

Anksiyetenin Değerlendirilmesinde Güncel Olarak Kullanılan Bazı Deneysel Hayvan Modelleri

Nazan Dolu¹, Çiğdem Özesmi²

ÖZET:

Anksiyetenin değerlendirilmesinde güncel olarak kullanılan bazı deneysel hayvan modelleri

Hayvan modelleri, insanlardaki etyolojik ve ilaca cevap bakımından benzerlik gösteren duyulanım durumlarını (savunma davranışı gibi), hayvanların davranışlarını ve fizyolojik değişiklikleri inceleyerek ifade etmeyi sağlamaktadır. Laboratuvar hayvanlarında, anksiyeteyi gösteren davranış parametrelerini ölçmek için çeşitli testler geliştirilmiştir. Bu makalede fare/sıçanlarda anksiyete ile ilişkili türe özgü, özgün davranışlar anlatılacak, anksiyetenin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan ve iyi tanımlanmış olan yükseltmiş artı labirent veya aydınlık karanlık kutusu gibi testlerden bahsedilecektir. Anksiyetede hayvan modellerinin kullanımı yeni anksiyolitik ve anksiyojenik ilaçların araştırılmasında temel oluşturmaktadır. Bu durum duyulanım bozukluklarına karşı etkili ilaçların değerlendirilmesinde, hayvan modellerinin önemli ilerleme sağlayacağını göstermektedir. Makalemizde, bu modellerde kullanılan çeşitli ilaç uygulamaları ile ilgili önemli bulgular da sunulacaktır.

Anahtar sözcükler: anksiyete, yükseltmiş labirent, aydınlık karanlık testi, açık alan testi, Geller seiffer test

Klinik Psikofarmakoloji Bülteni 2004;14:216-225

ABSTRACT:

Overview of the some current experimental animal models for testing anxiety

Animal models attempt to represent human behaviors and physiological changes, in order to study the etiology and the effects of interventions on these behaviors. Various test paradigms have been developed to assess behavioral parameters indicating the anxiety in laboratory animals. In this article, species-specific behavioral expressions related to anxiety in rodents will be described. Some well-established and widely available tests for anxiety, such as the elevated plus maze or the dark/light box, will be investigated. The use of animal models of anxiety has been fundamental in the search for new anxiolytic and anxiogenic compounds. This represents a significant improvement over other animal models for evaluating drugs effective against emotional disorders. Another goal of this paper is to review the data about animal models in various drug applications.

Key words: anxiety, elevated maze, light dark test, open field test, Geller seiffer test

Bull Clin Psychopharmacol 2004;14:216-225

GİRİŞ

B indokuzyüzotuzaltı yılından günümüze kadar deney hayvanlarında anksiyeteyi gösteren davranış parametreleri incelenmiş ve bu davranışların ölçümü için çeşitli testler geliştirilmiştir. Bu testler yapılırken, insandaki anksiyetenin hayvanlardaki ile aynı oluşum mekanizmasına sahip olduğu düşüncesi temel alınmaktadır. Her ne kadar insanlardaki anksiyete mekanizması ile hayvanlardakinin aynı olduğuna dair kesin bir çalışma olmasa da, bugüne kadar deney hayvanları ile bir çok değerli çalışma yapılmış ve elde edilen bulgular anksiyetenin tedavisin-

de önemli yer tutmuştur (1).

Deney hayvanlarında uygulanan davranış yöntemlerinin çoğu iki ana grupta incelenmektedir. Birincisi; stres oluşturan fakat ağrı ya da rahatsızlık vermeyen bir uyarana karşılık (aşırı aydınlıkta gerçekleştirilen bir teste maruz kalma, yeni bir çevrede bulunma v.b.) hayvanların verdikleri uçma, savunma veya donma gibi spontan, doğal yani koşulsuz cevaplarının değerlendirildiği yöntemlerdir. İkincisi ise hayvanların stresli çoğunlukla da ağrılı bir uyarana karşılık (ayağından elektrik şokuna maruz kalmak gibi) verdiği koşullu cevapların değerlendirilmesidir.

Hayvanlardaki anksiyete modelleri kullanılan test sistemine kritik olarak

¹Doç. Dr., ²Prof. Dr., Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, 38039 Kayseri-Turkey

Yazışma Adresi / Address reprint requests to: Doç. Dr. Nazan Dolu, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, 38039 Kayseri-Turkey

Telefon / Phone: +90-352-437-4937/23308

Elektronik posta adresi / E-mail address: dolu@erciyes.edu.tr

Kabul tarihi / Date of acceptance: 18 Ağustos 2004 / August 18, 2004

bağlıdır. Normal anksiyetenin değerlendirilmesinde kullanılan testlerin çoğu koşulsuz cevabın ölçüldüğü test yöntemlerine dayanmaktadır. Patolojik anksiyetenin değerlendirilmesinde ise koşullu cevabın ölçüldüğü test yöntemleri tercih edilmektedir (2).

Türlerin davranışları, gelişmeleri süresince biçimlenmektedir. Hayvanlarda anksiyete için kullanılan bir testin, onun doğal anksiyete ilişkili davranışını sergilemeye izin vermesi testin güvenilirliği bakımından önemlidir. Bu bağlamda, öncelikle anksiyete ile ilişkili davranışsal boyutlar incelenecek ve koşullu-koşulsuz cevabın oluşturulmasını sağlayan deneysel hayvan modelleri tanıtılacaktır.

1. Anksiyete ile ilişkili davranışsal boyutlar

1. Korunmamış bölgeden sakınma
2. Risk ölçümü
3. Araştırma
4. Yiyecek ve su alımının önlenmesi
5. Öğrenme (kavrama)

2. Koşulsuz cevap ile ilgili testler

1. Açık alan
2. Yükseltilmiş labirent
3. Aydınlik-karanlık testi

3. Koşullu cevap ile ilgili testler

1. Geller-Seifter çatışma testi
2. Vogel çatışma testi
3. Ürkme cevabı

1. ANKSİYETE İLE İLİŞKİLİ DAVRANIŞSAL BOYUTLAR

1.1. Korunmamış Bölgeden Sakınma:

Yapılan çalışmalara göre, fare /sıçanlar yeni bir çevreye ilk girdiklerinde, eğer girdikleri alan korunmasız bir bölge ise, kaçma eğilimi gösterirler (2,3). Deneyin başlangıcında tipik olarak çevreyi araştırmaya duvar kenarı boyunca başlarlar ve açık alana çıkmaktan kaçınırlar (tigmotaksis). Bir alanın itici özelliği ışıklandırma seviyesi ile ayarlanabilir. Parlak ışık fare /sıçanların o alandan uzaklaşmalarına neden olur. Karanlık alanı tercih ederler.

Korunmamış bir alandan hayvanın uzaklaşmasına neden olan diğer etken o alanın yükseltilmiş olmasıdır.

Hayvanın bu yükseltilmiş alanın kıyı noktasını görmesi de, o alandan sakınması için iyi bir etkidir. Korunma davranışı, hayvanın görme kapasitesi, lokomotor aktivitesi, motive edici etkenler ve onun araştırma yöntemine bağlı olarak değişebilir (4). Kaçınma davranışının, benzodiazepinler gibi anksiyolitik ilaçlara duyarlı olduğu gösterilmiştir (5-7).

1.2. Risk ölçümü:

Fare / sıçan türleri tehdit eden bir uyarı ile karşılaşmalarında özgün davranışlar sergilerler. Uzanırlar ve havayı koklarlar (rearing). Bu risk ölçüm davranışıdır (8-10). Bu davranışın biyolojik işlevi, tehdit eden davranışla ilgili bilgi toplamak veya çevreyi incelemektir.

Risk ölçüm davranışı, aktif savunma yöntemi olarak düşünülmektedir (11,12). Bu anksiyete ile yakından ilişkilidir. Fare /sıçan'lar korunmasız alanda artmış risk ölçüm davranışı gösterirler. Çoğu araştırmacıya göre risk ölçüm davranışı diğer savunma yöntemlerinden daha duyarlıdır (13,14).

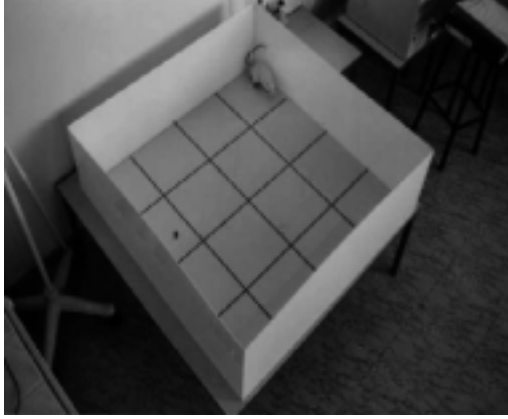
1.3. Araştırma:

Araştırma davranışı, fare / sıçanların bir yeniliği, bilinmeyen bölgeyi ya da objeyi araştırma ve potansiyel tehlikeden sakınma davranışları arasındaki çatışma ile değerlendirilmektedir. Bu davranış, risk ölçüm davranışı, yürüme, iki ayağı üzerinde kalkma, tırmanma, koklama ve objeyi elleme davranışları olarak özetlenebilir (2). Araştırma davranışı, dereceli olarak anksiyete ile inhibe olur. Böylece anksiyetenin dolaylı ölçüm yöntemi olarak tanımlanır (15-17). Araştırma davranışının inhibisyonu, anksiyolitik ilaçlarla geri döndürülebilir (5). Bu durum yüksek anksiyeteli hayvanlarda çok daha belirgindir.

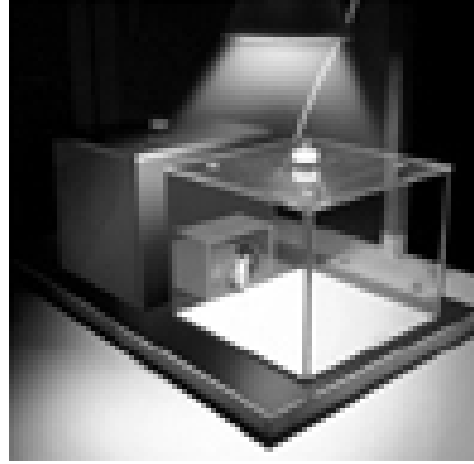
1.4. Yiyecek ve su alımının inhibisyonu:

Yeni bir çevreye bırakıldıklarında fare /sıçanlar bilmedikleri yemeği yemeye isteksizdirler (18,19). Yeni bir çevrede bulduklarında, hem de bilmedikleri bir yemek verildiğinde, bilmedikleri yemeği yemek için geçen zaman uzar. Bu yiyecek alma inhibisyonu anksiyolitik ilaçlarla ortadan kaldırılır (20,21). Ayrıca, total yiyecek tüketim miktarı anksiyolitik ilaçlarla artmaktadır (22).

Su alımının inhibisyonu daha çok koşullu cevap ile



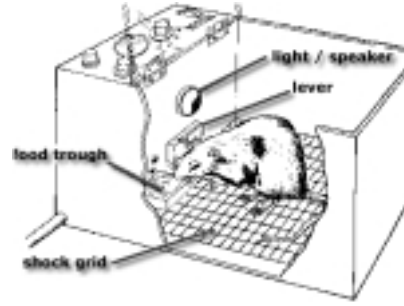
Şekil 1. Açık alan testi



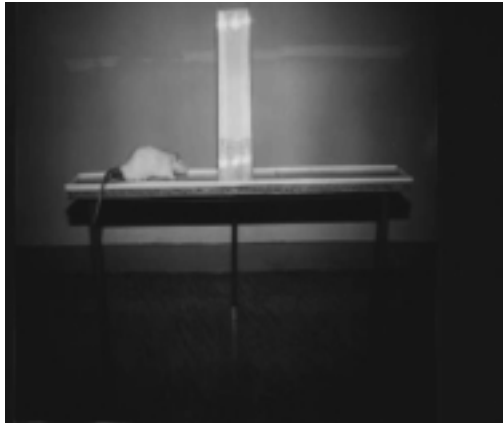
Şekil 4. Aydınlık karanlık testi



Şekil 2. Yükseltilmiş artı labirent



Şekil 5. Geller-Seifter Çatışma Testi

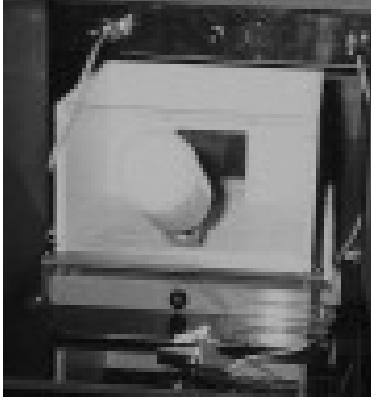


Şekil 3. Yükseltilmiş T labirent

ilgili testlerde uygulanmaktadır. Bu testlere en iyi bilinen örnek Vogel Çatışma Testi'dir (Bölüm 3.2, Şekil 6). Su kısıtlaması sonrası, anksiyolitik ilaçlar, şoklu su içmelerin sayısında artışa yol açmaktadır.

1.5. Öğrenme (kavrama):

Anksiyete ilişkili davranış ve öğrenme süreci temel olarak birbirini etkilemektedir. Öğrenme işlev bozukluğu, patolojik anksiyetenin primer özelliği olarak bildirilmiştir. C57BL/6 ve DBA/2 türü farelerde davranış ve öğrenme farklılıkları arasındaki ilişki çalışılmış ve yüksek anksiyetede öğrenme işlevinin inhibe olduğu bulunmuştur (1). Öğrenme süreci, anksiyete için karakterize edilen hayvan modellerinde ve anksiyeteyi düzenleyen ilaçlarda dikkatli olarak kontrol edilmelidir (23,24). Anksiyete ve öğrenmenin birlikte değerlendirilmesini sağlayan bir çok model geliştirilmiştir. Bunlara örnek olarak, yükseltilmiş labirent ile öğrenmenin değerlendirilmesi (Bölüm 2.2., Şekil 2,3), fare /sıçanın açık kollarından birinin uç noktasına bırakılması, 9 gün boyunca her gün deneyin tekrarlanarak kapalı kollara geçiş zamanının not edilmesi ile gerçekleştirilmektedir. Öğrenmede pasif kaçınma davranışı, aydınlık karanlık testi ile değerlendirilmektedir (Bölüm 2.3., Şekil 4). İlk gün



Şekil 6. Vogel Çatışma Testi

fare /sıçan aydınlık bölüme konur, karanlık bölmeye geçiş zamanı hesaplanır. Takip eden 9 günde yapılan deneylerdeki karanlık bölmeye geçiş zamanları karşılaştırılır. Aktif kaçınma davranışının araştırılması ise Geller-Seifter testi ile yapılmaktadır. Fare/sıçanlar ilk günden sonraki günlerde, rahatsız edici koşullu uyarana uygun cevap vererek koşulsuz uyarıyı kontrol etmeyi öğrenirler (Bölüm 3.1., Şekil 5) (25).

2. KOŞULSUZ ANKSİYETE İLE İLGİLİ TESTLER

2.1. Açık alan testi:

Koşulsuz anksiyete için kullanılan açık alan testi (Şekil 1) ilk kez 1936 yılında Hall tarafından tanımlanmıştır (26). Lokomotor aktivitenin değerlendirilmesi ile dolaylı olarak da normal anksiyetenin ölçümünde kullanılmaktadır. Günümüzde de hayvan fizyolojisinde en popüler testlerden biridir. Yöntem, genellikle bir fare /sıçan ve kaçması duvarlarla önlenmiş bilinmeyen bir çevreden oluşmaktadır. Bununla birlikte domuz, koyun, tavşan, piliç gibi hayvanlar da kullanılmıştır (27). Hall'un açık alanında test, dairesel (1.2 m çaplı), parlak ışıklı bir bölge ile etrafında duvarlar (0.45 m) bulunan düzenele gerçekleştirilmiştir. Sıçanlar duvara yakın konulmuş ve günün değişik zamanlarında 2 dakika gözlenmiştir. Anksiyeteli hayvanlar santral bölüme daha az girmişler ve daha fazla defekasyon yapmışlardır (26).

Açık alan testinde, çok farklı alan şekilleri uygulanmaktadır. Yuvarlak, kare, dikdörtgen şekillerinde yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Işıklandırma loş ışıktan aydınlığa, duvar dibinden veya yukarıdan, beyazdan

kırmızı ışığa değişik biçimlerde düzenlenebilmektedir. Alanda bazı objelerin varlığı (platform, kolon, tünel) yer alabilir (28). Deneyin başlangıcında hayvan duvara yakın ya da merkeze yerleştirilebilir. Kayıt süresi 2-20 dakika arasında değişmekle birlikte genelde 5 dakikadır (29). Serbest araştırma testinde, açık alan hayvanın kafesi ile bağlantılıdır, bu sayede hayvanın yeni çevreye serbest olarak ulaşımına izin verilmektedir (30). Tabanda işaretli çizgilerin geçiş sayısı (horizontal lokomasyon), vertikal aktivite (ayağa kalkışlarının sayılması), süslenme (grooming) değerlendirilmektedir (4). Süslenme davranışı, fare/sıçanlardaki stereotipik aktivite ile ilişkilidir. Artmış stereotipik aktivite deney hayvanının patolojik anksiyetesi hakkında dolaylı olarak fikir verebilir, ancak doğrudan anksiyete modeli veya testi olarak kullanılamaz.

Santral bölümde zaman geçirmede veya santral/total lokomasyon süresinde artma, santral bölüme geçiş latansında azalma, vertikal aktivitede (ayağa kalkışlarının sayılması) artma anksiyolitik etkiyi göstermektedir. Bu sayılan değerlerin azalması ise anksiyete işaretidir (27).

Anksiyete, açık alanda hayvanın sosyal grubundan ayrılması, agorafobi (alanın, hayvanın doğal çevresinden çok geniş olması), su ve yiyecek kısıtlaması (24-48 saat) ile tetiklenebilmektedir (4,27).

Açık alanda efektif ya da potansiyel anksiyolitik etkili ilaçlar (benzodiazepinler, serotonin ligandları, nöropeptidler), uyarıcı etkili ilaçlar (amfetamin, kokain), sedatifler (nöroleptikler), epileptik ilaçlar incelenmiştir.

GABA üzerine etkili ilaçlar: Klasik benzodiazepinler anksiyetenin klinik tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Benzodiazepinler GABA_A pentamer kompleksi üzerindeki benzodiazepin reseptörü yoluyla etki ederler. GABA_A reseptörü üzerinde 6 farklı bölge bulunmaktadır. Bunlar; benzodiazepin reseptörleri, barbitüratlar için bağlanma bölgeleri, nörosteroidler için bağlanma bölgesi, konvülsan ilaçlar, pikrotoksin ve t-bütill-bisiklofosforothionat için bağlanma bölgesi, flurosemid ve loreklozol bağlanma bölgeleridir. Benzodiazepin ve barbitürat reseptör agonistleri açık alan testinde anksiyolitik etki gösterirlerken, GABA_A'ya bağlanan diğer agonistlerde bu etki gözlenmemiştir (31).

Benzodiazepin reseptör agonistleri ile yapılan akut uygulama çalışmalarının %56'sında açık alanın santral bölgesine giriş yüzdesinde artma gözlenmiştir. Çalış-

maların %66'sında ise anksiyojenik etki bulunmuştur. Kronik enjeksiyonlarda %66'sında herhangi bir etki gözlenmemiştir. Etkilerdeki bu farklılıklar doza bağlanmıştır. Örneğin benzodiazepinlerin orta dozu sıçanlarda aktiviteyi azaltırken, farelerde artırmaktadır. Bu da santral bölgeye geçiş sayısını etkilemektedir. Bu yanıldan uzaklaşmak için, girişlerin tek tek sayılması yerine giriş yüzdelerinin hesaplanmasının daha doğru olacağı belirtilmektedir (27). Sonuç olarak, GABA_A reseptör agonistleri içeren çalışmaların %57'sinde, bu bileşiklerin gerçek etkilerini göstermede açık alan testi yetersiz kalmıştır. Barbitüratlar ise çalışmaların %75'inde açık alanda anksiyolitik etki göstermişlerdir.

Serotonerjik ilaçların etkileri: 1980'lerden günümüze 5HT_{1A} reseptörleri üzerinden aktivite gösteren ilaçlar çalışılmıştır. 5HT_{1A} reseptör agonistlerinin parenteral uygulanması genellikle açık alanda çalışılan hayvanlarda anksiyolitik etki oluşturur. 8-OH-DPAT (8 hidrokسيدopropilaminotetralin) ile yapılan çalışmaların %62.5'inde, buspiron ve ipsapron gibi parsiyal agonistlerle yapılan çalışmaların ise %73.3'ünde anksiyolitik etki gözlenmiştir. Dolayısıyla 5HT_{1A} reseptör agonistlerinin anksiyolitik etkilerinin açık alanda test edilmesi uygun bir yöntem olarak kabul edilmektedir (32).

Selektif serotonin reuptake inhibitörleri ile yapılan açık alan testi çalışmalarında anksiyolitik etki gözlenmemiştir. Bu ilaçlar ve trisiklik antidepresanlar panik atak, sosyal fobi, posttravmatik stres bozuklukları ve obsesif kompulsif bozuklukta fayda sağlamaktadır (33). Böylece açık alan testinin patolojik anksiyetede bir model olamayacağı sonucuna varılmıştır.

Açık alan testinin, stresli veya tehdit uyandıran bir durumla karşı karşıya kalındığı zaman oluşan normal anksiyete durumunda iyi bir model olabileceği sonucuna varılmıştır.

2.2. Yükseltmiş labirent:

Koşulsuz anksiyete için belki de en çok kullanılan bu test ilk kez File ve ark. (17) tarafından 1985 yılında uygulanmıştır. Yükseltmiş labirent testi, yerden belli yükseklikte, artı (Şekil 2), T harfi (Şekil 3) ve O harfi şekillerinde olabilen bir anksiyete ölçüm yöntemidir.

Artı labirent 2 açık, 2 kapalı ve bunların birleştiği merkez bölgeden oluşmaktadır. Fare için oluşturulan düzenekte kol boyutları genellikle 30x5 cm (boy x en),

yerden yükseklik 38.5cm'dir. Sıçanda ise kol boyutları 50x12 cm (boy x en), yerden yükseklik 50 cm'dir. Kapalı kolların 3 kenarı farede 15, sıçanda 40 cm yüksekliğinde kapatılmıştır. İki açık kol farede 0.25, sıçanda 1 cm yüksekliğinde çevrilmiştir. T labirent ise 2 açık, 1 kapalı koldan oluşmaktadır. Hayvanlar genellikle yükseltmiş labirentin merkezine bırakılır. Deneye 5 dakikalık alıştırma periyodundan sonra başlanır, 10 dakika gözlemlenir.

Test, yerden yükseklik, ışıklandırma ve açık kolların anksiyeteyi artırdığı esasına dayanmaktadır (34). Bu bağlamda, açık kola giriş sayısının ve açık kolda geçirilen sürenin artması artmış anksiyeteyi göstermektedir. Fare/sıçan labirentin merkezine bırakıldığında genellikle kapalı kolda kalır ve açık kola çıkmaktan kaçınır (10,17,35). Hayvanlar kapalı kolun sonuna yerleştirildiklerinde, kapalı kolda ilerleyip kafasını dışarıya çıkarmadıkça, açık kolu göremez. Açık kol üzerinde olmak onlara ürkütücü bir deneyim yaşatır. Çünkü fare/sıçanlar doğuştan açıklık ve yükseklikten korkarlar (17,36). Eğer hayvan tekrarlayan deneylerde sürekli kapalı kolun içine bırakılacak olursa, inhibitör kaçınma cevabını öğrenecektir. Diğer taraftan hayvan açık kolun sonuna yerleştirilecek olursa, kapalı kola doğru gider ki bu bir kaçınma cevabıdır. Kapalı kolda kalarak açık kola girmeme (inhibitör kaçınma) öğrenilmiş korkuyu gösterirken, açık koldan kaçma eğilimi doğuştan gelen korkudan kaynaklanmaktadır (37).

Fare (38,39) ve sıçan (40,41) davranışlarının etken - analiz çalışmalarına göre; Lister, açık kola giriş ve açık kolda kalma yüzdesini anksiyete etkeni, toplam kol girişlerini ise genel lokomasyon etkeni olarak tanımlamıştır. Rodger ve Johnson ise detaylı etolojik çalışmalarında anksiyete ile ilişkili 6 etken tanımlamıştır; motor aktivite, risk ölçümü, karar verme (yaklaşım ve itilme çatışması), vertikal aktivite, araştırma. Bunların yanı sıra defekasyon ve idrar yapma davranışları da skorlanabilir. Yaş ve cinsiyetin etkileri de çeşitli araştırmalarda incelenmiştir.

Yükseltmiş labirentte barbitüratlar, anksiyolitik etki gösterirken, benzodiazepinler selektif olarak açık koldan kaçınmayı azaltmışlar, antidepresanlar ise anksiyolitik özellik göstermemişlerdir (37,38).

5-HT üzerinden etki eden ilaçlar yükseltmiş artı labirentte çelişkili sonuçlar vermektedir. Selektif 5-HT_{1A} reseptör agonistlerinin (buspiron, 8-OH-DPAT) bu testte

anksiyolitik etki gösterdiği (42), anksiyojenik olduğu (43), hatta herhangi bir etkisinin olmadığı (44) bildirilmiştir.

Testin, aynı zamanda anksiyojenik ilaçların etkilerini tayin etmede geçerli ve güvenilir olduğu birçok araştırmada gösterilmiştir. Test, ilaç etkilerinin yanı sıra mutasyonların anksiyete üzerinde etkilerini araştırmak üzere de kullanılmaktadır. Bir çok transjenik mutant farelerde ve anksiyete benzeri etki oluşturulan fenotiplerde etki araştırılmıştır.

2.3. Aydınlik-karanlık testi:

Fare/sıçanların parlak ışıkla aydınlatılmış yeni bir çevreyi araştırmak, hem de bu bölgeden kaçınmak üzere duyduğu anksiyeteyi (neofobi) ölçmede kullanılan bir testtir.

Test düzeneği, aydınlık ve karanlık bölgeler olmak üzere iki kompartmandan oluşmaktadır (Şekil 4). İlk kez Crawley ve Goodwin (1980) (15) tarafından tasarlanmakla birlikte günümüzde bir çok modifiye modeli bulunmaktadır. İlk uygulandığında karanlık bölüm aydınlık bölümden daha küçük (1/3 karanlık, 2/3 aydınlık bölüm) toplam hacim 46x27x30 cm (boy x en x yükseklik) olacak şekilde yapılmıştır. 2 kompartman arasındaki geçiş deliği 7 cm'den büyük olmamalıdır (15,45). Daha sonraki modifikasyonlarda, iki bölüm eşit yapılarak, bir tünelle birbirine bağlanmıştır (20 x 20 x 45 cm) (46). Costall ve arkadaşları (1989) ise karanlık bölümü 2/3 olarak düzenlemişlerdir (47). Açık bölme, şeffaf plastik materyalle kaplanmış ve 150 W'lık ampulle aydınlatılmıştır. Kapalı bölme siyah plastik materyalle kaplanmış ve içeriye ışık sızdırması önlenmiştir. Burada güvenilir bölge karanlık bölüm, sakınılan bölge ise aydınlatılmış bölümdür. Deney hayvanı karanlık bölmeye yerleştirilerek aydınlık bölmeye ilk geçiş zamanı, aydınlık bölmede kalma zamanı, aydınlık ve karanlık bölmelere geçiş sayıları 5 dakikalık periyotta gözlemlenmektedir (6,45,48).

Anksiyolitiklerin kullanıldığı aydınlık karanlık testinin ilk tanımlanmasında 2 bölge arasındaki geçişler fotosellerle tayin edilmektedir. Belzung (1987), geçişleri ve her iki bölgede geçirilen zamanı ayrı ayrı ölçmüştür (46). Hayvanların bu bölgelerdeki lokomotor ve rearing hareketleri video ile kaydedilmektedir. Daha sonra lokomasyon, rearing, karanlık ve aydınlık bölgeler ara-

sındaki geçişleri otomatik olarak hesaplama yöntemleri geliştirilmiştir (49). Düzeneğin bilgisayarla kontrol edilmesi, hayvanların etraftaki minimal uyarılardan bile etkilenmelerini önlemek bakımından önemli olmuştur.

Çalışmalarda seçilen hayvan türlerinin önemli bir parametre olabileceği bildirilmektedir. C57B1/6J ve SW-NIH türleri aydınlık karanlık testte seçilebilecek uygun kemirgen türleri olarak belirtilmiştir (50). Fakat daha sonra Swiss türlerinin daha iyi cevap verdiği gözlemlenmiştir (51). Hayvanların ağırlıkları, yaşları ve nöral olgunlaşmaları da önemlidir. 4 haftalık genç fareler total test süresinin %58'ini karanlık bölümde geçirmişler, 8 haftalık yaşlı fareler ise total aktivitede, her bölümdeki aktivite ve geçiş sayılarında artış göstermişlerdir (52).

Benzodiazepinler ile bu testte anksiyolitik olarak güvenli sonuçlar elde edilmiştir. Bununla birlikte yüksek dozları, sedasyona neden olarak geçişlerde önemli azalmalara neden olmuşlardır (53).

5-HT üzerinden etki eden ilaçların bu testte anksiyojenik ya da anksiyolitik olarak belirli etkisi saptanmamıştır. 5-HT₂ agonistleri karanlık bölgede hareketleri anlamlı düzeyde azaltmakta ve aydınlıktan karanlığa geçiş latansları azalmaktadır. 5-HT₂ antagonistleri (ketanserin), bölümler arası geçişleri azaltmakta, karanlık bölümdeki hareketleri azaltmaktadır. 5-HT₂ reseptör ligandlarının anksiyolitik etkisi ile ilgili bir bulguya rastlanmamıştır. 5-HT₃ reseptör antagonistleri anksiyolitik benzeri etki oluştururken, ilaçların etkilerinin doza bağlı olarak değiştiği bildirilmektedir (52,54).

Antidepresanların akut uygulanmasında, aydınlık/karanlık testinde selektif serotonin gerialım inhibitörleri ile anksiyojenik etki gözlenmektedir (55,56). Sitalopramın anksiyeteye etkisi tam saptanamamışken, paroksetin anksiyojenik cevap oluşturmuştur.

Antipsikotiklerin akut uygulanmasında, siyamemazin karanlık bölgeye geçiş yüzdesini azaltmıştır (57). Klozapin ise karanlık bölgede geçirilen zaman yüzdesini azaltmıştır.

Sonuç olarak bu test anksiyojenik ve anksiyolitik ilaçların aktivitelerini değerlendirmede yararlı bir test olabilir. Çabuk ve kolay uygulanabilmektedir. Yiyecek, su kısıtlamalarına ve önceden alıştırma yapılmasına gerek yoktur. Doğal uyarı kullanılmaktadır. En iyi ölçüm, her iki kompartmandaki hareket-araştırma davranışlarının ve geçirilen zaman yüzdesinin hesaplan-

ması ile gerçekleşmektedir. Koşullu testlerden daha duyarlı olduğu bildirilmektedir (58).

3. KOŞULLU ANKSİYETE İLE İLGİLİ TESTLER

3.1. Geller-Seifter Çatışma Testi:

1960 yılında Geller ve Seifter tarafından tanımlanmış olan bu yöntem (Şekil 5) çatışma davranışları ve anksiyolitik ilaçların etkilerinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (59). Test iki dönemden meydana gelmektedir.

1. *Cezasız ödüllendirme dönemi (V1 dönemi= variable interval)*

Aç ve susuz olan hayvan pedala bastığında yiyecek ödülü alır. Ödüllendirilen basışlar arasında ödüllendirilmemiş basışlar da vardır. Ödüllendirilmemiş basışların sayısı sabit değildir. Hayvanın pedala kaç kez bastığı kaydedilir. Sonra cezalı ödüllendirme dönemine geçilir. Cezalandırma dönemine geçilirken ses veya ışık uyarını verilir.

2. *Cezalı ödüllendirme dönemi*

Bu dönemde her pedala basışta ödüllendirme yapılır. Ancak aynı anda hayvanın ayağına elektroşok uygulanarak cezalandırma da yapılır. Hayvanın pedala kaç kez bastığı kaydedilir. V1 döneminde pedala basma cevabı yüksek iken cezalı ödüllendirme döneminde pedala basış sayısı düşer.

Geller-Seifter testinde anksiyolitik ilaçlar kullanıldığında (özellikle benzodiazepinler), cezalı ödüllendirme döneminde basış sayısında meydana gelen azalma kısmen veya tamamen düzelmektedir. Bu azalma ilacın sıçandaki anksiyolitik özelliğinin bir göstergesi olarak kabul edilir. Anksiyolitik ilaçların V1 dönemine etkileri çok az ya da yoktur (60-62).

Modifiye Geller-Seifter testi:

Anksiyolitiklerin tekrarlayan uygulamalarında tolerans gelişip gelişmediği modifiye Geller-Seifter testi ile saptanabilir. Benzodiazepinlerin anksiyolitik etkilerine tolerans geliştiği bu testle gösterilmiştir [63]. Testlerine 20 dakikalık CRF dönemi ile başlamışlar, 3 gün CRF'den sonra V1 dönemine geçmişlerdir. V1 dönemi 10 saniye

ile başlanılmış, her 3 günde 10 saniye arttırılarak V1'de 1 dakikaya ulaşılmıştır. V1 1 dakika olarak 9 gün uygulanmış, bunu takiben V1 ve CRF dönemleri kombine uygulanmıştır. CRF döneminde şok uygulanması 0.5 sn süre ve 0.15 mA akım şiddeti ile başlanmış, ilerleyen günlerde yavaş yavaş arttırılarak 0.3 mA'e ulaşılmıştır. Kombine test uygulanması haftada 5 gün olmak üzere 3 hafta sürmüştür. CRF dönemi 5 dakika, V1 dönemi 2 dakika uzunluğunda olup; V1 dönemi 3 kez, CRF dönemi 3 kez olmak üzere bir deneme toplam 21 dakika uygulanmıştır.

3.2. Vogel Çatışma Testi:

1971 yılında Vogel ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan diğer bir çatışma testidir (Şekil 6) (64). Geller-Seifter testinin uygulamasının çok uzun sürmesi (bazen aylarca), her gün deneme yapmak ve tekrarlayan ölçümlerinin gerekliliği gibi dezavantajlarının ortadan kaldırılabilmesi amacıyla geliştirilmiştir. İlk uygulandığında sıçanlar 48 saat susuz bırakılmışlar ve 3 dakikalık teste tabi tutulmuşlardır. Sıçanlar şişeden su içme esnasında her 20 yalamadan sonra (21. yalamada), şişenin ağzından elektrik şoku verilmiştir. Anksiyolitik ilaçlar, şoklu su içmelerinin sayısında artışa yol açmışlardır.

Testin çeşitli modifiye uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Örneğin su kısıtlaması 18 saate indirilmiş veya bir günlük su kısıtlamasında arada 1 saat su içmelerine izin verilmiştir (65). Su kısıtlamaları sırasında sıçanların arada su içmelerine izin vermek, hayvanların test sırasında şişeye daha kolay ulaşmayı öğrenmelerini sağlamıştır. Kennett ise sıçanların deney ortamına alışmaları için, deneyden kısa bir süre önce deney kutusuna bırakmıştır (66).

Vogel ve arkadaşlarından sonraki çalışmacılar elektrik şoku şiddetini azaltmışlardır. Bu şekilde, düşük elektrik şoku şiddetinin, anksiyolitik ajanların test duyarlılığını arttıracaklarını ve anksiyojenik özelliklerin tayininin kolaylaşacağını ileri sürmüşlerdir.

Test süreleri genellikle Vogel ve arkadaşlarının uygulamaları ile benzerdir (3-5 dakika). Test süresinin uzun tutulmasının bir avantajı olmadığı gösterilmiştir. Cezanın uygulanma sıklığı Vogel ve arkadaşlarınınki gibi yalamalara göre ya da saniyelere göre ayarlanmıştır. Bu uygulamalarda da fark gözlenmemiştir.

Diğer ceza uygulanan testlerde olduğu gibi Vogel çatışma testi de yeni çıkan ajanların araştırılmasında kullanılmıştır. Benzodiazepinlerle yapılan çalışmalar diğer modellerle uyumlu bulunmuştur (65). Midazolamın dorsal hipokampüse direk uygulanması, cezalı dönemdeki cevapta artma meydana getirmiştir (67). Yine çeşitli benzodiazepin agonistlerinin (diazepam, midazolam, klordiazepoksid, flurazepam, lormazepam gibi) amigdalaaya direk uygulanması ile Vogel testinde anksiyolitik etkiler oluşturulmuştur (68-71).

5-HT_{1A} agonistlerinin dorsal rafe nükleusuna ve dorsal hipokampüse infüzyonunda ise cezalandırma döneminde doza bağlı cevap artışı gözlenmiştir. Cezasız dönemde bir etki oluşmamıştır (67,71,72).

3.3. Ürkme cevabı:

Koşullu korku cevabı olarak da isimlendirilmektedir. İlk kez Brown tarafından tanımlanmıştır (73). Koşul-

lu uyaran olarak bir ses uyararı verilmektedir. Koşullu uyarandan önce sakinme oluşturan koşulsuz bir ses uyararı verilmektedir. Sesten ürkme cevabı, koşullu anksiyetenin derecesini göstermektedir. Anksiyolitik ilaçlar ürkme cevabını azaltmaktadır (74,75).

SONUÇ

Koşullu ve koşulsuz anksiyetede kullanılan test yöntemleri, fare ve sıçanların anksiyete ilişkili davranış profillerinin değerlendirilmelerinde çok değerli araçlardır. Aynı zamanda, bu testlerin anksiyete üzerine potansiyel etkili ilaçların araştırılmasında da kullanışlı olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte test sonuçları, test şartlarından önemli olarak etkilenmektedir. Çalışmalar sırasında, anksiyetenin değerlendirilmesinde gözönünde tutulan araştırma ve kaçınma davranışı ile diğer genel aktivitelerin genetik ve çevre koşullarından etkilendiği mutlaka dikkate alınmalıdır.

Kaynaklar:

- Ohl F. Testing for anxiety. *Clin Neurosci Res* 2003; 3:233-238
- Belzung C, Le Pape G., Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurements of anxiety. *Physiol Behav* 1994; 56:623-628
- Barnett SA. The rat: a study in behavior, University of Chicago Press, Chicago, 1975
- Binder E, Droste SK, Ohl F, Reul JM. Regular voluntary exercise reduces anxiety-related behaviour and impulsiveness in mice. *Behav Brain Res* 2004; Article in Press, Corrected Proof
- Belzung C, Berton F. Further pharmacological validation of the BALB/c neophobia in the free exploratory paradigm as an animal model of anxiety. *Behav Pharmacol* 1997; 8: 541-548
- Chaouloff F, Durand M, Mormede P. Anxiety and anxiety-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light test. *Behav Brain Res* 1997; 85: 27-35
- Martin P. Animal models sensitive to anti-anxiety agents. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 1998; 393: 74-80
- Blanchard RJ, Blanchard DC. Anti-predator defence behaviors in a visible burrow system. *J Comp Psychol* 1989 ;103: 70-82
- Rodgers RJ, Cao B-J, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30: 289-304
- Weiss SM, Wadsworth G, Fletcher A, Dourish CT. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 1998; 23: 265-271
- Dielenberg RA, McGregor IS. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neurosci Biobehav Research* 2001; 25: 597-609
- Blanchard RJ, Griebel G, Blanchard DC. The Mouse Defense Test Battery. *Pharmacological and behavioral essays for anxiety and panic. Eur J Pharmacol* 2003; 463: 97-116
- Rodgers RJ, Cole JC. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper S.J. and Hendrie C.A., editors, *Ethology and Psychopharmacology*, Wiley, Chichester 1994: 9-44
- Shepherd JK, Grewal SS, Fletcher A, Bill DJ, Dourish CT. Behavioral and pharmacological characterization of the elevated 'zero-maze' as an animal model of anxiety. *J Psychopharmacol* 1994; 116: 56-64
- Crawley LN, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 1980;13:167-170
- Handley SL, Miithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model for 'fear-motivated' behavior. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1984; 327: 1-5
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985;14: 149-167
- Boissier JR, Simon P, Soubrie P. New approaches to the study of anxiety and anxiolytic drugs in animal. In: M. Airaksinen, Editor, *CNS and behavioral pharmacology*, Pergamon, New York, 1976: 13-222

19. Soubrie P, Kulkarni S, Simon P, Boissier JR. Effets des anxiolytiques sur la prose de nourriture des rats et des souris places en situation nouvelle ou familiere. *Psychopharmacologia* 1975; 45: 203-210
20. Hodges HM, Green SE, Crewes H, Mathers I. Effects of chronic chlordiazepoxide treatment on novel and familiar food preference in rats. *Psychopharmacology* 1981; 75: 311-314
21. Fletcher PJ, Davies M. Effects of 8-OH-DPAT, buspirone and ICS 205-930 on feeding in a novel environment: Comparison with chlordiazepoxide and FG 1742. *Psychopharmacology* 1990; 102: 301-308
22. Britton DR, Britton KT. A sensitive open field measure of anxiolytic drug activity. *Pharmacol Biochem Behav* 1981;15: 577-582
23. Hindmarch I. Cognition and anxiety: the cognitive effects of anti-anxiety medication. *Acta Psychiatr Scand* 1998; 98: 89-94
24. McNaughton N. Cognitive dysfunction resulting from hippocampal hyperactivity - a possible cause of anxiety disorder? *Pharmacol Biochem Behav* 1997; 56: 603-611
25. Kumar V, Singh PN, Muruganandam AV, Bhattacharya SK. Effect of Indian *Hypericum perforatum* Linn on animal models of cognitive dysfunction. *J Ethnopharmacol* 2000;72:119-128
26. Hall CS. Emotional behavior in the rat.III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *J Comp Physiol Psychol* 1936; 22: 345-352
27. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review *Euro J Pharmacol* 2003; 463: 3-33
28. Takahashi LK, Kalin NH. Role of corticotropin-releasing factor in mediating the expression of defensive behavior. In: Blanchard RJ, Brain PF, Blanchard DC and Parmigiani S, editors, *Ethoexperimental Approaches to the Study of Behavior*NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishing, Kluwer, Dordrecht, Boston, London 1989: 580-594
29. Golani I, Kafkafi N, Drai D. Phenotyping stereotypic behavior: collective variables, range of variation and predictability. *Appl Animal Behav Sci* 1999; 65: 191-220
30. Kopp C, Vogel E, Misslin R. Comparative study of emotional behavior in three inbred strains of mice. *Behav Proc* 1999; 47: 161-174
31. Belzung C, Griebel G, Dubois-Carmagnat F, Darves-Bornoz JM. Amino acid transmitter systems. In: D'Haenen H, den Boer JA,Willner P, editors, *Biological Psychiatry*, Wiley, Chichester, England 2002: 915-927
32. Belzung C. Rodent models of anxiety-like behaviors: are they predictive for compounds acting via non-benzodiazepine mechanisms?. *Curr Opin Invest Drugs* 2001; 2:1108-1111
33. Thomsen PH. Obsessive-compulsive disorder: pharmacological treatment. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2000; 9: 176-184
34. Wall PM, Messier C. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 2001; 25:275-286
35. Lister RG. Ethologically based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther* 1990; 46: 321-340
36. Montgomery KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J. Comp Physiol Psychol* 1955; 48: 254-260
37. Espejo EF. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. *Behav Brain Res* 1997; 86: 105-112
38. Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse, *Psychopharmacology* 1987; 92: 180-185
39. Rodgers RJ, Johnson NJT. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety, *Pharmacol Biochem Behav* 1996; 52: 297-303
40. File SE. Behavioural detection of anxiolytic action. In: Elliott JM, Heal DJ, Marsden CA editors. *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*, Wiley, Chichester, 1992: 25-44
41. Cruz AP, Frei F, Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behaviour on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1994; 49:171-176
42. Belzung C, Agmo A. Naloxone potentiates the effects of subeffective doses of anxiolytic agents in mice. *Eur J Pharmacol* 1997; 323: 133-136
43. Micheau J, vanMarrewijk B. Stimulation of 5-HT1A receptors by systemic or medial septum injection induces anxiogenic-like effects and facilitates acquisition of a spatial discrimination task in mice. *Prog Neuro Psych Biol Psych* 1999; 23: 1113-1133
44. Seale TW, Niekrasz I, Garrett KM. Anxiolysis by ethanol, diazepam and buspirone in a novel murine behavioral assay. *NeuroReport* 1996; 7: 1803-1808
45. Crawley JN. Evaluating anxiety in rodents. In: Crusio WE, Gerlai RT, editors, *Handbook of molecular genetic techniques for brain and behavior research*Techniques in the behavioral and neural sciences, Elsevier, Amsterdam 1999: 667-673
46. Belzung C, Misslin R, Vogel E, Dodd RH, Chapouthier G. Anxiogenic effects of methyl- -carboline-carboxylate in a light/dark choice situation. *Pharmacol Biochem Behav* 1987; 28: 29-33
47. Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. Exploration of mice in a black and white box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1989; 32: 777-785
48. Belzung C. Measuring rodent exploratory behavior. In: Crusio WE, Gerlai RT, editors, *Handbook of molecular genetic techniques for brain and behavior research*Techniques in the behavioral and neural sciences, Elsevier, Amsterdam 1999: 738-749
49. Young R, Johnson DN. A fully automated light/dark apparatus useful for comparing anxiolytic agents. *Pharmacol Biochem Behav* 1991; 40: 739-743
50. Crawley JN, Davis LG. Base line exploratory activity predicts anxiolytics responsiveness to diazepam in five mouse strains. *Brain Res Bull* 1982; 8: 609-612
51. Hascoët M, Bourin M. A new approach to the light/dark procedure in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1998; 60: 645-653

52. Bourin M, Hascoët M. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol* 2003; 463:55-65
53. Crawley JN. Neuropharmacologic specificity of a simple model for the behavioural actions of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 1981;15: 695-699
54. Griebel G, Perrault G, Sanger DJ. A comparative study of the effects of selective and non-selective 5-HT_{2C} receptor subtype antagonists in rat and mouse models of anxiety. *Neuropharmacology* 1997; 36: 793-802
55. File SA, Andrews N, Hoggs S. New developments in animal tests of anxiety. In: Westenberg HGM, Den Boer JA, Murphy DL, editors, *Advances in the Neurobiology of Anxiety Disorders*, Wiley, Chichester 1996: 61-79
56. Bodnoff SR, Suranyi-Cadotte B, Quirion R, Meaney MJ. A comparison of the effects of diazepam versus several typical and atypical antidepressant drugs in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology* 1989; 97: 277-279
57. Bourin M, Nic Dhonnchadha BA, Colombel MC, Dib M, Hascoët M. Cyamemazine as an anxiolytic drug on the elevated plus maze and light/dark paradigm in mice. *Behav Brain Res* 2001; 124: 87-95
58. Griebel G, Lanfumey L, Blanchard DC, Rettori MC, Guaardiola-Lemaitre B, Hamon M, Blanchard RJ. Preclinical profile of the mixed 5-HT_{1A}/5-HT_{2A} receptor antagonist S21357. *Pharmacol Biochem Behav* 1996; 54: 509-516
59. Geller I, Seifter J. The effects of meprobamate, barbiturates, d-amphetamine and promazine on experimentally induced conflict in the rat. *Psychopharmacology* 1960; 1: 482-492
60. Cook L, Davidson AB. Effects of behaviorally active drugs in a conflict-punishment procedure in rats. In: Garattini S, Mussini E, Randall LO, editors, *The benzodiazepines* Raven Press, New York 1973: 327-345
61. Cook L, Sepinwall J. Psychopharmacological parameters of emotion. In: Levi L, editor, *Emotions—Their parameters and measurement* Raven Press, New York 1975: 379-404
62. Sepinwall J, Grodsky FS, Cook L. Conflict behavior in the squirrel monkey: Effects of chlordiazepoxide, diazepam and N-desmethyldiazepam. *J Pharmacol Exp Ther* 1978; 204: 88-102
63. Smith RL, Barrett RJ. Tolerance to the anticonflict effects of diazepam: importance of methodological considerations. *Pharmacol Biochem Behav* 1997; 58(1): 61-66
64. Vogel JR, Beer B, Clody DE. A simple and reliable conflict procedure for testing antianxiety agents. *Psychopharmacology* 1971; 21: 1-7
65. Millan MJ, Brocco M. The Vogel conflict test: procedural aspects, gamma-aminobutyric acid, glutamate and monoamines. *Eur J Pharmacol* 2003; 463: 67-96
66. Kennett A, Lightowler S, Trail B, Bright F, Bromidge S. Effects of RO 60 0175, a 5-HT_{2C} receptor agonist, in three animal models of anxiety. *Eur J Pharmacol* 2000; 387:197-204
67. Stefanski R, Palejko W, Bidzinski A, Kostowski W, Plaznik A. Serotonergic innervation of the hippocampus and nucleus accumbens septi and the anxiolytic-like action of midazolam and 5-HT_{1A} receptor agonists. *Neuropharmacology* 1993; 32: 977-985
68. Hodges H, Green S, Glenn B. Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not on discrimination. *Psychopharmacology* 1987; 92: 491-504
69. Nagy J, Zambo K, Decsi L. Anti-anxiety action of diazepam after intra-amygdaloid application in the rat. *Neuropharmacology* 1979;18: 573-576
70. Shibata S, Kataoka Y, Gomita Y, Ueki S. Localization of the site of the anticonflict action of benzodiazepines in the amygdaloid nucleus of rats. *Brain Res* 1982; 234: 442-446
71. Menard J, Treit D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 1999; 23(4): 591-613
72. Higgins GA, Bradbury AJ, Jones BJ, Oakley NR. Behavioural and biochemical consequences following activation of the 5-HT 1-like and GABA receptors in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Neuropharmacology* 1988; 27: 993-1001
73. Brown JS, Kalish HI, Farber IE. Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus. *J Exp Psychol* 1951; 1: 317-328
74. Davis M, Falls WA, Campeau S, Kim M. Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. *Behav Brain Res* 1993; 58:175-198
75. Hijzen TH, Houtzager SW, Joordens RJ, Olivier B, Slangen JL. Predictive validity of the potentiated startle response as a behavioral model for anxiolytic drugs. *Psychopharmacology* 1995; 118:150-154