



## Modelowanie zaburzeń emocjonalnych w psychofarmakologii przedklinicznej na przykładzie testu znieruchomienia

*The conditioned fear (freezing) test as a model  
of emotional disturbances in preclinical psychopharmacology*

JANUSZ SZYNDLER<sup>1</sup>, ADAM PŁAŻNIK<sup>1,2</sup>

- Z: 1. Katedry i Zakładu Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej  
Akademii Medycznej w Warszawie  
2. Zakładu Farmakologii i Fizjologii Układu Nerwowego  
Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

**STRESZCZENIE.** Model znieruchomienia, uwarunkowanego strachu (freezing) jest jednym z najbardziej interesujących testów modelujących reakcje lękowe. Służy analizie mechanizmów zachowań lękowych oraz badaniu nowych leków anksjolitycznych. W pracy przedstawiono krótki przegląd zwierzęcych modeli zaburzeń psychicznych, z uwzględnieniem miejsca, jakie wśród nich zajmuje test znieruchomienia. Szczególną uwagę zwrócono na struktury anatomiczne mózgu zaangażowane w nabywanie i ekspresję reakcji uwarunkowanego lęku oraz na metody pozwalające na ich identyfikację, jak np.: uszkodzenia określonych struktur mózgu, pobudzenie ich (chemicznie, elektrycznie), badanie ekspresji białek c-fos. W podsumowaniu podkreślono wartość powyższego testu do oceny działania nowych leków przeciwlękowych.

**SUMMARY.** Conditioned fear (freezing) is one of the most interesting animal models of anxiety. It is designed for analysing mechanisms of emotional reactions and for testing new anxiolytic drugs. This paper presents also a brief review of animal models of mental disorders, including conditioned fear. Special attention is paid to brain structures involved in the acquisition and expression of fear responses and on methods used for their identification. The latter include selective lesions and electrical or chemical stimulation of brain structures, as well as expression of c-fos protein. In conclusion, predictive value of this test as a method of determining the action of new anxiolytic drugs is underlined.

---

**Słowa kluczowe:** test znieruchomienia / lęk / modelowanie zaburzeń emocjonalnych / psychofarmakologia przedkliniczna

**Key words:** freezing test / anxiety / emotional disorders modelling / preclinical psychopharmacology

---

Podejście redukcjonistyczne polega na założeniu, że nawet w złożonych układach neurobiologicznych, zjawiska i procesy można opisać i wyjaśnić, sprowadzając je do zjawisk i procesów przebiegających w ich elementach składowych. Podobne odniesienia można poczynić badając zachowanie ludzi i zwierząt. Podobne popędy, instynkty dotyczą całego

świata zwierzęcego, w szczególności ssaków. Tę obserwację zaczęto wykorzystywać przy modelowaniu różnych schorzeń występujących u człowieka, m.in. chorób psychicznych. Niestety, istnieją także poważne ograniczenia płynące z takiego modelowania. W porównaniu do zachowania zwierząt, na postępowanie ludzi składają się złożone procesy motywacyjne

Tablica 1. Przegląd niektórych modeli zwierzęcych dotyczących schizofrenii oraz depresji

<p><b>I. Przykłady modeli dotyczących schizofrenii</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Zaburzenia zachowania towarzyszące podawaniu amfetaminy</li> <li>● Zaburzenia zachowania towarzyszące podawaniu fencyklidyny</li> <li>● Zaburzenie selektywnej uwagi i habituacji w modelu <i>pre-puls inhibition</i> (osłabienie efektów bodźca bezwarunkowego poprzez poprzedzenie go bodźcem obojętnym)</li> <li>● Model neurorozwojowy Lipskiej i Weinbergera [22] (uszkodzenie brzusznych hipokampów u osesków szczurzych powoduje zmiany w funkcjonowaniu zwierząt w okresie ich dojrzałości charakteryzujące się zmnożeniem aktywności motorycznej, agresywności oraz spadkiem pozycji w hierarchii stada)</li> </ul>
<p><b>II. Przykłady modeli dotyczących depresji</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Depresyjny wpływ rezerpiny i innych leków o zbliżonym działaniu na zachowanie lokomotoryczne</li> <li>● Izolacja młodych małp od matek (obserwacja dotyczy zarówno młodej małpy jak i matki)</li> <li>● Test przewlekłego stresu Willnera i Pappa [34] (obserwacja zwierząt poddanych serii bodźców stresowych, takich jak: ograniczenie pokarmu, hałas, oziębienie, powodujących modelową anhedonię, tzn. spadek spożycia roztworu sacharoz)</li> <li>● Test Porsolta – test rezygnacji (immobilizacji) lub wymuszonego pływania</li> <li>● Test wyuczonej bezradności (<i>learned helplessness</i>)</li> <li>● Test polegający na znoszeniu przez leki przeciwdepresyjne niektórych objawów behawioralnych (wzrost aktywności i agresywności), powstających w wyniku uszkodzenia opuszek węchowych</li> <li>● Model przewlekłego stresu hamujący samopodawanie środków euforyzujących, takich jak amfetamina czy kokaina</li> </ul>

i emocjonalne dodatkowo komplikując trudną i niejednoznaczną ocenę ich mechanizmów.

Koncepcje badania procesów nerwowych i psychicznych u zwierząt skupiają się wokół dwóch zasadniczych podejść eksperymentalnych. Po pierwsze – są to metody umożliwiające obserwację i ocenę zachowania, po drugie – pozwalające śledzić pracę mózgu lub modyfikować jego czynność. Metody dotyczące obserwacji zachowania obejmują zarówno obserwację w środowisku naturalnym jak również badanie w warunkach laboratoryjnych. Śledzenie pracy mózgu i modyfikacja jego czynności dotyczyć może zarówno hamowania lub pobudzania czynności jąder mózgu, obserwacji zmian w jego funkcji po selektywnym uszkodzeniu struktur lub ich selektywnej stymulacji biochemicznej i elektrofizjologicznej. Kontrolowane parametry są bardzo liczne i obejmują: percepcję, emocje, uczenie się, pamięć krótko- i długotrwałą itp. [31].

Biorąc pod uwagę powyższe zastrzeżenia skonstruowano szereg złożonych modeli chorób psychicznych. Należy zaznaczyć, że spektrum chorób modelowych w psychofarmako-

logii jest bardzo szerokie i dotyczy zarówno całościowo potraktowanych zaburzeń psychicznych, np. niektóre modele depresji albo (co jest znacznie częstsze) poszczególnych symptomów chorób psychicznych, np. lęk w chorobach afektywnych czy schizofrenii (której objawy są jednymi z trudniejszych do modelowania) (tabl. 1).

Biorąc pod uwagę częstość występowania zaburzeń lękowych, rosnące tempo życia i jego coraz większą anonimowość, nie ulega wątpliwości, że stanowiąc będą one w przyszłości poważny problem terapeutyczny. Wymienione problemy dotyczące współczesnego człowieka stanowią wyzwanie dla psychofarmakologii i wskazują na potrzebę rozwoju modeli zwierzęcych pozwalających wniknąć w naturę chorób afektywnych i lękowych. Modele, które są obecnie stosowane dla badania wpływu nowych leków na emocje, wykorzystuje się, ogólnie rzecz biorąc, dla dwóch najważniejszych celów:

– po pierwsze – w celu *określenia działania psychotropowego nowych leków* o potencjalnym działaniu anksjolitycznym,

– po drugie – w celu wyjaśnienia mechanizmów fizjologicznych reakcji lękowych, np. określenia rodzaju neuroprzekazników uwalnianych w przebiegu reakcji lękowej czy też lokalizacji w o.u.n. poszczególnych struktur mózgu związanych z tą reakcją.

Oczywiście jest to problematyka powiązana ze sobą, ponieważ informacje o działaniu związków farmakologicznych dają także wyobrażenie o neurobiologicznych podstawach badanych reakcji, natomiast lepsze poznanie mechanizmów neurobiologicznych umożliwi bardziej selektywne poszukiwanie nowych związków leczniczych. Modele reakcji emocjonalnych służą do mierzenia bądź spontanicznego lęku opartego na naturalnej aktywności zwierzęcia lub do analizy zachowań bardziej skomplikowanych, np. nabytych nowych umiejętności (reakcji emocjonalnych motywowanych lękiem) [20, 26, 27].

Zwierzęce modele lęku powinny spełniać określone kryteria, aby mogłyby być uważane za wiarygodne. Efekt anksjolityczny uzyskany w badaniach na zwierzętach powinien korelować ze skutecznością kliniczną leków o ustalonej pozycji (walidacja metody), nie może wynikać z innego działania niż przeciwłękowe (np. wpływ amnestyczny czy przeciwbólowy). Ważne jest również, żeby skuteczność leku utrzymywała się po jego podaniach wielokrotnych, a także, aby więcej niż jedna grupa substancji powodowała redukcję lęku w danym modelu [6].

Przy konstruowaniu wiarygodnych zwierzęcych modeli reakcji psychicznych należy założyć homologię odpowiedzi, tzn. reakcji zwierzęcych i ludzkich. U ssaków te same bodźce lękowe mogą wywołać zróżnicowane, ale podobne (między gatunkami) reakcje: zniecierpliwienie (*freezing*), ucieczka (*flight*), groźenie obronne bądź atak (*defensive threat/attack*), a nawet udawanie śmierci (*death-feigning*) [27].

Modele badające zachowania lękowe posługują się nie tylko naturalnymi zachowaniami zwierząt, jak: lękiem przed nowym, nieznanym otoczeniem (neofobia), skłonnością do przebywania w ciemnym otocze-

niu (cecha charakterystyczna dla szczurów), ale także wykorzystują zachowania uwarunkowane oraz metody oparte na działaniu substancji o udowodnionych właściwościach prołękowych. Stosuje się także stymulację elektrofizjologiczną odpowiednich struktur mózgu, np. ciała migdałowego (tabl. 2).

Test otwartego pola jest jednym z częściej stosowanych testów. W teście tym bada się naturalny lęk gryzoni przed nowym otoczeniem (neofobia). Analizowana jest aktywność motoryczna, ilość wejść do jasno oświetlonego pola centralnego i czas w nim spędzony, a także tzw. efekt antytymotaktyczny (tzw. skłonność do trzymania się blisko ścian).

Test uniesionego labiryntu krzyżowego jest odmianą testu otwartego pola i polega na obserwowaniu zwierząt przemieszczających się między ramionami labiryntu w kształcie „plusa” (+), z których jedno są otwarte, tzn. nie mają ścian, podczas gdy inne są zamknięte, tzn. mają ściany. Mierzy się całkowitą aktywność zwierząt oraz eksplorację ramion otwartych. Wykorzystuje się tutaj, podobnie jak w otwartym polu, lęk przed nowym otoczeniem, a także przed otwartą przestrzenią (model neofobii i agorafobii).

Metody oparte na pomiarze aktywności lokomotorycznej i eksploracyjnej gryzoni są wrażliwe na niespecyficzne działanie ogólnie hamujące i depresyjne leków, np. benzodiazepin (BZD) i informacje uzyskane przy pomocy takich testów nie mogą być bezpośrednio przekładane na mechanizmy czy procesy towarzyszące zaburzeniom emocjonalno-lękowym u ludzi. Ponadto wiadomo, że wrażliwość zwierząt na anksjolityczne działanie BZD maleje wraz z wiekiem, tzn. im starsze zwierzęta są badane tym mniej widoczny jest efekt ich działania. W przypadku wpływu sedatywnego występuje przeciwna korelacja. U ludzi natomiast zaobserwowano odwrotną tendencję, czyli narastanie wrażliwości na anksjolityczne działanie BZD z wiekiem [17]. „Pełni agonści” kompleksu receptora GABA<sub>A</sub>, np. diazepam, powodują w teście uniesionego labiryntu

Tablica 2. Przegląd niektórych testów badających zachowania lękowe

I. Testy oparte na naturalnych reakcjach zwierząt (głównie neofobii)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Test otwartego pola</li> <li>● Test uniesionego labiryntu krzyżowego</li> <li>● Test wokalizacji osesków izolowanych od matek</li> <li>● Test zagrzebywania kulek</li> <li>● Test interakcji socjalnej</li> <li>● Testy hipertermii</li> <li>● Test swobodnej eksploracji</li> </ul>
II. Testy wykorzystujące zachowania uwarunkowane (reakcje instrumentalne)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Test Gellera-Seiftera</li> <li>● Test konfliktowy Vogla</li> <li>● Unikanie bierne i aktywne</li> <li>● Odruch wzdrygnięcia (<i>startle reflex</i>)</li> <li>● Warunkowanie lęku (<i>conditioned fear – freezing</i>), zarówno na otoczenie (kontekst) jak i na bodziec warunkowy</li> </ul>
III. Testy wykorzystujące metody farmakologiczne i elektrofizjologiczne
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Prołękowe działanie substancji takich jak pentybentetrazol</li> <li>● Model lęku panicznego występujący po stymulacji elektrycznej istoty szarej okółowodociągowej</li> <li>● Wywoływanie reakcji lękowych w odpowiedzi na stymulację elektryczną ciał migdałowych</li> </ul>

krzyżowego wzrost wyjść zwierząt na ramiona otwarte, nasilają zachowanie eksploracyjne zarówno po podaniach jedno- jak i wielokrotnych, w dawkach nie wpływających na ogólną aktywność motoryczną. W wyższych dawkach diazepam może zmniejszać aktywność motoryczną, co jest pochodną działania miorelaksacyjnego i wpływu sedatywno-nasennego [28].

Test separacji osesków szczurzych polega na izolowaniu małych szczurów od matek. Zwierzęta w tej wybitnie stresującej sytuacji emitują ultradźwięki jako sygnał zagrożenia, w stopniu zależnym od awersyjności warunków testu [1].

Interesujący koncepcyjnie jest również test zagrzebywania kolorowych kulek (*murble burying test*) polegający na tym, że zwierzęta (zwykle myszy) zakopują w ściółce kolorowe kulki, które są dla nich źródłem awersyjnych bodźców. Obserwator poprzez policzenie ilości zagrzebanych kulek może z dość dużą dokładnością wyskalować poziom lęku [6].

Test interakcji socjalnych przeprowadza się w warunkach silnej stymulacji awersyjnej,

tzn. w intensywnie oświetlonym pomieszczeniu w aparacie, do którego zwierzęta (szczury) nie są przyzwyczajone. Bada się w tym teście częstość i rodzaj kontaktów między zwierzętami, np. węszenie, kontakt bezpośredni, średni dystans utrzymywany między zwierzętami (najczęściej są to pomiary skomputeryzowane) [26].

Kolejny test mierzący wzrost temperatury ciała zwierząt poddanych działaniu bodźców stresowych opiera się na obserwacji, że przy kolejnym wyjmowaniu z klatki zwierząt hodowanych w kolonii, zwierzęta wyjmowane na końcu wykazują wyraźny wzrost temperatury ciała, efekt hamowany przez podanie benzodiazepin [1].

Testy oparte na działaniu środków prołękowych zwykle dotyczą hamowania czynności kompleksu receptora GABA<sub>A</sub>, związanego z kanałem chlorkowym. Zablokowanie go powoduje wystąpienie reakcji lękowych, ale także obniżenie progu drgawkowego (pikrotoksyna, bikukulina, pentybentetrazol) [20, 28].

Także metody polegające na stymulacji odpowiednich struktur mózgu (najczęściej

jądra migdałowe) są bardzo interesujące, ponieważ dostarczają nie tylko wiadomości o działaniu leków, ale także poszerzają wiedzę na temat znaczenia różnych struktur mózgu w procesach wzbudzenia i mediowania reakcji lękowych.

Model lęku panicznego polegający na stymulacji, przy pomocy prądu elektrycznego lub przez lokalne podanie aminokwasów pobudzających, istoty szarej okołowodociągowej (szczególnie grzbietowej jej części), albo środkowych części podwzgórza, wydaje się najbardziej wiernie oddawać objawy tego zaburzenia. Zwierzęta poddane tej procedurze intensywnie wokalizują, są pobudzone motorycznie, a czasem nawet dochodzi do napadu drgawek [16]. Wiadomo także, że gdy podobną stymulację wykonywano u ludzi poddawanych zabiegom neurochirurgicznym, relacjonowane przez nich doznania były zdecydowanie nieprzyjemne, z towarzyszącym wybitnym nasileniem odczuwania lęku [25].

## MODELE LĘKU UWARUNKOWANEGO

Modele polegające na warunkowaniu lęku są metodami interesującymi metodycznie oraz wnoszącymi stosunkowo dużo danych, nie tylko o charakterze testowanych substancji, ale także o funkcjonowaniu samego mózgu. Warto więc bardziej szczegółowo omówić niektóre z tych testów. Polegają one na połączeniu bodźca bezwarunkowego, jakim najczęściej jest łagodny szok elektryczny, z bodźcem warunkowym, którym może być samo otoczenie (warunkowanie do kontekstu), impuls świetlny czy też dźwięk o określonej częstotliwości i nasileniu. Najczęściej doświadczenie przeprowadza się w cyklu kilkudniowym. Pierwszego dnia zwierzęta są umieszczane na krótko (1–2 min.) w klatce, w której później będą badane. Pierwszy dzień testu ma za zadanie wywołanie śladów pamięciowych dotyczących otoczenia. Dzień kolejny jest dniem warunkowania. W tej samej klatce co poprzednio zwierzęta są poddawane poje-

dynczemu, bądź serii, bodźców elektrycznych o słabym nasileniu. Trzeciego dnia umieszcza się zwierzęta w tym samym miejscu i sprawdza ich reakcje lękowe wobec uwarunkowanego awersyjnie otoczenia. Zwierzęta oczekujące szoku elektrycznego przyjmują charakterystyczną postawę. Są znieruchomiałe (żadnych widocznych ruchów ciała poza niewielkimi ruchami bocznymi głowy oraz niezbędnymi do oddychania, włączając w to ruchy węszenia), w charakterystycznej skurczonej pozycji, a ponadto ich zachowanie charakteryzuje się nadwrażliwością na bodźce dotykowe i dźwiękowe. Mierzonym parametrem jest czas przebywania w znieruchomiałej pozycji (*freezing*) [29, 30]. Metoda ta ma wiele modyfikacji: np. szczur może być jedynie świadkiem sytuacji, w której inne zwierzę jest poddawane opisanemu procesowi warunkowania. Taki sposób nabywania reakcji awersyjnej przez wgląd, nazwano warunkowaniem społecznym. Efekty warunkowania przez wgląd są podobne do opisanych powyżej, tzn. występuje reakcja znieruchomienia. Co ciekawsze, w modelu samopodawania kokainy czy morfiny, zwierzęta warunkowane przez wgląd wstrzykują sobie zwiększone ilości leku, w porównaniu z efektami warunkowania wyłącznie przy pomocy szoku elektrycznego [33].

Źródłem opisanych reakcji jest percepcja sygnałów awersyjnych wywołujących lęk. Jak wspomniano, znieruchomienie charakteryzuje się stanem zredukowanej aktywności, z jednoczesną nadwrażliwością na bodźce dźwiękowe i dotykowe. Ten rodzaj zachowania jest bardzo często spotykaną w naturze reakcją na zagrożenie. Co ciekawe, na tym etapie reakcji awersyjnej zwierzęta zwykle nie wokalizują, tym samym nie sygnalizują stanu zagrożenia. Dzieje się tak ponieważ, jak się wydaje, w warunkach naturalnych wokalizacja zmniejszałaby szansę przeżycia osobnika ze względu na większe prawdopodobieństwo dostrzeżenia go przez potencjalnego drapieżnika. Istotnym jest również to, że znieruchomienie jest reakcją na zagrożenie lub na sygnały z otoczenia

informujące o potencjalnym zagrożeniu. Bezpośrednie zagrożenie wyzwała natomiast w zwierzęciu aktywne postacie reakcji obronnych, takie jak walka bądź ucieczka, ponieważ w tym przypadku znieruchomienie nie przyniosłoby już dodatkowych korzyści, nie zwiększając tym samym szansy przetrwania.

Test ten charakteryzuje się kilkoma cechami, które czynią go atrakcyjnym narzędziem badawczym. Testowane leki można stosować nie tylko w fazie badania wyuczonyj reakcji, czyli w dniu testu, ale również przed warunkowaniem lub po warunkowaniu. Czas podania badanych leków ma istotne znaczenie dla interpretacji otrzymanych wyników. W przypadku stosowania ich przed fazą warunkowania leki mogą wpływać na dużą ilość zmiennych i w ten sposób modyfikować obserwowaną reakcję. W związku z powyższym należy kontrolować ich działanie na:

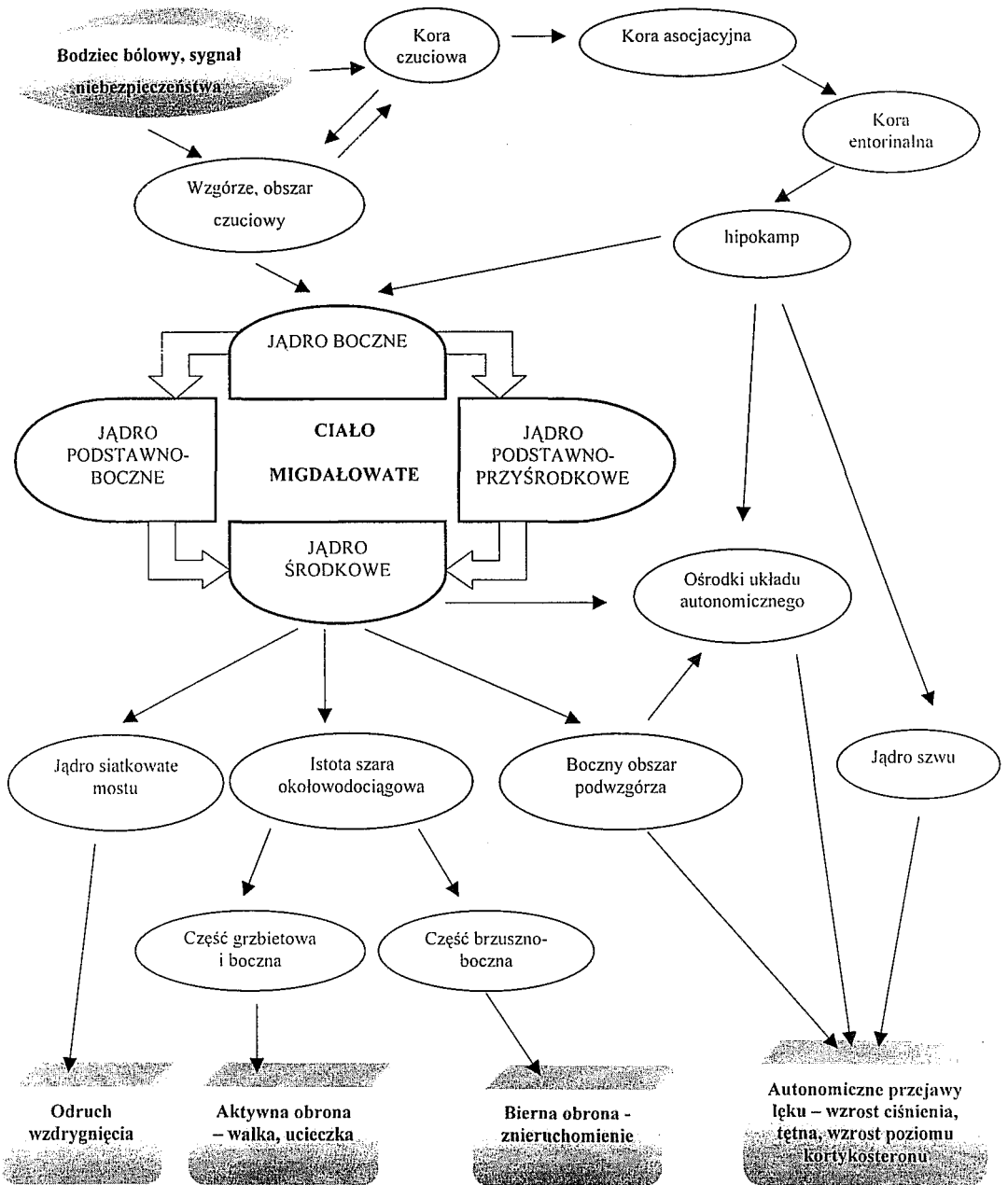
- próg bólowy i percepcję bodźców,
- uczenie i pamięć,
- pobudliwość o.u.n.,
- czynności emocjonalne i motywacyjne.

W przypadku zastosowania leków bezpośrednio po warunkowaniu reakcji lękowej należy przede wszystkim liczyć się z ich wpływem na procesy utrwalania śladu pamięciowego. Charakterystyka farmakologiczna środka również ma duże znaczenie, np. podanie midazolamu, leku z grupy benzodiazepin, powodować może niepamięć wsteczną i następczą, w ten sposób zakłócając nabywanie reakcji warunkowej w fazie utrwalania śladu pamięciowego.

Wydaje się, że najbardziej „czystą” interpretacyjnie sytuacją jest badanie wpływu leków na już wyrobioną reakcję lękową. W ten sposób wpływ anksjolityczny czy anksjogeny dotyczy jedynie ekspresji utrwalonej reakcji. Te bardziej szczegółowe uwagi metodyczne dotyczące jednego testu miały za zadanie pokazać stopień komplikacji problemów i złożoność zjawisk analizowanych przez psychofarmakologię eksperymentalną.

## ROLA UKŁADU LIMBICZNEGO

Układ limbiczny od dawna jest uważany za podstawową strukturę o.u.n. biorącą udział w powstawaniu i regulacji emocji (rys. 1). Struktury wchodzące w skład jąder limbicznych mózgu charakteryzują się wieloma wspólnymi cechami. Na przykład cechują się podobnym poziomem wzbudzenia potrzebnym dla wywołania reakcji emocjonalnych. Jedną z ich podstawowych ról (hipokampy) jest porównywanie dotychczasowych doświadczeń zakodowanych w mózgu, z aktualnie rejestrowanymi bodźcami. Funkcjonowanie hipokampalnego komparatora jest istotne w procesie dołączania nowych doświadczeń, a także dla adaptacji do nowego środowiska. Końcowym efektem działania struktur limbicznych jest aktywacja odpowiednich układów wykonawczych, w tym także autonomicznego i hormonalnego. Reakcje ucieczki, znieruchomienia czy agresji są sprzężone ze zmianami w czynności układu oddechowego i krążenia, a także z wydzielaniem adrenaliny i kortykosteroidów [19]. Bardzo wiele prac badawczych koncentrowało się na analizie udziału poszczególnych struktur mózgu w reakcjach lękowych. Zostały one obecnie dość dokładnie zidentyfikowane. Należą do nich struktury pozornie słabo ze sobą związane: kora przedczołowa, boczna część podwzgórza, ciała migdałowate – zarówno jądra boczne, jak i podstawno-boczne oraz jądro środkowe, grzbietowa i brzuszna część hipokampa, istota szara okołowodociągowa, a także dogłowa brzuszno-przyśrodkowa i brzuszno-boczna część rdzenia przedłużonego (rys. 1). Bodźce ze środowiska zewnętrznego są przewodzone drogą od receptorów sensorycznych do obszarów czuciowych wzgórza i kory czuciowej, a następnie do ciał migdałowatych, gdzie poprzez jądra boczne i przyśrodkowe dostają się do części środkowej. Kolejne projekcje przewodzą impulsy do jądra siatkowatego mostu, potęgując odpowiedź na uwarunkowany kontekst. Z kolei reakcja układu autonomicznego



Rysunek 1. Zmodyfikowany schemat obrazujący przewodzenie sygnałów w procesie warunkowania lęku wg Le Doux [1993]. Opis w tekście.

jest uzależniona od projekcji wychodzących z bocznego obszaru podwzgórza. Pozostałe elementy odpowiedzi behawioralnej są uza-

ależnione od aktywacji struktur istoty szarej okołowodociągowej, przy czym część brzuszna jest, jak się wydaje, odpowiedzialna za

biernie reakcje obronne typu *freezing*, natomiast część grzbietowa – za aktywną obronę typu walka czy ucieczka [5].

Obserwacje zmian w zachowaniu emocjonalnym i procesach neurovegetatywnych, występujących po drażnieniu wymienionych struktur mózgu, dowiodły ich zaangażowania w reakcjach typu defensywnego. Podobne informacje uzyskano po analizie zmian w zachowaniu, występujących na skutek selektywnego uszkodzenia struktur mózgu, pobudzaniu ich prądem elektrycznym lub aminokwasami pobudzającymi oraz drogą badania uwalniania w o.u.n. neuroprzekazników, w odpowiedzi na stres. W przypadku lęku uwarunkowanego jednym z najważniejszych efektów jest wzrost „obrotów” serotoniny w korze przedczołowej [11]. Zjawisko to występuje szczególnie silnie w regionie środkowym kory przedczołowej nasuwając wniosek, że jest to obszar o szczególnym znaczeniu w wywoływaniu reakcji lękowych. Do analizy tego problemu zastosowano technikę mikrodializy, pozwalającą na mierzenie zewnątrzkomórkowego stężenia serotoniny u zwierząt poddanych procedurze uwarunkowanego lęku. Po podaniu citalopramu (SSRI) obserwowano silny wzrost stężenia serotoniny w korze przedczołowej, skorelowany z wybitnym osłabieniem reakcji znieruchomienia. Powyższy fakt sugeruje, że SSRI (stosowane jako leki anksjolityczne w klinice) hamują reakcję znieruchomienia drogą selektywnego nasilania transmisji serotoninowej, zaburzanej w wybranych strukturach mózgu przez stres [11].

Bardzo obszerna literatura wskazuje, że ciało migdałowe także pełni istotną rolę w nabywaniu i ekspresji lęku warunkowanego. Uszkodzenie tej struktury w całości lub też niektórych jego jąder, np. bocznego lub centralnego (pełniących, jak się wydaje, podstawową rolę w ekspresji i nabywaniu lęku warunkowanego), powoduje bardzo wyraźne zaburzenia przebiegu procesów warunkowania emocjonalnego [13, 15, 18]. Obok wyżej wspomnianego ciała migdałowego, istotne są także projekcje do pnia mózgu i rdzenia przedłużonego (rys. 1). Są

to struktury integrujące różne elementy odpowiedzi lękowej. W badaniu struktur zaangażowanych w procesy warunkowania lęku wykorzystuje się także znakowane radioizotopem pochodne benzodiazepiny, tzn. leki o udowodnionej skuteczności zarówno w nabywaniu, jak i ekspresji lęku warunkowanego. Warto podkreślić, że największą koncentrację diazepamu, skorelowaną z efektami behawioralnymi, wykazano w jądrze podstawno-bocznym, a także w jądrze centralnym ciała migdałowego [13, 15, 18]. Agoniści receptorów BZD hamują nabywanie odpowiedzi uwarunkowanej oraz powstawanie uwarunkowanego lęku. Na przykład, podanie midazolamu przed procedurą warunkowania szokiem elektrycznym powodowało skrócenie czasu uwarunkowanego znieruchomienia u szczurów [10].

#### TEST ZNIERUCHOMIENIA („ZAMROŻENIA – FREEZING”)

Reakcja znieruchomienia (*freezing*) była także zredukowana przez bezpośrednie podanie midazolamu do brzuszno-bocznej części ciała migdałowego, przed warunkowaniem reakcji lękowej [10]. Sugeruje to rolę ciała migdałowego w amnestycznym działaniu BZD. Należy podkreślić, że podanie BZD do brzuszno-bocznej części ciał migdałowych wpływa także bardziej selektywnie na ekspresję zachowań uwarunkowanych lękiem [10].

Jedną z metod służących do lokalizacji struktur mózgu zaangażowanych w badane reakcje emocjonalne jest analiza występowania białka c-fos w o.u.n. Białko c-fos jest produkowane w neuronach i pozostaje tam przez krótki okres czasu. Produkcja tego białka jest związana z szybką odpowiedzią neuronów na wzrost stężenia cAMP lub cGMP, spowodowany bezpośrednim pobudzeniem neuronu. Tak więc białko c-fos jest wygodnym markerem do oznaczania poziomu aktywności neuronalnej różnych struktur o.u.n.

W wielu strukturach mózgu wykazano wzrost produkcji c-fos mRNA i podobnych białek w odpowiedzi na bodźce bólowe,



dźwiękowe, stresowe i lękowe, a także w przebiegu zespołów abstynencyjnych, w uzależnieniach lekowych. W przypadku uwarunkowanego lęku najbardziej aktywnymi regionami były ciała migdałowate (jądro centralne, boczne), środkowa część podwzgórza, miejsce sinawe, część grzbietowa istoty szarej okołowodociągowej i głębokie warstwy wzgórków górnych wzgórza [32]. Wzrost stężenia białek c-fos w odpowiedzi na lęk uwarunkowany był obserwowany także w neuronach dopaminergicznym brzusznego obszaru nakrywki (*ventral tegmental area*). Niestety wiadomo, że wzrost aktywności neuronów dopaminergicznym jest często związany z reakcją na mało specyficzne bodźce [9]. Ciekawym zjawiskiem towarzyszącym uwarunkowanemu lękowi jest pojawianie się hipoalgezji. Efekt ten jest prawdopodobnie związany z pobudzeniem projekcji dopaminergicznej do opioido-wrażliwych neuronów, znajdujących się w obszarze brzusznej istoty szarej okołowodociągowej, a także do brzusznej części nakrywki [8]. Wykazano, że podanie diazepam hamowało zarówno ekspresję uwarunkowanego lęku oraz hipoalgezję powodowaną przez lęk [14]. Wydaje się, że śródmózgowiowy układ dopaminergiczny jest zaangażowany w ekspresję różnych składowych reakcji lękowych. Wpływ lęku na poziom odczuwania bólu nie zaskakuje, jeśli uświadomimy sobie, że strach i lęk są reakcjami adaptacyjnymi wobec zagrożenia. Osłabienie odczuwania bólu na skutek silnej reakcji lękowej może zwiększać prawdopodobieństwo sukcesu w ewentualnej walce o przetrwanie.

Jak wyżej wykazano, ciała migdałowate są ważnymi strukturami z punktu widzenia organizacji odpowiedzi behawioralnej na bodźce lękowe. W chwili obecnej nie ulega wątpliwości, że równie ważnymi strukturami zaangażowanymi w tych procesach są hipokampy. Udowodniono, że uszkodzenia (lezje) grzbietowej części hipokampów powodują osłabienie zarówno nabywania, jak i ekspresji lęku uwarunkowanego [23, 24]. Zjawisko to dotyczyło głównie lęku warunkowanego na kontekst (otoczenie), a w mniejszym stopniu

wystąpiło wobec jasno określonych bodźców awersyjnych, takich jak światło czy dźwięk. Uszkodzenia hipokampów prawdopodobnie uniemożliwiają tworzenie wieloskładnikowych asocjacji, niezbędnych przy powstawaniu reakcji uwarunkowanych względem otoczenia. Pewne znaczenie może mieć też fakt, iż bodziec pojedynczy, ale jasno sprecyzowany, powoduje powstanie trwalszych śladów pamięciowych, trudniejszych do zaburzenia. Pełna ocena wpływu uszkodzeń grzbietowych części hipokampa jest utrudniona z powodu ich działania na lokomocję. Lezje hipokampów powodują bardzo silny wzrost lokomocji, przez co utrudniają jednoznacznie interpretację wyników [23, 24].

Kolejną strukturą o zasadniczym znaczeniu dla powstawania reakcji związanych z lękiem uwarunkowanym, jest istota szara okołowodociągowa. Selektywne uszkodzanie tej struktury wskazuje, że w reakcjach typu *freezing* bardziej zaangażowana jest jej część brzuszno-boczna niż grzbietowa [3]. Modele funkcjonalnej organizacji istoty szarej okołowodociągowej (PAG, *the midbrain periaqueductal gray*) dowodzą, że w regulacji odpowiedzi emocjonalnej na uwarunkowany lęk uczestniczy część brzuszno-boczna, część boczna oraz część grzbietowa, przy czym rola każdej z tych części jest odmienna. Wniosek ten wyciągnięto na podstawie analizy efektów miejscowych podań aminokwasów pobudzających [4]. Stwierdzono, że bezpośrednia aktywacja regionu brzuszno-bocznego istoty szarej okołowodociągowej (VLPAG), w przeciwieństwie do opisanych reakcji znieuruchomienia – *freezing*, wywołuje postać niereaktywnej immobilizacji, która jest opisywana jako skulona pozycja w klatce z obniżoną wrażliwością na bodźce dźwiękowe i dotykowe. Nie ulega wątpliwości, że nie jest to typowa reakcja znieuruchomienia, w której mamy do czynienia z nadwrażliwością na bodźce zewnętrzne.

Wybiórcze pobudzenie części bocznej i grzbietowej istoty szarej okołowodociągowej (LPAG) powoduje wystąpienie reakcji obronnych typu „paniczna ucieczka”, także

odmiennych od typowej reakcji typu zamrożenia, z nadwrażliwością eksteroreceptywną [7]. Dopiero aktywacja obu części PAG jednocześnie wyzwała zachowanie obronne cechujące się zniechęceniem z nadwrażliwością na bodźce zewnętrzne. Próby dokładnego wyjaśnienia roli istoty szarej okołowodociągowej w powstawaniu reakcji obronnych są trudne i wydaje się, że wzajemna współgra różnych jej części zapewnia efekt odpowiedni do typu zagrożenia (rys. 1).

Metodą pomocną w wyjaśnianiu podobnych wątpliwości jest badanie ekspresji białka c-fos, dla określenia aktywacji poszczególnych grup neuronów. Ta neurochemiczna metoda dostarcza bezpośrednich danych na temat zaangażowania poszczególnych struktur mózgu, w powstawaniu odpowiedzi behawioralnej. Jak wspomniano uprzednio, sprawdzenie obecności specyficznego białka (produktu genu c-fos) pozwala na precyzyjne określenie roli struktur o.u.n. w reakcji na bodźce środowiskowe, czynniki traumatyzujące, a także na leki psychotropowe. Wykazano, że w reakcji na bodźce lękowe największe stężenie c-fos wystąpiło w VLPAG, w porównaniu z pozostałymi regionami PAG [3]. Są to wyniki zgodne z danymi uzyskanymi w wyniku uszkodzenia tej struktury, w modelu uwarunkowanego lęku [3].

Przedstawione wyniki dowodzą, że jądra migdałowe, kora przedczołowa, hipokamper i PAG pełnią istotną i skoordynowaną rolę w regulacji elementów zachowania, aktywacji autonomicznego układu nerwowego i układu hormonalnego, tzn. zjawiskach towarzyszących powstawaniu i ekspresji zachowania lękowego typu zamrożenie, *freezing*. Potwierdzeniem takiej konkluzji jest fakt hamowania ekspresji białek c-fos, w wymienionych strukturach mózgu, przez diazepam [2]. W świetle jego powszechnie akceptowanego działania anksjolitycznego ta obserwacja może być uznana za kolejny dowód na udział wymienionych struktur o.u.n. w reakcjach lękowych. Ocena selektywności tego zjawiska biochemicznego jest jednak trudna, ponieważ bodźce prowadzą-

ce do wzrostu ekspresji c-fos w PAG mogą być także pochodzenia obwodowego. Wiadomo na przykład, że VLPAG otrzymuje, drogą z jądra pasma samotnego oraz rdzenia kręgowego, bodźce z receptorów czuciowych trzewnych i somatycznych. Zdziałanie bodźca bólowego, np. impulsu elektrycznego, może w ten sposób powodować wzrost ekspresji c-fos w VLPAG. Tak więc opisana reakcja nie musi być wyłącznie związana z samą reakcją „zamrożenia”, ale także z działaniem bodźca bólowego [3, 32].

Podsumowując, nie ulega wątpliwości, że liczne struktury mózgu są zaangażowane w reakcje obronne typu *freezing*, związane z warunkowaniem bodźców awersyjnych względem otoczenia. Dość dobre ich poznanie i zidentyfikowanie pozwala nie tylko na wysnuwanie wniosków co do funkcjonowania mózgu „emocjonalnego”, ale również na badanie substancji o działaniu potencjalnie anksjolitycznym. W tym modelu swoją skuteczność wykazały pochodne benzodiazepiny, agoniści receptorów 5-HT-1A, a także selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny [12]. Wszystkie te leki działają anksjolitycznie i są wykorzystywane w terapii rozmaitych zaburzeń lękowych. Fakt ten podkreśla wartość tego modelu dla określania przydatności innych związków o potencjalnym działaniu przeciwlękowym oraz korzystnie wyróżnia go na tle wielu współcześnie stosowanych testów. Właśnie te cechy zdecydowały o jego dokładniejszym przedstawieniu w niniejszym opracowaniu. Wiele danych wskazuje, że relatywnie dobrze poznane mechanizmy strukturalne i neuroprzekaznikowe spowodują, że będzie się stawał coraz popularniejszym testem w przedklinicznych badaniach procesów emocjonalnych oraz skringingu nowych leków przeciwlękowych.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bourin M: Animal models of anxiety: are they suitable for predicting drug action in humans? Polish J. Pharmacology 1997, 49, 79–84.

2. Beck CHM, Fibiger HC: Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: with and without diazepam pretreatment. *J. Neurosci.* 1995, 15, 709–720.
3. Carrive P, Leung P, Harris J, Paxinos G: Conditioned fear to context is associated with increase fos expression in the caudal ventrolateral region of the midbrain periaqueductal gray. *Neuroscience* 1997, 78(1), 165–177.
4. Carrive P: The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav. Brain Res.* 1993, 58, 27–47.
5. Charney DS, Deutch A: A functional neuroanatomy of anxiety and fear: implications for the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. *Critical Rev. Neurobiology* 1996, 10(3–4), 419–446.
6. De Boer SF, Van der Gugten J, Slangen JL: Behavioural and hormonal indices of anxiolytic and anxiogenic drug action in the shock prod defensive burying/avoidance paradigm. *Animal models in Psychopharmacology* 1991, Birkhauser Verlag Basel.
7. Depaulis A, Keay KA, Bandler R: Longitudinal neuronal organization of defensive reactions in the midbrain periaqueductal gray region of the rat. *Exp. Brain Res.* 1992, 90(2), 307–318.
8. Deutch AY, Tam SY, Roth RH: Footshock and conditioned stress increase 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in the VTA but not substantia nigra. *Brain Res.* 1985, 333, 143–146.
9. Guarraci FA, Frohardt RJ, Kapp BS: Amygdaloid D1 dopamine receptor involvement in Pavlovian fear conditioning. *Brain Res.* 1999, 827, 28–40.
10. Harris JA, Westbrook RF: Benzodiazepine induced amnesia in rats: reinstatement of conditioned performance by noxious stimulation on test. *Behav. Neurosci.* 1998, 112(1), 183–192.
11. Hashimoto S, Inoue T, Koyama T: Effect of conditioned fear stress on serotonin neurotransmission and freezing behavior in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1999, 378, 23–30.
12. Hashimoto S, Inoue T, Koyama T: Serotonin reuptake inhibitors reduce conditioned fear stress induced freezing behavior in rats. *Psychopharmacology* 1996, 123, 182–186.
13. Helmstetter FJ: Contribution of the amygdala to learning and performance of conditional fear. *Physiol. Behav.* 1992, 51, 1271–1276.
14. Helmstetter FJ: Stress – induced hypoalgesia and defensive freezing are attenuated by application of diazepam to the amygdala. *Pharmacol. Biochemistry Behav.* 1993, 44, 433–438.
15. Helmstetter FJ, Bellgowan PS: Effects of muscimol applied to the basolateral amygdala on acquisition and expression of contextual fear conditioning in rats. *Behav. Neurosci.* 1994, 108(5), 1005–1009.
16. Jenck F, Moreau JL, Martin JR: Dorsal periaqueductal gray induced aversion as a stimulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Res.* 1995, 57(2), 181–191.
17. Komiskey HL, Buck MA, Mundinger KL, Mc Sweeney FK, Farmer-Dougan VA, Dougan JD: Effect of aging on anticonflict and CNS depressant activity of diazepam in rats. *Psychopharmacology* 1987, 93, 443–448.
18. La Bar K, Le Doux JE: Partial disruption of fear conditioning in rats with unilateral amygdala damage: correspondence with unilateral temporal lobectomy in humans. *Behav. Neurosci.* 1996, 110(5), 991–997.
19. Le Doux JE: Emotional memory systems in the brain. *Behav. Brain Res.* 1993, 58, 69–79.
20. Lal H, Emmett-Oglesby MW: Behavioral analogues of anxiety. *Neuropharmacology* 1983, 12B, 1423–1441.
21. Lang PJ, Bradley MM, Cuthbert BN: Emotion, motivation and anxiety: brain mechanisms and psychophysiology. *Biol. Psychiatry* 1998, 44, 1248–1263.
22. Lipska BK, Weinberger DR: Neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Clin. Neurosci.* 1995, 3(2), 98–104.
23. Maren S, Aharonov G, Fanselow MS: Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav. Brain Res.* 1997, 88, 261–274.
24. McNish KA, Gewirtz JC, Davis M: Evidence of contextual fear after lesions of the hippocampus disruption of freezing but not fear potentiated startle. *J. Neurosci.* 1997, 17(23), 9353–9360.
25. Nashold BS, Wilson WP, Slaughter DG: Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J. Neurosurg.* 1969, 30(1), 14–24.

26. Płaźnik A: Metody psychofarmakologii doświadczalnej. *Post. Psychiatr. Neurol.* 1999, 8, 141–151.
27. Rodgers RJ: Animal models of anxiety: where next? *Behav. Pharmacol.* 1997, 8, 477–496.
28. Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A: Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian J. Medical Biological Res.* 1997, 30, 289–304.
29. Rudy JW., Pugh RC: A comparison of contextual and generalized auditory cue fear conditioning evidence for similar memory processes. *Behav. Neurosci.* 1996, 110(6), 1299–1308.
30. Sacchetti B, Lorenzini CA, Baldi E, Tassoni G, Bucherelli C: Auditory thalamus, dorsal hippocampus, basolateral amygdala and perirhinal cortex role in the consolidation of conditioned freezing to context and to acoustic conditioned stimulus in the rat. *J. Neurosci.* 1999, 19(21), 9570–9578.
31. Sadowski B, Chmurzyński JA: *Biologiczne mechanizmy zachowania.* PWN, Warszawa 1989, 25–30.
32. Sander G, Oberling P, Silveira MC, Di Scala G, Rocha B, Bagri A, Depoortere R: What brain structures are active during emotions? Effect of brain stimulation elicited aversion on c-fos immunoreactivity and behavior. *Behav. Brain Res.* 1993, 58, 9–18.
33. Van der Berg CL, Lamberts RR, Wolterink G, Wiegant VM, Van Ree JM: Emotional and footshock stimuli induce differential long-lasting behavioural effects in rats; involvement of opioids. *Brain Res.* 1998, 799, 6–15.
34. Willner P, Muscat R, Papp M: Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1992, 16(4), 525–534.

*Adres: Prof. Adam Płaźnik, Zakład Farmakologii i Fizjologii Układu Nerwowego IPiN  
02-957 Warszawa, Al. Sobieskiego 1/9  
e-mail: adaplaz@yahoo.com*