sindrom. Jedan od klasičnih znakova apstinencijskog sindroma sa benzodiazepinima u ljudi je anksioznost. I ovi modeli imaju pojavnu vrijednost jer nalikuju anksioznosti u ljudi, imaju prediktivnu vrijednost u testovima za anksiolitike i imaju dodanu konstruktivnu vrijednost jer imitiraju patofiziologiju stresa i ovisnosti u ljudi (39).

## **5.2 Trajni modeli nalik na anksioznost izazvani stresom**

Više studija pokazuje kako stresno iskustvo tokom života pridonosi razvoju i patogenezi anksioznosti. Aktivacija hipotalamo-hipofizno-adrenalne osi pratnja je velikom broju simptoma anksioznosti i promjenama hormonalnog statusa u stresnim situacijama (25). Među modelima za anksioznost izazvanih stresom važni su modeli ranog životnog stresa, posebno stresa odvajanja mladunčeta od majke i legla (model analogan separacijskoj anksioznosti u djece) i stresa socijalne izolacije u mladunca (mladunci se od normalnog odvajanja od majke sa 3-4 tjedna do odraslog doba od 2-3 mjeseca drže izolirani u kavezu, bez drugih životinja). Rani životni stres uvelike utječe na kasniju kvalitetu života i rizičan je čimbenik za razvoj anksioznog ponašanja u odrasloj dobi (25). U odraslih životinja postoji i stres socijalnog poraza. Novi mužjak koji je uljez dovodi se u stanište domicilnog mužjaka te se promatra period koji uljez provodi u podređenom položaju u odnosu na domicilnog mužjaka (engl. resident-intruder test). Kombinacijom stresora sa kroničnim nepredvidljivim modelom stresa, gdje se na dnevnoj bazi nasumično izmjenjuju razni stresori, sprječava se adaptacija na stres vidljiva u drugim modelima, time ovaj model

pokazuje dobru prediktivnu i pojavnu vrijednost i kvalitetnije predstavlja stresore koje čovjek svakodnevno može susresti (25). U grupu stresom izazvanih modela nalik na anksioznost ubraja se i kronični stres uslijed izlaganja predatoru. Glodavac (miš ili štakor) se opetovano, tijekom dužeg perioda izlaže anesteziranom živom predatoru (mačka, lisica) ili njegovom mirisu mokraće i fecesa (20,25). U svim ovim modelima životinje izložene stresu pokazuju fiziološke (porast krvnog tlaka, ubrzani rad srca, porast tjelesne temperature), biokemijske znake stresa (porast kortizola, noradrenalina u krvi, povećana težina nadbubrežne žlijezde) i bihevioralni znake anksioznosti (u testu uzdignutog labirinta, testu otvorenog prostora i drugim testovima za anksioznost).

### **5.3 Wistar Zagreb 5HT štakori (WZ-5HT) sublinija visoki serotonin - primjer „trajnog” modela nalik na anksioznost izazvan genetičkom manipulacijom**

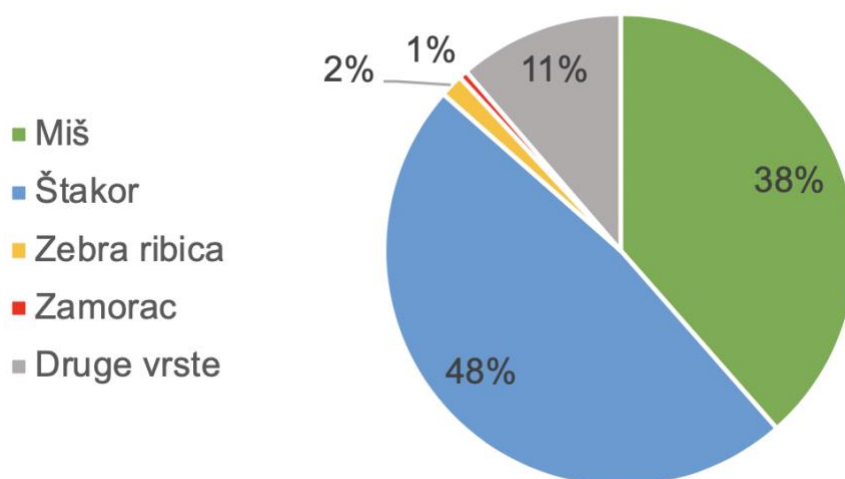
Na temelju srođivanja Wistar štakora sa ekstremno visokim i onih sa ekstremno niskim razinama perifernog serotonina u trombocitima kroz više od dvadesetak generacija, na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu uzgojene su dvije sublinije WZ-5HT štakora, sublinija WZ-5HT visoki sa visokim trombocitnim serotoninom i sublinija WZ-5HT niski sa niskim trombocitnim serotoninom (40). Sublinija WZ-5HT visoki serotonin pokazala je više anksioznog ponašanja u nekoliko različitih testova za anksioznost (test u uzdignutom labirintu oblika križa, otvoreni prostor, test socijalne interakcije, test zatrpavanja pikula, kondicioniranje straha), nižu razinu istraživačkog nagona (test otvorenog prostora) i manju impulzivnost/inhibirani temperament (test emergencije iz otvorenog prostora) u usporedbi sa sublinijom WZ-5HT niski serotonin (40). Ova opažanja u subliniji visoki serotonin na štakorima nalikuju u znatnoj mjeri opažanjima vidljivima na miševima sa delecijom SERT gena, koji su također predominantno pokazivali povišene razine anksioznog ponašanja (41).

## **6. RAZLIČITE VRSTE POKUSNIH ŽIVOTINJA KAO MODELI ZA PONAŠANJE NALIK NA ANKSIOZNOST**

### **6.1 Koje se vrste pokusnih životinja najčešće koriste kao model za istraživanje u pokusima ponašanja nalik na anksioznost? PubMed pretraga literature.**

Pregledom baze PubMed za znanstvene članke (limitator „journal articles“) na datum 24. lipnja 2020. godine koristeći termine „Anxiety and x“ gdje x predstavlja naziv vrste životinje („rats“ za štakore, „mice“ za miševе, „zebrafish“ za zebra ribice, „guinea pigs“ za zamorce, „animals“ za ukupni broj članaka), uočeno je da najveći broj članaka koristi štakore s 14680 (u razdoblju od 1946. do 2020. godine) i miševе s 11789 (u razdoblju od 1951. do 2020. godine) objavljenih znanstvenih članaka, čineći tako 26469 (87%) od ukupno 30600 (u razdoblju od 1946. do 2020. godine) objavljenih znanstvenih članaka. Zebra ribica s 484 ( u razdoblju od 2003. do 2020. godine) i pogotovo zamorci s 200 PubMed pogodaka (u razdoblju od 1952. do 2020. godine), u ovom trenutku imaju skroman udio u ukupnom broju znanstvenih članaka. Međutim, zbog određenih prednosti Zebra ribice kao modela i legislative koja limitira upotrebu glodavaca u znanstvenim pokusima u EU i svijetu, ubrzan je porast broja članka u PubMed bazi sa ključnim riječima anksioznost i Zebra ribica sa 36 u 2014. godini na 92 u 2019. godini.

Na slici 10 grafički je prikazan postotni udio različitih vrsta pokusnih životinja koje su korištene kao modeli za ponašanje nalik na anksioznost u publiciranim znanstvenim člancima pronađenim pretraživanjem PubMed baze kako je gore opisano.



Slika 10. Postotni udio različitih vrsta pokusnih životinja kao modela za anksioznost u publiciranim znanstvenim člancima.

## 6.2 Zebra ribica u istraživanju ponašanja nalik na anksioznost. Zašto ju trebamo koristiti?

Odrasle zebra ribice (*Danio rerio*) se zadnjih deset godina sve češće koriste kao model u neurobihevioralnim istraživanjima (42).

### Opće prednosti modela zebra ribice

Kao kralježnjak zebra ribica posjeduje znatnu genetsku i fiziološku sličnost sa sisavcima, sadrži sve glavne neurotransmitere, hormone i receptore. Genom joj je sekvencioniran i ima visoku homologiju sa humanim genomom (80-85%). Jeftina je za uzgoj i nabavku u odnosu na glodavce. U odnosu na glodavce zebra ribica je evolucijski niži kralježnjak, što znači da ih je etičnije koristiti za pokuse od glodavaca i lakše je dobiti etičku dozvolu za istraživanje. Postoje različiti sojevi zebra ribica, a također i dobar izbor transgeničnih ribica sa nokautiranim genima važnim za

neurobihevioralna i farmakološka istraživanja. Nakon rođenja ubrzo pokazuju bazičnu lokomotornu funkciju te su kao takve pogodne za paralelne analize velikog broja jedinki i dobivanje velikog broja podataka za genetska istraživanja i istraživanja razvoja novih lijekova (42). Odrasle jedinke pokazuju velik broj kompleksnih obrazaca ponašanja, uključujući učenje, socijalne i afektivne odgovore, što omogućuje translaciju rezultata istraživanja nekih moždanih poremećaja sa zebra ribice na sisavce i ljude. Također, zebra ribica posjeduje razvijen motorni, osjetni i endokrini sustav i visoku osjetljivost na podražaje iz okoliša (42). Lijekove je lako primijeniti za sistemski učinak injekcijom intramuskularno ili u vodu u kojoj zebra pliva, za apsorpciju putem škrga. Lako i brzo ju se anestezira u ledeno hladnoj vodi.

### **Specifične prednosti zebra ribice kao modela za istraživanje anksioznosti**

Za zebra ribicu su uspješno adaptirani i farmakološki ispitani bihevioralni testovi koji se tradicionalno koriste na glodavcima. Među njima su podvodne verzije testa sa svijetlim i tamnim odjeljkom i test otvorenog prostora. Koriste se zbog njihove jednostavnosti te mogućnosti istraživanja prirodene sklonosti ribice istraživanju novog ili izbjegavanju nepoznatog okruženja (43). Za test sa svijetlim i tamnim odjeljkom u zebra ribice uočeno je da za razliku od glodavaca, ukoliko im se pruži izbor, zebra ribice preferiraju boravak u svijetlom odjeljku te pokazuju izbjegavanje mračnog područja (43). Istraživanjem je dokazano da administracijom anksiolitika koji se koriste u ljudi dolazi do smanjenja u izbjegavanju mračnog odjeljka u zebra ribica, što potvrđuje mišljenje da je to ponašanje koje nalikuje na anksioznost u glodavaca i ljudi (43). Kod testa otvorenog prostora proučava se reakcija jedinke na novi akvarij gdje se sukobljavaju nagon za potragom hrane ili partnera sa potencijalnom opasnosti od mogućeg predatora. Budući da zebra ribice potiču iz plitkih rijeka i potoka Indije, one traže sigurnost blizu dna akvarija, a izbjegavaju

nesigurne, površinske slojeve vode od kuda im prijete predatori (ptice i drugi). Takvo ponašanje izbjegavanja evolucijski je očuvano među vrstama, uključujući i glodavce te čini zebra ribicu vrlo dobrim dopunskim pa i zamjenskim translacijskim modelom za glodavce (43).



Slika 11. Zebra ribica (*Danio rerio*)

Ketchum L. Oregon State University, Corvallis, OR, The United States of America.

Zebrafish (slika s Interneta). 14.03.2013. (pristupljeno 24.06.2020.) Dostupno na

<https://www.flickr.com/photos/oregonstateuniversity/26436913602>

## Ograničenja

Posljednji zajednički predak zebra ribice i čovjeka postojao je prije 445 milijuna godina što ju čini daleko udaljenijom od ljudi u usporedbi sa nekim drugim modelima poput glodavaca kod kojih se evolucijski razlaz sa ljudima procjenjuje na razdoblje



pred 96 milijuna godina (43). Također zebra ribica je egzoterman organizam sa drugim značajnim anatomskim razlikama što za neke primjene otežava ili ponekad u potpunosti onemogućuje stvaranje modela prema ljudima (43). Zebra ribica pokazuje i duplikacije genoma što otežava pronalazak funkcija određenih gena zbog postojanja višestrukih kopija istog gena (43). Morfologija mozga zebre ribice je bitno drugačija u odnosu na čovjeka. Mozak joj je mali pa je disekcija moždanih regija manualno zahtjevna i ne ide bez mikroskopa. Također vrlo je zahtjevna precizna primjena lijekova u moždano tkivo, u slučaju da testirani lijek ne prolazi barijeru - krv mozak i ne može se primijeniti na drugi način.

## 7. Zaključci

Modeli u kojima se koriste pokusne životinje za testiranje ponašanja nalik na anksioznost u ljudi su dobra metoda za istraživanje patofiziologije i farmakologije anksioznih poremećaja. Za svaki model poznata je pojava, prediktivna i konstruktivna vrijednost kojima je definirana njegova vrijednost u analizi određenog poremećaja iz spektra anksioznih poremećaja i terapijskih opcija koje su na njemu primjenjive. Imamo dobar izbor trenutnih/prolaznih/akutnih modela koji se koriste za analizu akutnih situacija gdje je anksioznost provocirana specifičnom situacijom i nalikuje pretjeranom nepatološkom strahu ili anksioznosti. Također, imamo dobar izbor trajnih/stabilnih modela pomoću kojih proučavamo nenormalni, patološki strah i anksioznost izazvan određenim kemijskim čimbenicima, utjecaju stresa ili genetskoj predispoziciji. Kao modeli tradicionalno se najčešće koriste glodavci, prije svih štakori i miševi. Analizom broja publiciranih članaka iz PubMed baze vidljivo je da i dalje najviše koriste štakori i miševi. Međutim zbog legislative, etičkih razloga i većih troškova istraživanja tradicionalni modeli na glodavcima sve se više zamjenjuju jednostavnijim poput zebra ribice.

## **Zahvale**

Zahvaljujem svojem mentoru prof. Anti Tvrdeiću na velikom trudu, savjetima, pomoći i strpljenju u izradi ovog rada.

Hvala mojoj obitelji - ocu Zdravku, majci Kseniji, bratu Jan Karlu i prijatelju Luki što su bili uz mene i vjerovali kada je bilo najteže, za svu pomoć i strpljenje, te što su mi bili velika podrška tokom studija.

Za kraj hvala Mati i Lali što su uvijek bili izvor veselja kada je to bilo najpotrebnije.

## Literatura

1. Jakovljević M. Anksiozni poremećaji. U: Begić D, Jukić V, Medved V, ur. Psihijatrija. Zagreb: Medicinska naklada; 2015. Str. 183-195
2. Wittchen H.U., Jacobi F., Rehm J., Gustavsson A., Svensson M., Jönsson B., Olesen J. i sur., ECNP/EBC REPORT 2011 The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. Eur Neuropsychopharmacol 2011;21;655-79.
3. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-5. 5. izd. Arlington, VA, American Psychiatric Association, 2013.
4. World Health Organization. The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders. (Internet) WHO 2010. (pristupljeno 23.06.2020.). Dostupno na: <http://www.who.int/classifications/icd/en/bluebook.pdf>
5. Jukić V. Reakcije na teški stress, posttraumatski stresni poremećaj i poremećaji prilagodbe. U: Begić D, Jukić V, Medved V, ur. Psihijatrija. Zagreb: Medicinska naklada; 2015. Str. 199-211
6. Hyman S.E., Cohen J.D. Disorders of mood and anxiety. U: Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M., Siegelbaum S.A., Hudspeth A.J., ur. Principles of neural science. 5. izd. New York: McGraw-Hill; 2013. Str. 1402-1424
7. Stahl S.M. Anxiety disorders and anxiolytics. U: Stahl S.M. Stahl's essential psychopharmacology: neuroscientific basis and practical applications. 4. izd. Cambridge: Cambridge University Press; 2013. Str. 388-420

8. Nuss P. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2015;11:165-175.  
doi:10.2147/NDT.S58841
9. Linsambarth S., Moraga-Amaro R., Quintana-Donoso D., Rojas S., Stehberg J. The Amygdala and Anxiety U: Ferry B. ur. *The Amygdala - Where Emotions Shape Perception, Learning and Memories.* London: IntechOpen; 2017. Str. 139-171
10. Smith RJ, Aston-Jones G. Noradrenergic transmission in the extended amygdala: role in increased drug-seeking and relapse during protracted drug abstinence. *Brain Struct Funct.* 2008;213(1-2):43-61. doi:10.1007/s00429-008-0191-3
11. Judaš M., Kostović I. *Temelji neuroznanosti.* Zagreb: MD; 1997.
12. Kaur S., Singh, R. Role of different neurotransmitters in anxiety: A systemic review. *Int J Pharm Sci Res* 2017;8(2):411-21. doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.8(2).411-21.
13. Zarrindast M.R., Khakpai F. The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior. *Arch Iran Med.* 2015;18(9):591-603.
14. Anonimni autori, The Teaching Resource Centre Pharmacology Database (Internet) Leiden University Medical Center, The Netherlands. 1990- (pristupljeno 30.05.2020.) Dostupno na: <https://coo.lumc.nl/TRC/default.aspx?direct=true>
15. Trevor J.A. Sedative-Hypnotic drugs. U: Katzung B.G. ur. *Basic and clinical pharmacology.* 14. izd. New York: McGraw-Hill; 2017. Str. 381-395
16. Howland R.H. Buspirone: Back to the Future. *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv.* 2015;53(11):21-24. doi:10.3928/02793695-20151022-01

17. Wilson T.K., Tripp J. Buspirone. U: StatPearls (Internet). Treasure Island, FL, : StatPearls Publishing; 2020 Jan- (pristupljeno 23.06.2020.) Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531477/>
18. Steenen S.A., van Wijk A.J., van der Heijden G.J., van Westrhenen R., de Lange J., de Jongh A. Propranolol for the treatment of anxiety disorders: Systematic review and meta-analysis. *J Psychopharmacol.* 2016;30(2):128-139. doi:10.1177/0269881115612236
19. Belzung C., Lemoine M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biol Mood Anxiety Disord.* 2011;1(1):9. doi:10.1186/2045-5380-1-9
20. Cryan J.F., Sweeney F.F. The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. *Br J Pharmacol.* 2011;164(4):1129-1161. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01362.x
21. Grillon C., Robinson O.J., Cornwell B., Ernst M. Modeling anxiety in healthy humans: a key intermediate bridge between basic and clinical sciences. *Neuropsychopharmacology.* 2019;44(12):1999-2010. doi:10.1038/s41386-019-0445-1
22. Bouwknecht J.A. Behavioral studies on anxiety and depression in a drug discovery environment: keys to a successful future. *Eur J Pharmacol.* 2015;753:158-176. doi:10.1016/j.ejphar.2014.09.051
23. Neumann I.D., Wegener G., Homberg J.R., Cohen H., Slattery D.A., Zohar J. i sur. Animal models of depression and anxiety: What do they tell us about human condition?. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011;35(6):1357-1375. doi:10.1016/j.pnpbp.2010.11.028

24. Goes T.C., Antunes F.D., Teixeira-Silva F. Trait and state anxiety in animal models: Is there correlation?. *Neurosci Lett.* 2009;450(3):266-269.  
doi:10.1016/j.neulet.2008.11.037
25. Campos A.C., Fogaça M.V., Aguiar D.C., Guimarães F.S. Animal models of anxiety disorders and stress. *Braz J Psychiatry.* 2013;35(Suppl2):S101-S111.  
doi:10.1590/1516-4446-2013-1139
26. Maximino C., van der Staay F.J. Behavioral models in psychopathology: epistemic and semantic considerations. *Behav Brain Funct* 2019;15(1):1-11  
doi:10.1186/s12993-019-0152-4
27. Andrews N.A., Papakosta M., Barnes N.M. Discovery of novel anxiolytic agents-- the trials and tribulations of pre-clinical models of anxiety. *Neurobiol Dis.* 2014;61:72-78. doi:10.1016/j.nbd.2013.10.006
28. Wolf A.A., Frye C.A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2007;2(2):322-328.  
doi:10.1038/nprot.2007.44
29. Garner J.P. The significance of meaning: why do over 90% of behavioral neuroscience results fail to translate to humans, and what can we do to fix it?. *ILAR J.* 2014;55(3):438-456. doi:10.1093/ilar/ilu047
30. Shoji H., Takao K., Hattori S., Miyakawa T. Contextual and cued fear conditioning test using a video analyzing system in mice. *J Vis Exp.* 2014;(85):50871.  
doi:10.3791/50871
31. Freudenberg F., O'Leary A., Aguiar D.C., Slattery D.A. Challenges with modelling anxiety disorders: a possible hindrance for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2018;13(4):279-281. doi:10.1080/17460441.2018.1418321

32. Davis M., Walker D.L., Lee Y. Roles of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex. Possible relevance to PTSD. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;821:305-331. doi:10.1111/j.1749-6632.1997.tb48289.x
33. Gidron Y. Trait Anxiety. U: Gellman M.D., Turner J.R., ur. *Encyclopedia of Behavioral Medicine.* New York, NY, Springer, 2013. Str. 1989-1990
34. Miller B.H., Schultz L.E., Gulati A., Su A.I., Pletcher M.T. Phenotypic characterization of a genetically diverse panel of mice for behavioral despair and anxiety. *PLoS One.* 2010;5(12):e14458. doi:10.1371/journal.pone.0014458
35. Wegener G., Mathe A.A., Neumann I.D. Selectively bred rodents as models of depression and anxiety. *Curr Top Behav Neurosci.* 2012;12:139-187. doi:10.1007/7854\_2011\_192
36. Groenink L., Pattij T., De Jongh R., Van der Gugten J., Oostings R.S., Dirks A., i sur. 5-HT<sub>1A</sub> receptor knockout mice and mice overexpressing corticotropin-releasing hormone in models of anxiety. *Eur J Pharmacol.* 2003;463(1-3):185-197. doi:10.1016/s0014-2999(03)01281-0
37. Homberg J.R., Olivier J.D.A, Smits B.M.G., Mul J.D., Mudde J., Verheulck M., i sur. Characterization of the serotonin transporter knockout rat: a selective change in the functioning of the serotonergic system. *Neurosci* 2007;146:1662–1676
38. Sartori S.B., Whittle N., Hetzenauer A., Singewald N. Magnesium deficiency induces anxiety and HPA axis dysregulation: modulation by therapeutic drug treatment. *Neuropharmacology.* 2012;62(1):304-312. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.07.027
39. Lee B., Sur B., Kwon S., Yeom M., Shim I., Lee H., i sur. Chronic administration of catechin decreases depression and anxiety-like behaviors in a rat model using



chronic corticosterone injections. *Biomol Ther (Seoul)*. 2013;21(4):313-322.

doi:10.4062/biomolther.2013.004

40. Cicin-Sain L., Jernej B. Wistar–Zagreb 5HT rats: A rodent model with constitutional upregulation/downregulation of serotonin transporter. U: Kalueff A., LaPorte J., ur. *Experimental Models in Serotonin Transporter Research*. Cambridge: Cambridge University Press; 2010. Str. 214-243  
doi:10.1017/CBO9780511729935.008
41. Kalueff A.V., Fox M.A., Gallagher P.S., Murphy D.L. Hypolocomotion, anxiety and serotonin syndrome-like behavior contribute to the complex phenotype of serotonin transporter knockout mice. *Genes Brain Behav*. 2007;6(4):389-400.  
doi:10.1111/j.1601-183X.2006.00270.x
42. Cachat J., Stewart A., Utterback E., Hart P, Gaikwad S., Wong K. i sur., Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. *PLoS One*. 2011;6(3):e17597. doi:10.1371/journal.pone.0017597
43. Ali S., Champagne D.L., Spaink H.P., Richardson M.K. Zebrafish embryos and larvae: a new generation of disease models and drug screens. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2011;93(2):115-133. doi:10.1002/bdrc.20206
44. Ketchum L. Oregon State University, Corvallis, OR, The United States of America. Zebrafish (slika s Interneta). 14.03.2013. (pristupljeno 24.06.2020.)  
Dostupno na <https://www.flickr.com/photos/oregonstateuniversity/26436913602>

## Životopis

### OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Tin Luka Petanjek

Datum i mjesto rođenja: 19. prosinca 1996. Zagreb

### OBRAZOVANJE:

- 2014 - 2020: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- 2010 - 2014: VII. Gimnazija Zagreb
- 2003 - 2010: OŠ August Šenoa Zagreb
- 01. - 06. 2003: Ecole Francaise de Zagreb
- 09. - 12. 2002: Ecole Mixte Grand Saint Giniez Marseille

### OSOBNNE VJEŠTINE

- Strani jezici: Francuski, Engleski, Talijanski, Njemački

### OSTALE AKTIVNOSTI:

- Demonstrator na zavodu za Anatomiju od ak. godine 2015./16. do 2019./20.
- Demonstrator na zavodu za Fiziologiju u ak. godini 2016./17.