



## Deney Hayvanlarında Anksiyete Çalışmaları

Aynur KOÇ<sup>1\*</sup> Z. Işık SOLAK GÖRMÜŞ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hitit Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Çorum

<sup>2</sup>Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Konya

\*Sorum Yazar

E-posta: aynrkoc@gmail.com

Geliş Tarihi : 05 Kasım 2018

Kabul Tarihi: 11 Aralık 2018

### Özet

Anksiyete ve korku, canlıların tehlike durumlarında gösterdiği savunma davranışından kaynaklanan duygusal durumlardır. Anksiyete ve strese bağlı bozukluklar günlük yaşam aktivitelerini ciddi şekilde etkilemektedir. İnsan ve hayvanların duygularını ifade ediş şekillerinde benzerliklerin gözlemlenmesi, psikiyatrik bozuklukların memeli hayvanlarda (başlıca kemirgenlerde) çalışılabilme olasılığının doğmasına neden olmuştur. Psikopatoloji için hayvan modelleri, hastalık semptomlarının homologlarını meydana getiren genetik, çevresel veya farmakolojik nedenlerin analizinde paha biçilmez araçlardır. Stres etkilerinin etik ve diğer benzer sebeplerle insanlarda çalışılmadığı durumlarda hayvan modelleri yardımcıdır. Anksiyete modelleri, anksiyolitik yeni ajanların keşfedilmesi ve anksiyete bozukluklarının altında yatan mekanizmaların araştırılması için oldukça faydalıdır. Çalışmayı kurgularken, çalışmanın amacına hangi modelin ve testlerin uygun olduğunu belirlemek, uygun hayvanların seçimi, modelin geçerliliği ve güvenilirliği hakkında bilgi sahibi olmak önemlidir. Bu çalışmada yaygın kullanılan deneysel anksiyete modelleri ve anksiyetenin değerlendirilmesinde kullanılan davranışsal testlerin incelenmesi amaçlanmıştır. Anksiyete modellerini konu edinen bilimsel çalışmalarda kullanılan hayvanlar çoğunlukla fareler ve sıçanlar olduğundan, burada da model ve davranış testleri bu hayvanlar üzerinden açıklanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Anksiyete modelleri, deney hayvanları, davranış testleri

## Anxiety Studies In Experimental Animals

### Abstract

Anxiety and fear are emotional states that arise from the defensive behavior of the organism in dangerous situations. Anxiety and stress related disorders are psychiatric conditions that seriously affect daily activities. Observation of the similarities in the expression of emotions between human and animals has led to the possibility that psychiatric disorders can be studied in mammals (mainly rodents). Animal models for psychopathology are valuable tools in the analysis of genetic, environmental or pharmacological causes that constitute homologues of disease symptoms. Animal models are useful when stress effects cannot be studied in humans for ethics and other similar reasons. Anxiety models are very beneficial for the discovery of new agents and the mechanisms underlying anxiety disorders. When planning the study, it is important to determine which model and tests are suitable for the purpose of the study, to choose the appropriate animals, to know about the validity and reliability of the model. In this review, it is aimed to investigate the experimental anxiety models and behavioral tests used in the evaluation of anxiety. Since mice and rats mostly used in anxiety studies, model and behavioral tests are also described here with this animals.

**Keywords:** Anxiety models, experimental animal, behavioral tests

## GİRİŞ

Anksiyete ve korku, canlıların hayatta kalması veya fiziksel sağlamlığı için tehlike durumlarında gösterdikleri savunma davranışından kaynaklanan duygusal durumlardır [1]. Anksiyete yanıtı gerçek tehlikelere cevap vermede ve uyum sağlamada önemli bir mekanizmadır. Belirli bir olay ya da nesneye dayalı olmayan korku patolojik anksiyete olarak tanımlanır [2]. En yaygın anksiyete bozukluğu alttıpleri yaygın anksiyete bozukluğu, panik bozukluklar, belirli fobiler, sosyal fobi, obsesif-kompulsif bozukluklar ve travma sonrası stres bozukluğudur [3].

Anksiyete ve strese bağlı bozukluklar günlük yaşam aktivitelerini ciddi şekilde etkileyen ve halk sağlığına yüksek maliyetler yansıtan önemli psikiyatrik durumlardır. İnsan ve hayvanların duygularını ifade ediş şekillerindeki benzerliklerin gözlemlenmesi, psikiyatrik bozuklukların memeli hayvanlarda (başlıca kemirgenlerde) çalışılabilmesini akla getirmiştir [4].

Psikopatoloji hayvan modelleri, belirli bozuklukları olan hastalardaki semptomların homologlarını meydana getiren genetik, çevresel veya farmakolojik sebeplerin

analiz edilmesi için paha biçilmez araçlardır [5]. Tehlikenin kaynağı hayvanlar için avcılar, yükseklik, aydınlatma, ağrı verici uyarı, yeni obje ve yerler, türdeşler ile karşılaşma veya yarışma gibi çevresel uyarı ve durumlar olabilir. Bu zorluklarla mücadele etmek için hayvanlar genellikle 4 temel savunma stratejisi kullanırlar: kaçma, hareketsiz kalma (immobilizasyon), savunma atakları ve teslimiyet [1]. Stres etkilerinin etik ve diğer benzer sebeplerle insanlarda çalışılmadığı durumlarda hayvan modelleri yardımcıdır [6].

Deney hayvanlarının barınma şekillerinde aydınlık derecesi, izolasyon gibi değişiklikler, hareketinde, besin ve su verilmesinde yapılan kısıtlamalar gibi stres oluşturan uygulamalar hayvanların emosyonel olarak uyarılmalarına neden olur. Stres oluşturan etmenler hayvanda ilk olarak anksiyete yanıtının oluşmasına neden olur [7].

Anksiyete modelleri, anksiyolitik yeni ajanların keşfedilmesi ve anksiyete bozuklukları altında yatan mekanizmaların araştırılması için oldukça faydalıdır. Çalışmayı kurgularken, çalışmanın amacına hangi modelin ve testlerin uygun olduğunu belirlemek, uygun hayvanların seçimi, modelin geçerliliği ve güvenilirliği

hakkında bilgi sahibi olmak önemlidir. Bu araştırmada yaygın kullanılan deneysel anksiyete modelleri ve anksiyetenin değerlendirilmesinde kullanılan davranışsal testlerin incelenmesi amaçlanmıştır. Anksiyete modellerini konu edinen bilimsel çalışmalarda kullanılan hayvanlar çoğunlukla fareler ve sıçanlar olduğundan, burada da model ve davranış testleri bu hayvanlar üzerinden açıklanmıştır.

#### Hayvan Davranışları Ve Anksiyete İlişkisi

Anksiyete modeli oluştururken hayvanların temel davranışlarının bilinmesi önemlidir. Hayvanların doğal ortamlarındaki ve laboratuvar koşullarındaki davranış özellikleri, yaşama koşulları çalışmanın tasarlanması aşamasında göz önünde bulundurulmalıdır.

Kemirgenlerde anksiyete benzeri davranışlar incelenirken genellikle yaklaşma-kaçınma davranışı, dikkat durumu veya savunma davranışları değerlendirilir. Yaklaşma-kaçınma paradigması, çevresel bir uyarının tehdit olarak algılandığı durumlarda kullanılır ve potansiyel tehlike olarak görülen yeni bir nesne ile geçirilen süre, bu nesneye yaklaşmanın gecikme süresi anksiyetenin olası bir göstergesi olarak kullanılır. Kemirgenler doğal olarak avlanma riskinin daha az olduğu karanlık ve kapalı ortamları tercih ederler [8]. Kaçınma dürtüsü hayvanın yeni, açık, parlak ışıklı ya da yükseltilmiş ortamlardan doğal olarak korkması gibi koşulsuz oluşmuş durumlardan dolayı veya elektrik şoku ile cezalandırma gibi koşullandırılmış nedenlerden dolayı olabilir [4]. Kaçınma yanıtı hayvanlarda anksiyetenin göstergesi olarak kullanılır. Bu varsayım, hayvanın tehlikeli olduğunu düşündüğü uyarı keşfetme dürtüsü ile kaçınma isteği arasındaki çatışmaya dayalıdır [9].

Farklı barınma koşulları, farklı sosyal ortamın sağlanması ile erkek ve dişi farelerde hafif sosyal veya psikolojik stres etmenlerinin modelleri olabilirler. Dişi farelerin kısa bir süre için diğerlerinden izole edilmesi hafif bir stres etkeni olabilir ve farelerde depresyon benzeri etkilere neden olabilmektedir. Erkek fareler ise daha çok diğer erkeklerle aynı yerde barınmaktan etkilenir. Dişi sıçanlar kafeslerinde yalnız bırakıldıklarında daha fazla kortikosteron seviyelerine sahipken, erkek sıçanlar diğerleri ile aynı kafeste bulduklarında daha yüksek kortikosteron seviyeleri sergilemektedirler [10].

Sıçanlar teslimiyetçi postür ya da atak pozisyonu gibi davranışlarla hiyerarşi sistemlerini açıkça ortaya koyarlar. Ancak farelerde tipik hiyerarşi davranışları yoktur. Bu durum sosyal yenilgi ya da değişken barınma koşullarına dayalı hayvan stres modellerinde ilave önem kazanmaktadır. Ayrıca fare ve sıçanlar stresle baş etme konusunda farklılıklar göstermektedirler. Bazı çalışmalar, anksiyete benzeri veya depresyon benzeri davranışları oluşturmak için farelere sıçanlara göre daha şiddetli stres etmenleri uygulanması gerektiğini göstermektedir. Tür farklılıkları davranışı ve fizyolojisi şekillendirmede çok önemli bir rol oynayabilir ve bu nedenle de dikkate alınmalıdır [11].

Hayvanlarda anksiyete değerlendirmesinde süslenme, şahlanma, tigmotaksis ve risk ölçüm davranışları, mekan-zamansal parametrelerle birbirini tamamlayan ya da bunların yerine kullanılan davranışlardır [9].

Şahlanma (rearing) kemirgenlerin keşif davranışlarıdır. Şahlanma davranışında azalmanın, yüksek anksiyete veya korku duygusu sonucu olduğu düşünülmektedir. Süslenme (grooming) davranışı obsesif kompulsif bozukluğu değerlendirmede faydalı olabilir. Süslenme aktivitesinin düşük olması ya da süslenme paterninin bozulması yüksek anksiyete seviyesinden kaynaklanabilir [12].

Uzamış postür risk ölçüm davranışı olarak değerlendirilir. Potansiyel tehlike ile ilgili bilgi toplama isteği ile birlikte güvenli alanından ayrılma isteksizliği ile ilişkilidir ve yaklaşma-kaçınma çatışmasını yansıtır [9].

#### Anksiyete Modelleri Ve Testleri

Çoğu kez hayvan modeli ve hayvan modelinin geçerliliğini test eden davranış (semptom) arasındaki ayrım net değildir [13, 14]. Model, belli bir derecede tahmini geçerliliği sağlayan, insandaki patoloji durumlarını yineleyen bir organizma veya bir organizmadaki belirli bir durum olarak tanımlanır. Test, genetik, farmakolojik veya çevresel manipülasyonların etkilerini değerlendirmek için tasarlanan hedef davranışsal veya fizyolojik ölçümleri sağlar [15].

Hayvanlarda gözlemlenebilen ve ölçülebilen değişkenler, kontrollü laboratuvar koşulları altında doğal ortamlarındakine benzer şekilde potansiyel olarak anksiyojenik durumlara maruz kaldıklarında ortaya çıkan davranışsal ve fizyolojik cevaplardır. Bu deneysel verileri kaydetmek için kullanılan kurulum ve protokoller genellikle "testler" olarak adlandırılır ve anksiyete ile ilgili parametreleri ölçmeye aracılık ederler. Model daha ayrıntılı bir teorik altyapıya sahiptir ve birkaç test içerebilir [16].

Anksiyete modelleri oluştururken, hayvanın psikik durumuna etki edecek dokunma, barınma koşulları, soy farklılıkları, sıcaklık gibi modelde kullanılması amaçlanan stres faktörünün dışındaki diğer stres etmenleri kontrol altında tutulmalıdır. Ayrıca, sonuçları daha net olarak yorumlayabilmek için öğrenme, genel lokomotor aktivite gibi anksiyete semptomlarına ilişkin farklı parametrelerin aynı deney dizaynında incelenmesi faydalı olacaktır.

Anksiyete ölçümleri tek bir test ile de yapılabilir ancak açık alan (OF= open field) testi, yükseltilmiş artı testi (EPM= elevated plus maze) ve aydınlık-karanlık kutu (LDB= light-dark box) testi gibi bir dizi testi kullanmak daha iyi olabilir. Bu testler kullanılarak davranışsal fenotiplerin değerlendirilmesi farklı koşullar altında gerçekleştirilmiş olur. Çeşitli testlerin verileri birleştirilerek hayvanların davranış profilleri ile ilgili daha bütün bir tanımlama yapılabilir [16].

Maternal separasyon, anksiyetenin genel yönlerini ortaya koyan bir uygulama olarak düşünülebileceği gibi, spesifik bozuklukların modellenmesi olarak da kullanımdadır. Travma sonrası stres bozukluğu, tanısız sınıflandırmadaki mevcut durumu ne olursa olsun, anksiyete özellikleri taşıyan ve anksiyete testlerinde kullanılan uyarılar tarafından üretilen bir klinik durumdur. Kısıtlama, su altında tutma ve elektrik şoku gibi fiziksel stres etmenleri uygulanır. Bazı geleneksel testlerde, kısıtlama veya immobilizasyon stres prosedürleri anksiyete benzeri davranışlara yol açabilir. Travma sonrası stres bozukluğu, hayvana predatöre dayalı psikolojik stres uygulayarak da modellenilebilir [17].

Kemirgenlerde koku duyusunun önemli olmasından yola çıkılarak olfaktor bulbusun çıkartılması (olfaktor bulbektomi), psikopatoloji modelleri oluşturmada kullanılmaktadır. Olfaktör bulbektominin neden olduğu davranışsal değişiklikler, yeni ortamlarda hiperaktivite, ajitasyon, anksiyete benzeri, iritabilite, dürtüsel ve agresif davranışlar gibi yanıtlardır [18].

Kemirgenlerde anksiyete benzeri davranışları değerlendirmede kullanılan test ve/ veya modeller koşulsuz testler (etiyojik temelli) ve koşullu modeller olarak ayrılabilir. En yaygın koşulsuz testler OF test, EPM ve LDB testidir. Bu metotlar yaklaşma-kaçınma davranışını ölçme temeline

dayanır. Ancak, bu testlerin uygulamaları laboratuvarlar arasında oldukça değişkenlik göstermektedir. Bu yüzden sonuçların yorumlanması ve karşılaştırması her zaman kolay ve doğru şekilde olmaz [19].

#### **Koşulsuz Anksiyete Testleri**

Koşulsuz uyarı modelleri etiyolojik temelli paradigmatlardır ve hayvanların kendiliğinden gelişen ve açık bir şekilde ağrı ve rahatsızlık içermeyen stres uyarımına karşı hayvanın doğal reaksiyonlarını içerir [20].

En yaygın kullanılan koşulsuz anksiyete testleri yeni bir ortamı keşfetme ile tehlikeli alanlardaki potansiyel tehlikeden kaçınma dürtüleri arasında yaşanan çatışma duygusu temeline dayanır. Anksiyete davranışı keşif dürtüsünün bastırılması şeklinde kendini gösterir [21].

#### **Açık Alan Testi (Open Field Test= OF test)**

OF testinde hayvan, kaçamayacağı şekilde etrafı duvarlar ile çevrili yeni bir ortama yerleştirilir ve davranışları değerlendirilir [22]. Kemirgenler, büyük, parlak ışıkla aydınlatılmış, açık ve bilmedikleri yeni bir çevreden kaçınma davranışları sergilerler [23].

Test aparatının farklı şekillerde olması (yuvarlak, kare vs.), aydınlatma koşullarındaki çeşitlilikler ve aparata tünel, platform gibi nesnelerin yerleştirilmesi gibi değişiklikler ile OF testinde farklı versiyonlar oluşturulmuştur. Hayvan test aparatının ortasına veya duvara yakın bir yere koyularak 2-20 dk. arasında bir süre boyunca yatay olarak yer değiştirmesi, şahlanma, süslenme (uzun süreli tüylerini temizleme davranışı) gibi davranışsal parametreleri kaydedilir. Çoğunlukla 5 dakikalık test süresi tercih edilir [24]. Sıçanlar, özellikle testin ilk evrelerinde tipik olarak aparatı kenar bölgelerinden başlayarak keşfetmeyi tercih ederler. Kemirgenlerin sergiledikleri bu davranış tigmotaksis olarak tanımlanmaktadır [25]. OF testi sıklıkla hem anksiyete hem de lokomotor aktivitenin değerlendirilmesinde kullanılır. Hayvanın test aparatının merkez bölgesine ilk giriş zamanı ve bu merkezi bölgede geçirdiği süre kullanılan anksiyete parametrelerindedir [8]. Genellikle, merkezde geçirilen sürenin azalması anksiyetenin göstergesi olarak kabul edilir ve bu varsayım farmakolojik ve genetik çalışmalarla desteklenmiştir [12].

OF test aparatına yerleştirilen hayvan kendi ortamından farklı bir ortamda bulunduğu için huzursuz olacak ve etrafı keşfetme isteği ile lokomotor aktivitesi artacaktır [26]. Hayvanı açık alan gibi hiç tanımadığı alıştığı ortamından başka bir ortama koyma orta dereceli stres oluşturma metodlarından biridir [27]. OF testinde agorafobi, hayvanın sosyal grubundan ayrılması, su ve yiyecek kısıtlaması gibi faktörler anksiyeteyi tetikleyebilir [28].

Testte defekasyon sayısı da değerlendirilebilir. Defekasyonun duyu bakımından veya duygusal reaktivitede iyi bir indikatör olduğu düşünülmektedir [29].

OF kemirgenleri emosyonel olarak test etmek için en klasik metotlardandır. Ancak farklı laboratuvarlarda testte kullanılan aparatın boyutu, malzemesi, rengi, şekli gibi özelliklerinin farklı oluşu, testin eleştiriler almasına neden olmaktadır. Kullanılan alanın yeni bir alan oluşu ve caydırıcılığı lokomotor ve keşif aktivitelerinin düzenlenmesi ve tetiklenmesinde temel faktörlerdir [19].

OF testinin tekrarlı şekilde yapılması hayvanın alışmasına neden olabilir. Testin ilk yapıldığı zaman hayvan korkuya bağlı olarak daha çok uzamış postür, aparatın köşe ve kenarlarında hareketler sergilerken, testin tekrar edilmesi durumlarında daha fazla keşif davranışları gösterir [30].

OF testi model oluşturmadan önce ve model oluşturulduktan sonra uygulanabilir. Böylece stres, ilaç vb. uygulamaların öncesi ve sonrasında, OF testi parametreleri karşılaştırılabilmektedir [31,32, 33].

Katettiği mesafe, hız, immobil olarak geçirdiği süre, merkezde geçirdiği süre, duvara yaslanma, şahlanma gibi davranışsal parametreler manuel olarak ölçülebileceği gibi özel yazılım programları ile hesaplanabilir [34].

#### **Yükseltilmiş Artı Testi (Elevated Plus Maze= EPM)**

EPM aparatı birbirine dik aynı ölçülerde (50x10 cm) iki açık kol ve iki kapalı koldan oluşmaktadır. Kapalı kolların yan duvarları 40 cm yükseklikte ve iki açık ve kapalı kolun birleştiği yerdeki küçük kare 10 x 10 cm ölçüsündedir. Aparat yerden 50 cm yükseltilmiştir. Testte, hayvan aparata yüzü açık kola bakacak şekilde kolların birleştiği merkezi platforma koyulur ve 5 dk. süreyle hayvanların açık ve kapalı kollara giriş sayıları ve burada geçirdiği süreler kaydedilir [20]. Kemirgenler kendileri için yabancı olan bir ortamda tedbirli davranarak kapalı kolları tercih ederler. Ancak sadece anksiyete seviyesi azalmış olanlar açık kolları aktifitesini artırır. Bu bağlamda aparatın merkez kısmı hayvanın hangi kolu tercih edeceğine karar verme bölgesidir [35].

Anksiyolitik bileşikler açık kollara giriş ve/veya açık kolları geçirilen zaman yüzdesini artırır. Bu etkiler toplam kollara giriş sayısında bir değişiklik olmaksızın gözlemlenir [36].

EPM' de hayvanların bazal hareketleri, barınma koşulları, aydınlatma seviyesi, sirkadiyen ritim değişiklikleri, önceden uygulanan handling veya stres, teste aşinalık gibi bazı faktörlerden etkilenir. Örneğin, sıçanları bireysel olarak kafeste tutmak anksiyeteyi artırırken, farelerin kafeste bireysel tutulması anksiyeteyi azaltır. Bu durum türler arasındaki sosyal organizasyon farklılığından kaynaklanmaktadır. EPM' ye tekrar maruziyet hayvanın açık kolları araştırma davranışında kayda değer bir azalmaya yol açar ve benzodiazepinlerin anksiyolitik etkilerini tamamen yok edebilir. İlaveten araştırmacının aynı odada bulunması da sonuçları etkileyebilir [4].

EPM' de ortaya çıkan davranış profilleri yenilik korkusu, keşif ve yaklaşma-kaçınma mücadelesi durumlarından kaynaklanıyor gibi görünmektedir; bu yüzden EPM çoğunlukla bir koşulsuz spontan davranışsal mücadele modeli olarak da bilinir [20].

#### **Yükseltilmiş 0 Testi (Elevated Zero Maze= EZM)**

Yükseltilmiş 0 testi (EZM), karşılıklı iki açık ve iki kapalı kadrana sahip dairesel yapıdır ve EPM' nin modifiye bir şeklidir [9]. EPM' de hayvanın alanın orta bölgesinde bulunma durumunda oluşan yorumlama güçlüğünü ortadan kaldırır. EZM, yerden yüksek, aydınlık açık ve karanlık kapalı alanların birbirini takip ettiği dairesel bir düzenektir. Hayvanın 5 dk. süresince açık alana giriş yüzdesi ve açık alanda geçirdiği zaman yüzdesi hesaplanır. Bu modelde diazepam açık alanda geçirdiği zaman yüzdesini ve kafa sokma sıklığını artırır ve kapalı alandan açık alana doğru gergin postür hareketlerin sıklığını azaltır [4].

#### **Yükseltilmiş T Testi (Elevated T Maze= ETM)**

ETM aparatı aynı ölçülerde iki açık kol (50 cm×12 cm) ve bunlara dik, kenarlarında duvar olan bir kapalı koldan (50 cm×12 cm) oluşan yerden 50 cm yükseltilmiş bir aparatır. Bu test ile hayvanda pasif sakinme (inhibitör sakinme) ile aktif sakinme birlikte ölçülebilir. Pasif sakinmede hayvan kapalı kolun en sonuna koyulur ve 30 saniyelik dilimlerden oluşan

3 deneme boyunca bu koldan hayvanın uzaklaşma süresi kaydedilir. Hayvan kapalı koldan ayrılmaz ise denemeler en fazla 300 Sn. sürdürülür. 3. denemeden sonra sıçan açık kollardan birinin sonuna koyulur ve buradan kapalı kola kaçma zamanı kaydedilir. Anksiyolitik bazı ajanların doza bağlı olarak pasif sakinmeyi bozduğu ancak aktif sakinme davranışında değişiklik oluşturmadığı gözlenmiştir. Böylece ETM' de aynı denekte farmakolojik olarak iki farklı tip korku oluşturulmaktadır [37,38].

Koşullu korku, genel anksiyete bozuklukları ile, koşulsuz korku, panik bozukluklarla ilişkilidir. ETM koşullu ve koşulsuz korku durumlarını birbirinden ayırt etmeye yarayan bir modeldir [38]. Koşulsuz korku, hayvanın açık kola koyulduğu zaman yükseklikten ve açık ortamdan doğal korkusu neticesi oluşur ve bu koldan kapalı kola kaçış zamanı aktif sakinme olarak değerlendirilir. Hayvan kapalı kola koyulduğunda açık koldan pasif olarak sakinme öğrenilmiş korkunun göstergesidir. Açık kol hayvan için caydırıcı özelliklere sahiptir, hayvan istemediği durumdan kaçınmak için hareket etmemeyi öğrenmiştir [39].

#### **Aydınlık-Karanlık Kutu Testi (Light-Dark Box Test-LDB Test)**

LDB testi başlangıçta fareler kullanılarak geliştirilen birkaç paradigmadan biridir. Test kemirgenlerin parlak ışıklı ortamlardan doğal olarak hoşlanmama ve yeni bir ortamı keşfetme davranışları temeline dayanır. Testin önceden eğitim gibi zaman alıcı bir uygulamayı gerektirmeden çabuk ve kolay yapılması testin avantajlarından biridir [19].

Test aparatı, iki eşit büyüklükte aydınlık ve karanlık bölmelerden oluşan dikdörtgen kapalı bir kutudur. Aparatın üst kapak kısımları hayvanı yerleştirebilmek için çıkarılabilir yapıdadır. Testin başlangıcında hayvan aydınlık bölmeye koyulur ve etrafı keşfetmesine izin verilir [33]. Testte aydınlık/ karanlık bölmeye toplam geçiş sayısı, aydınlık/ karanlık bölmeye ilk giriş süresi, katettiği mesafe ve her bir bölmede geçirdiği süre parametreleri özel yazılım programları ile kaydedilebilir [40]. Test süresi genellikle 5 ya da 10 dakikadır. LDB testinde hayvanın aydınlık ve karanlık bölmeleri tercihi analiz edilerek anksiyete benzeri davranışlar üzerine ilaçların veya diğer hasarların etkileri incelenebilir [41]. Karanlık bölmenin tercih edilmesi ve aydınlık bölmede şahlanma gibi keşif davranışlarının az olması anksiyete benzeri davranışlar olarak kabul edilir. Anksiyolitik ilaçların kullanılması ile aydınlık bölmede geçirilen süre ve keşif davranışları artar [34].

#### **Delikli Tahta Testi (Hole-Board Test)**

Hayvanlar yabancı bir çevre veya nesne ile karşılaştığı zaman keşifçi bir davranış sergiler ve yeni çevrede gezinir, yeniliğe doğru yönelir, yeni nesneye dokunur veya koklar. Keşif, hayvana yiyecek kaynakları, barınma ve çiftleşme olanakları konusunda bilgi sağlar. Ancak, hayvan yeni çevreye girerek veya yeni bir uyarıya yönelerek türdeşlerinin saldırı ve avlanma riskini ve diğer tehlikelerin riskini artırabilir. Hayvanın yeniliği keşfetmesi veya uzak durması yaklaşma-kaçınma mücadelesinin bir sonucu olarak veya neofilik ve neofobik eğilimlerinin arasındaki bir denge olarak tanımlanır. Neofili yeni bir uyarıya merak duygusuyla yaklaşım; neofobi yeni bir uyarıdan korkuya bağlı kaçınma olarak düşünülebilir [42].

1970'lerde araştırmacılar zemininde hayvanların kafasını sokabileceği kafa-daldırma (head-dipping) da denilen deliklerin olduğu etrafı çevrili bir alandan oluşan delikli tahta (hole-board) aparatını kullanmaya başlamışlardır.

Kafa daldırma süresi ve sıklığı hayvanın genel lokomotor aktivitesinden bağımsız olarak neofilin ölçüsü olarak farz edilir. Düşük sayıda kafa daldırma hareketinin hayvanlarda yüksek anksiyete durumunu yansıttığı farz edilir [42].

#### **Emosyonel Hipofaji (Hiponeofaji)**

Kemirgenlerde hiponeofaji ilk kez 1934 Hall tarafından bildirilmiştir. Hall yeni bir çevreye maruz bırakılan hayvanlarda anksiyete benzeri durumların artışı ile beslenmenin baskılanmasını göstermiştir. 1988' de Bodnoff ve ark yenilikle baskılanmış beslenme (Novelty Suppressed Feeding- NSF) testini geliştirmişlerdir. Bu testte hayvanlar 24 saat aç bırakıldıktan sonra tam ortasında üzerine ışık odaklanmış platform üzerinde tek bir pellet yiyeceğin olduğu şeffaf bir kafese koyulurlar. Hayvanların merkezdeki bu platforma ulaşma süreleri ve platformdaki yiyeceği yemeye başlama süreleri kaydedilir [4]. Bu testte yediği yiyecek miktarı da değerlendirmeye alınır. Kemirgenlerin doğuştan sahip oldukları yeniliklere karşı korku duygusu, beslenme davranışının baskılanmasında etkindir [41]. Hiponeofaji, diğer geleneksel paradigmalara göre lokomotor aktiviteye bağlı olmaması yönüyle anksiyete değerlendirmelerinde avantaj sağlar [21].

#### **Sosyal Etkileşim Testi**

Sosyal etkileşim testi, hayvanların önceden eğitilmesini gerektirmez. Fareler ve sıçanlar gibi bir kemirgen çiftinin serbestçe etkileşebileceği bir alanda sosyal etkileşimde buldukları süre kaydedilir. Her bir kemirgenin etkileşim süresi karşısındaki diğer hayvanın (partnerinden) davranışından doğrudan etkilenir. Bu yüzden verilerin toplanmasında eşleştirilmiş iki hayvanın verileri bir birim olarak değerlendirilir. Eğer deneysel dizayn, bir sıçanın ilaç almasını diğerinin kontrol olarak kullanılmasını gerektiriyorsa, ilki tarafından başlatılan etkileşim zamanı bağlı ölçüm olarak kullanılır. Genel lokomotor aktivitenin değişmediği ve sosyal etkileşim süresinin arttığı durumlar anksiyetede azalma olarak yorumlanır [4].

Sosyal etkileşim testi, sosyal fobi, sosyal yenilgi/ bozulmalar ve emosyonel gelişmemişlik tedavilerinde anksiyolitik bileşiklerin değerlendirilmesinde oldukça faydalı bir hayvan modelidir. Testte eşleştirilmiş birbirine yabancı sıçan çifti her biri farklı zıt köşede olacak şekilde kafese yerleştirilir ve 10 dk. süreyle tüm motor aktiviteleri ve sosyal etkileşimleri gözlemlenir. Her bir sıçan çiftinin sosyal etkileşim süreleri, karşılıklı koklama ve süslenme, bitişik olarak uzanma, birbiri üzerine tırmanma ve partnerinin altına doğru sürünme, yaklaşma ve izleme süreleri olarak ölçülür [20]. Toplam etkileşim sayısı, aktif temasların toplam süresi, her bir temasın ortalama süresi ve toplam katettiği mesafe parametreleri kaydedilir [40].

Fareler için geliştirilmiş olan başka bir sosyal etkileşim testi, birbiri arasında küçük geçitlere sahip 3 eşit bölmeye (20 cm x 40 cm x 22 cm) ayrılmış pleksiglas bir aparatın oluşur. Kenardaki bölmelerden birine yabancı bir fare küçük bir kafes içinde koyulur. Kafes, burunla temasa izin verecek şekildedir ancak olası bir kavgayı önler. Test edilecek fare üç bölmeli aparatın orta kısmına koyulur ve 10 dk. boyunca sosyal etkileşim aparatını keşfetmesine izin verilir. Her bir bölmede geçirdiği süre, bölmelere giriş sayısı hesaplanır. Deneğin 10 dk. süresindeki yabancı fareyi sosyal olarak tercih etmesi hesaplanır. 10 dakikalık ilk testten sonra, bölmeli kutunun diğer kenar bölgesine de ikinci bir yabancı fare daha kafes içinde koyulur. Test yapılan fare, ilk test döneminde henüz keşfetmiş olduğu fare ile yeni yabancı fare

arasında seçim yapacaktır. Farenin her bir yabancı fare ile geçirdiği süreler hesaplanır [40].

#### **Predatöre Maruziyet Testi**

Doğal olarak predatörü (avcısı) olan bir hayvanla karşılaşmanın, sıçanlarda ve farelerde yüksek düzeyde korku ve stres yarattığı, ardından da uzun süren davranışsal ve endokrin yanıtlara neden olduğu gösterilmiştir. Predatör ve idrar kokusu gibi avcıya dair uyarılar bu nedenle hayvan modellerinde travma indüksiyonu için oldukça etkili araçlardır [11].

Predatöre maruziyet testi en çok kullanılan stres etmenlerinden biridir. Birtakım çalışmalarda predatörün kendisine ya da kokusuna kısa bir süre maruziyetin anksiyete ve depresyon benzeri davranışlara yol açtığı bulunmuştur [33]. Predatör stresi olarak kedi kokusu kullanılabilir, kedinin kendisi stres etmeni olarak kullanılacağına ise hayvanın fiziksel olarak zarar göreceği temas engellenecek şekilde düzenek oluşturulur [31]. Fareler için predatör stresi olarak sıçanlar kullanılabilir. Testin yapılacağı aparata hayvan birkaç kez predatör olmaksızın tek başına koyularak alışması sağlanır. Aparat içinde güvenli olacağı bölge vardır ve buradan tünel ile test aparatının diğer bölgelerine geçebilme imkanı bulunmaktadır. Test aşamasında 10 dk. süreyle demir parmaklıklar ile ayrılmış olan sıçan da aparatta diğer uca koyulur ve farenin sergilediği postürünü uzatma sayısı, predatörün bulunduğu yerdeki demir parmaklıklara temas sayısı, koklama, saklanma, donma gibi davranışları değerlendirilir. Hayvanın sergilediği savunma davranışları anksiyolitik ilaçlara duyarlı olduğundan bu test farmakolojik çalışmalar için uygundur [34].

#### **Merdiven Testi (Staircase Test)**

Testte beş eşit ölçüde basamaktan oluşan (2.5 cm x 10 cm x 7.5 cm) tahta merdiven kullanılır. Merdiven dikdörtgen şeffaf bir kutu içine yerleştirilir [43]. Merdiven testi özellikle farelerde anksiyete modeli oluşturmada kullanılır. Bu test için her hayvan yalnız bir kere kullanılabilir. Hayvan, kutu zeminine merdivenin gerisinde olacak şekilde bırakılır ve 3 dk. süresince çıktığı basamak sayısı ve şahlanma sayısı hesaplanır. Bu deneysel modelde kontrol grubunun çıktığı basamak sayısı ve şahlanma sayısı ortalaması 100% olarak kabul edilir ve işlem görmüş hayvanların değerleri kontrol grubunun yüzdesi olarak ifade edilir [20]. Bu testte basamak çıkma keşifçi davranışın bir ölçüsü olarak kabul edilir ve şahlanma davranışının sayısı anksiyete benzeri davranışlar olarak değerlendirmeye alınır [3, 44].

#### **Koşullu Anksiyete Testleri**

Koşullu anksiyete paradigmaları, hayvanın nötral ya da hoşnut olmayacağı bir uyarana karşı yanıtlarını değerlendirmektedir. Açlık/ susuzluk durumları ile ayak şoku gibi ceza alma arasındaki çatışma anksiyolitikler ile giderilir [21].

#### **Geller-Seifter Testi**

Koşullu davranışlar, pozitif ya da negatif pekiştirme olarak bilinen, hayvanın çevresel bir değişikliğe karşı verdiği doğal yanıtlardır. Pozitif pekiştirme (ödül), verilen uyarının daha sonra bu uyarı ile ilişkili yanıtın oluşmasında artışına neden olması durumunda ortaya çıkar. Negatif pekiştirme ise elektrik şoku gibi cezalandırma paradigmalarında görüldüğü gibi eğitilmiş hayvanın hoşuna gitmeyen uyarıdan kaçınma cevabı sergilediği zamanlarda görülür [4].

Geller-Seifter testi eğitim aşamasında çatışmanın olduğu

ve olmadığı dönemler şeklinde iki aşama vardır. Çatışma aşamasında (ceza ile birlikte ödül) 3 dk. boyunca hayvan pedala bastığında sesli veya görsel uyarı ile birlikte elektrik şoku ve yiyecek birlikte verilir. Çatışmanın olmadığı aşamada (cezasız ödüllendirme) ise 15 dk. süresince pedala basma ile elektrik şoku verilmeden yiyecek verilir. Hayvanlar bir süre aç bırakıldıktan sonra yapılan test, 4 çatışma olmayan ve bir çatışma olan evrelerden oluşur. Hayvanın pedala basarak hem elektrik şoku hem besin aldığı cezalı yanıtların sayısı değerlendirilir [45].

Kontrol koşullarında hayvanların cezasız döneme oranla pedala basmasında düşüş görülürken, anksiyolitik ilaçların kullanıldığı durumlarda cezalandırılmış yanıtların oluşmasında artış olur. Morfin gibi opioid agonistlerin uygulanması ile bu etki görülmediğinden, bu yanıtların oluşması antinosisepsiyon etkiden kaynaklı değildir [4].

#### **Vogel Testi**

Vogel testinde hayvanlarda anksiyetenin modellenmesi, susamış olan hayvanların su içmelerine elektrik şoku eşlik ettiğinden, hayvanların şişeye yaklaşma davranışları ile elektrik şokundan korkuları arasında bir çatışma oluşturularak gerçekleştirilir [3].

Bu testte hayvanlar 24 saat susuz bırakılır ve deney kafesinde su şişesini bulabilmeleri için basitçe eğitilirler. Ertesi gün aynı kafese tekrar koyulurlar. Hayvanın su içmek üzere şişenin ağzı ile her 21. temasında zemindeki düzenek ile hayvana 0.5 mA kadar hafif bir elektrik şoku verilir [4]. Anksiyolitik ilaç verilmiş olan hayvanların cezalandırma ile birlikte su içme sayıları artar [46].

Anksiyolitiklerin etkilerini incelemek için geliştirilmiş Vogel testinde motivasyon faktörü olarak susuzluk kullanılmaktadır. Vogel testinde eğitim süresi Geller-Seifter testine göre daha kısadır. Vogel testi uygulamasında çok çeşitli varyasyonlar vardır [17].

#### **Anksiyojenik Ajan Kullanılan Modeller**

Pentilentetrazolün (PTZ) subkonvülsif dozu sıçanlarda anksiyojenik bir uyarı olarak kullanılır. Yöntem, sıçanların PTZ enjeksiyonu yapıldığında yiyecek alabilmek için iki pedal arasından uygun bir pedala basması üzerine eğitilmesini gerektirir. İkinci bir pedala verilen yanıtlar da kaydedilir. Saline enjeksiyonuna karşı PTZ enjeksiyonu ile hatasız uygun pedala basabilen sıçanlar eğitilmiş olarak düşünülür. Anksiyolitik ilaçlar ile muamele PTZ' nin bu ayırıcı özelliğini ortadan kaldırır [20]. Besin kısıtlamasının ardından 2 gün eğitim süresince hayvanlara herhangi bir pedala bastığında yiyecek verilir. Test için hayvanlar saline ve PTZ enjeksiyonu yapıldığında iki enjeksiyonda farklı pedal seçilmek kaydıyla iki pedaldan birine basması için eğitilir. Anksiyolitik bir ilaç verildiğinde PTZ enjekte edilen hayvan saline enjekte edilen hayvanın bastığı pedala (sol pedala) basarsa, bu ilacın PTZ etkisini yok ederek anksiyolitik etki gösterdiği söylenebilir. Kısaca bu test PTZ ayırıcı etkisi ile saline etkisizliğinin birbirini karşılaması esasına dayanır [7].

Fare ve sıçanların stres hormonu olan kortikosteronun ekzojen olarak uygulanmasının anksiyete benzeri davranışları oluşturduğu bildirilmiştir. Sıçanlarda amigdala içine doğrudan kortikosteron uygulaması EPM' de anksiyete benzeri davranışların gelişmesine neden olmuştur [47].

## KAYNAKLAR

- [1] Graeff FG, Zangrossi H. 2002. Animal Models of Anxiety Disorders. In: Biological Psychiatry (ed. D'haenen HAH, den Boer JA, Willner P. John), pp. 879-893. Wiley&Sons, Ltd. London, UK.
- [2] Garg VD, Dhar VJ, Sharma A, Dutt R.2011. Experimental model for antianxiety activity: a review. Pharmacology Online. 1:394-404.
- [3] Cryan CF, Sweeney FF. 2011. The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. Br J Pharmacol. 164:1129-1161.
- [4] Campos AC, Fogaça MV, Aguiar DC, Guimaraes FS. 2013. Animal models of anxiety disorders and stres. Rev Bras Psiquiatr. 35(2):101-111.
- [5] Bourin M, Petit-Demouliere B, Dhonnchadha BN, Hascöet M. 2007. Animal models of anxiety in mice. Fundam Clin Pharmacol. 21:567-574.
- [6] Kalueff AV, Tuohimaa P. 2004. Experimental modeling of anxiety and depression. Acta Neurobiol Exp. 64:439-448.
- [7] Uzbay IT. 2004. Psikofarmakolojinin Temelleri ve Deneysel Araştırma Teknikleri. 1. Baskı, pp 103-112. Çizgi Tıp Yayınevi. Ankara.
- [8] Lezak KR, Missig G, Carlezon WA. 2017. Behavioral methods to study anxiety in rodents. Dialogues Clin Neurosci. 19(2):181-191.
- [9] Ennaceur A. 2014. Tests of unconditioned anxiety-Pitfalls and disappointments. Physiol Behav. 135:55-71.
- [10] Palanza P. 2001. Animal models of anxiety and depression: how are females different. Neurosci Biobehav Rev. 25:219-233.
- [11] Schöner J, Heinz A, Endres M, Gertz K, Kronenberg G. 2017. Post-traumatic stress disorder and beyond: an overview of rodent stress models. J. Cell. Mol. Med. 21(10):2248-2256.
- [12] Sahin Z, Solak H, Koc A, Ozen Koca R, Ozkurkculer A, Cakan P, Solak Gormus ZI, Kutlu S, Kelestimur H. 2018. Long-term metabolic cage housing increases anxiety/depression-related behaviours in adult male rats. Arch Physiol Biochem. 20:1-6.
- [13] Dedic N, Walser SM, Deussing JM. 2011. Mouse Models of Depression. In Psychiatric Disorders/ Book 2, InTech in press. 185-222.
- [14] Overstreet DH. 2012. Modeling depression in animal models. Methods Mol Biol. 829:125-144.
- [15] Yan H, Cao X, Das M, Zhu X, Gao T. 2010. Behavioral animal models of depression. Neurosci Bull. 26(4):327-337.
- [16] Steimer T. 2011. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. Dialogues Clin Neurosci. 13(4):495-506.
- [17] Harro J. 2018. Animals, anxiety, and anxiety disorders: How to measure anxiety in rodents. Behav Brain Res. 352:81-93.
- [18] Hirose N, Saitoh A, Kamei J. 2016. Involvement of glutamatergic N-methyl-D-aspartate receptors in the expression of increased head-dipping behaviors in the hole-board tests of olfactory bulbectomized mice. Behav Brain Res. 312:313-320.
- [19] Kuleskaya N, Voikar V. 2014. Assessment of Mouse anxiety-like behavior in the light-dark box and open-field arena: Role of equipment and procedure. Physiol Behav. 133:30-38.
- [20] Kumar V, Bhat ZA, Kumar D. 2013. Animal models of anxiety: A comprehensive review. J Pharmacol Toxicol Meth. 68:175-183.
- [21] Freudenberg F, O'Leary A, Aguiar DC, Slattery DA. 2018. Challenges with modelling anxiety disorders: a possible hindrance for drug discovery. Expert Opin Drug Discov. 13(4):279-281.
- [22] Walsh RN, Cummins RA. 1976. The open-field test: A critical review. Psychol Bull. 83:482-504.
- [23] Seibenhener ML, Wooten MC. 2015. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. J Vis Exp. e52434:1-6.
- [24] Prut L, Belzung C. 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. Eur J Pharmacol. 463:3-33.
- [25] Lampera MR, Cardenas FP, Setem J, Morato S. 2008. Thigmotactic responses in an open-field. Braz J Med Biol Res. 41:135-140.
- [26] Küçük A, Gölgeli A, Arslan M. 2005. Depresyon oluşturulan sıçanlarda yaşın açık alan parametrelerine etkisi. Erciyes Tıp Dergisi. 27 (3):110-114.
- [27] Küçük A, Gölgeli A. 2002. Emosyonel hipofaji öncesi ve sonrasında farelerde davranış parametreleri. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. 11(1):31-35.
- [28] Dolu N, Özesmi Ç. 2004. Anksiyetenin değerlendirilmesinde güncel olarak kullanılan bazı deneysel hayvan modelleri. Klinik Psikofarmakoloji Bülteni. 14:216-225.
- [29] Pisula W. 1994. Sequential analysis of rat behavior in the open field. Int J Comp Psychol. 7(4):194-201.
- [30] Eweka A, Om'Iniabohs F. 2007. The effects of monosodium glutamate on the open field locomotor activities in adult wistar rats. The Internet Journal of Nutrition and Wellness. 6(2):1-6.
- [31] Burgado J, Harrell CS, Eacret D, Reddy R, Barnum CJ, Tansey MG, Miller AH, Wang H, Neigh GN. 2014. Two weeks of predatory stress induces anxiety-like behavior with co-morbid depressive-like behavior in adult male mice. Behav Brain Res. 275:120-125.
- [32] Huang X, Mao Y, Li C, Wang H, Ji J. 2014. Venlafaxine inhibits apoptosis of hippocampal neurons by up-regulating brain-derived neurotrophic factor in a rat depression model. Int J Clin Exp Pathol. 7(8):4577-4586.
- [33] Chen L, Shen B, Liu D, Li S. 2014. The effects of early-life predator stress on anxiety- and depression-like behaviors of adult rats. Neural Plast. 1-10.
- [34] Hart PC, Bergner CL, Smolinsky AN, Dufour BD, Egan RJ, Laporte JL, Kalueff AV. 2010. Experimental models of anxiety for drug discovery and brain research. Methods Mol Biol. 602:299-321.
- [35] Casarrubea M, Faulisi F, Caternicchia F, Santangelo, Di Giovanni G, Benigno A, Magnusson MS, Crescimanno G. 2016. Temporal patterns of rat behaviour in the central platform of the elevated plus maze. **Comparative analysis between male subjects of strains with different basal levels of emotionality.** J Neurosci Methods. 268:155-162.
- [36] Andreatini R, Bacellar LFS. 1999. The relationship between anxiety and depression in animal models: a study using the forced swimming test and elevated plus-maze. Braz J Med Biol Res. 32(9):1121-1126.
- [37] Graeff FG, Viena MB, Mora PO. 1997. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. Neurosci Biobehav Rev. 21(6):791-799.
- [38] Graeff FG, Netto CF, Zangrossi H. 1998. The

elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev.* 23:237-246.

[39] Zangrossi H, Graeff FG. 1997. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. *Brain Res Bull.* 44(1):1-5.

[40] Okuda K, Takao K, Watanabe A, Miyakawa T, Mizuguchi M, Tanaka T. 2018. Comprehensive behavioral analysis of the Cdk15 knockout mice revealed significant enhancement in anxiety- and fear-related behaviors and impairment in both acquisition and long-term retention of spatial reference memory. *PlosOne.* 1-34.

[41] Belovicova K, Bogi E, Csatlosova K, Dubovicky. 2017. Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. *Interdiscip Toxicol.* 10(1):40-43.

[42] Brown GR, Nemes C. 2008. The exploratory behaviour of rats in the holeboard apparatus: is head-dipping a valid measure of neophilia. *Behav Processes.* 78:442-448.

[43] Magaji MG, Iniaghe LO, Abolarin M, Abdullahi OI, Magaji RA. 2017. Neurobehavioural evaluation of resveratrol in murine models of anxiety and schizophrenia. *Metab Brain Dis.* 32:437-442.

[44] Ago Y, Takahashi K, Nakamura S, Hashimoto H, Baba A, Matsuda T. 2007. Anxiety-like and exploratory behaviors of isolation-reared mice in the staircase test. *J Pharmacol Sci.* 104:153-158.

[45] Bali A, Jaggi AS. 2015. Electric foot shock stress: a useful tool in neuropsychiatric studies. *Rev. Neurosci.* 1-23.

[46] Basso AM, Gallagher KB, Mikusa JP, Rueter LE. 2011. Vogel conflict test: sex differences and pharmacological validation of the model. *Behav Brain Res.* 218:174-183.

[47] Ardayfio P, Kim KS. 2006. Anxiogenic-like effect of chronic corticosterone in the light–dark emergence task in mice. *Behavioral Neuroscience.* 120(2):249-256.