

Test testowi nierówny – o potrzebie standaryzacji badań na zwierzętach

Aleksandra Sawicka, Dominika Fortuna, Karolina Sieniawska,

Agnieszka Baranowska, Adrianna Szymeczko

Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii

E-mail: a.sawicka.698@studms.ug.edu.pl, d.fortuna.752@studms.ug.edu.pl,

k.sieniawska.687@studms.ug.edu.pl, a.baranowska.756@studms.ug.edu.pl,

a.szymeczko.762@studms.ug.edu.pl

Tutorka: dr hab. Agnieszka Kowalkowska, prof. UG

Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Katedra Cytologii i Embriologii Roślin

Konsultantka merytoryczna: dr Dorota Myślińska

Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka

Słowa kluczowe – *standaryzacja, badania na modelach zwierzęcych, test otwartego pola, szczur*

Wstęp

Badania naukowe obejmują szereg różnorodnych procedur, z których większość jest ustandaryzowana. Ścisłe ustalone procedury są opisane w diagnostyce mikrobiologicznej czy testach immunologicznych. Jedną z najbardziej opisanych procedur oraz najbardziej powtarzalną metodyką charakteryzuje się immunoenzymatyczny test ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) (Lequin, 2005). Jednakże, istnieje wiele gałęzi badań naukowych, w przypadku których nie ma ustalonego standardu ich przeprowadzania. Przykładem takiej dziedziny są badania na modelach zwierzęcych (Omary i in., 2016), które są kluczowe między innymi w medycynie, neurobiologii czy neuroimmunologii. Brak standaryzacji tych eksperymentów sprawia, że badania te są niepowtarzalne, a w rezultacie mogą nadal mieć negatywny wpływ

na naukę, jeśli badacze będą zmuszeni polegać na takich danych (Resnik i in., 2017). Choć naukowcy (Omary i in., 2016) zauważają, że standaryzacja powinna obejmować nie tylko stosowaną aparaturę, ale również dokładny przebieg doświadczenia, a także uwzględniać wszelkie czynniki mogące wpłynąć na wyniki badań, to nadal nie znajdujemy takiego standardu badań. Mimo braku uniwersalnych wytycznych dotyczących procedur eksperymentów na zwierzętach, wciąż prowadzone są wielośrodkowe, kosztowne badania, których wyniki nie mają dalszego zastosowania (Begley i Ioannidis, 2015; Resnik i in., 2017). Przykładowo, wielu naukowców nie opisuje aspektów, takich jak np. płeć oraz wiek zwierząt doświadczalnych, predyspozycje i obciążenia genetyczne, warunki hotelowania czy inne czynniki mogące mieć wpływ na behavior zwierząt (Tab. 1).

Poniższa praca ma charakter przeglądu. Jej celem jest: 1) opisanie czynników mogących wpływać na wyniki eksperymentów, 2) zwrócenie uwagi na możliwe konsekwencje wynikające z braku standaryzacji badań na zwierzętach, 3) dyskusja nad problemem bezpośredniego przekładania wyników badań przeprowadzonych na zwierzętach na prawdopodobne wyniki u ludzi, 4) wykazanie potrzeby standaryzacji badań na modelach zwierzęcych.

Działania prawne

Ustawa z dnia 15 stycznia 2015 r. reguluje zasady działania Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach (KKE). Do jej głównych zadań należy wydawanie opinii na temat praktyk stosowanych podczas przeprowadzanych badań na zwierzętach oraz kontrola działalności hodowców, dostawców oraz użytkowników zwierząt doświadczalnych. KKE nadzoruje również warunki utrzymywania zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych oraz przeprowadzanie wszelkich czynności zgodnie ze sztuką lekarsko-weterynaryjną. Jednostki takie jak KKE nie uwzględniają w swoich wytycznych standardów dotyczących warunków przeprowadzania procedur dotyczących testów behawioralnych, np. oświetlenia podczas testu, szczegółowego wyglądu aparatów testowych (podawane są jedynie sugestie optymalnych warunków) czy środków używanych do dezynfekcji. Podczas prowadzenia badań na zwierzętach zespół badawczy może korzystać również z zaleceń organizacji takich jak FELASA (*The Federation of European Laboratory Animal Science Associations*). FELASA zajmuje się opracowywaniem oraz publikacją rekomendacji dotyczących procedur wykonywanych w trakcie badań na modelach zwierzęcych, jednak stosowanie się do tych zaleceń nie jest w żaden sposób regulowane prawnie (Guillen, 2012). Do tej pory nie została powołana jednostka ustalająca szczegółowe wytyczne dotyczące sposobów przeprowadzania testów behawioralnych na modelach zwierzęcych.

Naszym zdaniem, jest potrzeba powołania takiej jednostki, która umożliwiłaby standaryzację procedur doświadczalnych na modelach zwierzęcych. Dodatkowo problemem jest brak głównej jednostki ustalającej standardy procedur takich badań na świecie, co umożliwiłoby porównywalność wyników badań z ośrodków badawczych ze wszystkich krajów. Niektóre czynności wykonywane podczas badań na modelach zwierzęcych są częściowo regulowane prawnie, np. metody uśmiercania gryzoni. Zgodnie z Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE, gryzoni nie można uśmiercać poprzez oszałamianie elektryczne, a uśmiercenie poprzez przedawkowanie środka znieczulającego można zastosować jedynie po uprzedniej sedacji.

Wybrane czynniki wpływające na przebieg doświadczeń na przykładzie badań z wykorzystaniem testu otwartego pola

Jednym z powszechniejszych testów behawioralnych jest test otwartego pola (OFT, ang. *open field test*) (Ryc. 1) - wykorzystywany do analizy poziomu zachowań lękowych czy eksploracyjnych (Hogg, 1996; Prut i Belzung, 2003). Mimo, że jest szeroko stosowany, warunki jego przeprowadzania znacznie różnią się w publikacjach. OFT ma najczęściej kształt kwadratu, co pozwala szczurom chować się w jego rogach. Umożliwia to analizę częstotliwości przebywania szczurów w peryferyjnych polach OFT, co jest miarą lękliwości. Istnieją również badania, w których OFT miał okrągły kształt (Nosek i in., 2008; Gould i in., 2009; Zhang i in., 2017). Jest to odmienny wariant testu, który pozbawia gryzonia możliwości spędzania czasu w rogach aparatu (Gould i in., 2009). Równie istotny jest materiał, z którego wykonany jest OFT. W badaniach wykorzystywane są aparaty wykonane między innymi z drewna oraz pleksiglasu. Niektóre materiały, takie jak drewno, bardziej pochłaniają zapachy i nie da się ich usunąć

przy pomocy dezynfekcji. Gryzonie są wrażliwe na bodźce zapachowe, a zapach, np. zestresowanego osobnika lub osobnika płci przeciwnej, może znacznie wpływać na behavior zwierząt podczas testu (Papes i in., 2018). Kolejnym czynnikiem, który może wpływać na uzyskiwane wyniki jest kolor OFT. Aparat testowy może mieć kolor czarny, szary lub biały. Dla szczurów jasne środowisko ma większe właściwości anksjogenne, więc stosowanie białego OFT może również rzutować na uzyskiwane wyniki (Seliger, 1977; Vuralli i in., 2019). Pora dnia przeprowadzenia testu OFT również wpływa na spontaniczną ruchliwość szczurów (Poveda i in., 2020), dlatego ważne jest, aby wykonywać go zawsze o tej samej porze. Mimo, że godzina przeprowadzenia testu jest ważna, część autorów nie podaje jej w publikacjach (Tab. 1). Istotnym czynnikiem wpływającym na zachowania szczurów jest wzbogacenie środowiska, np. poprzez dawanie im drewnianych gryzaków czy dodatkowych obiektów w klatkach. Zaobserwowano, że szczury żyjące w urozmaiconym środowisku wykazują odmienne zachowanie podczas testu otwartego pola, w porównaniu z tymi, które tych wzbogaceń nie miały (Gould i in., 2009).

Jedną z ważnych cech gryzoni doświadczalnych jest podział na HR (ang. *high responders* – wysoce reaktywne) i LR (ang. *low responders* – nisko reaktywne). Dokonuje się go w teście nowości, podczas którego mierzy się spontaniczną ruchliwość zwierząt w nieznanym im środowisku. Cecha ta nie tylko opisuje specyficzny behavior zwierząt (np. większa/mniejsza eksploracja, lękliwość), ale także ich cechy fizjologiczne (np. stężenie kortykosteronu) (Kabbaj i in., 2000). Odmienne cechy behawioralne i fizjologiczne mogą wpływać na uzyskiwane wyniki testów behawioralnych, w tym testu otwartego pola (Berrettini i in., 1994; Antoniou i in., 2008). Reaktywność gryzoni jest kluczowa podczas badań, jednak większość publikacji nie uwzględnia podziału zwierząt na HR/LR (Tab. 1).



Ryc. 1. Aparat testowy openfield w Katedrze Fizjologii Zwierząt i Człowieka na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, autor zdjęcia: Dominika Fortuna

Standaryzacja

Jak wspomniano w powyższym rozdziale, wiele czynników może mieć wpływ na wyniki testów behawioralnych (w tym OFT), jednak znaczna część badaczy nie opisuje ich w swoich publikacjach (Tab. 1). Poza wcześniej wymienionymi zmiennymi, znaczenie może mieć również płeć badaczy przeprowadzających testy behawioralne. Sorge i in. (2014) udowodnili, że zapach mężczyzny powoduje fizjologiczną reakcję stresową u szczurów i myszy. Jest to niezwykle istotny problem, gdyż zaobserwowano, że reakcja ta wywołuje analgezję charakterystyczną dla fizjologicznego stresu, a w konsekwencji może to znacząco wpływać na wyniki badań nad przeciwbólowymi środkami farmakologicznymi. Niestety, w publikacjach nie porusza się tematu płci osób przeprowadzających testy behawioralne (Tab. 1). Wiek osobników jest również istotnym czynnikiem. Młodsze szczury wykazują większą ruchliwość oraz zachowania eksploracyjne w testach behawioralnych (File, 1978; Wiley i Evans, 2008). Ponadto, nie ma wytycznych dotyczących preferowanej płci lub stosunku płci osobników badanych.

Tabela 1. Porównanie wybranych aspektów metodyki i materiałów w wybranych publikacjach z lat 2008-2021 wykorzystujących test otwartego pola

| | Kisková, Smajda (2008) | Abuhamdah i in. (2012) | Hughes i Hancock (2016) | Psyrdellis i in. (2016) | Zhang i in. (2017) | Li i in. (2018) | Pitsikas i in. (2019) | Renczés i in. (2020) | Tsuda i in. (2020) | Antunes i in. (2021) |
|----------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| Szczep szczurów | Sprague Dawley | Wistar | Wistar/Long-Evans | Wistar | Wistar | Wistar | Wistar | Wistar | Sprague Dawley | Wistar |
| Liczba zwierząt | 20 | 49 | 32 z każdego szczepu | 220 | 40 | 56 | 89 | 42 | 144 | 60 |
| Płeć zwierząt | samce | samce | 1:1 samce:samice (w obu szczepach) | samce | samce | samce | samce | samice | samce, samice | samce |
| Wiek zwierząt [dni] | 120 | - | ok. 150 | ok. 120 | - | 7 / 35 | ok. 90 | 360 | ok. 60 | 90-120 |
| Masa szczurów [g] | - | 190-210 | - | 274-496 | 180-200 | - | 250-300 | 362 ± 52 | - | 300 ± 50 |
| Kształt OFT | kwadrat | kwadrat | kwadrat | kwadrat | okrąg | kwadrat | kwadrat | kwadrat | kwadrat | kwadrat |
| Wymiary OFT [cm] | 100x100x60 | 80x80x50 | 60x60x25 | 50x50x50 | średnica: 90, wysokość: 60 | 100x100x40 | 40x40x40 | 100x100 | 100x100x50 | 60x60 |
| Materiał, z którego wykonano OFT | drewno | PVC | drewno | akryl | - | - | - | - | PVC | akryl |
| Kolor OFT | biały | szary | czarny | szary | czarny | czarne ściany, biała podłoga | - | - | szary | biały |

Tabela 1 (cd.). Porównanie wybranych aspektów metodyki i materiałów w wybranych publikacjach z lat 2008-2021 wykorzystujących test otwartego pola

| | Kisková, Smajda (2008) | Abuhamdah i in. (2012) | Hughes i Hancock (2016) | Psyrdellis iin. (2016) | Zhang i in. (2017) | Li i in. (2018) | Pitsikas i in. (2019) | Renczés i in. (2020) | Tsuda i in. (2020) | Antunes i in. (2021) |
|---|-------------------------------------|--|--|------------------------|---------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------|
| Godzina wykonania testu | - (ta sama podczas każdej próby) | - | - | - | - | - | 9.00 – 15.30 | 8.00 – 12.00 | - | - |
| Handling ("oswajanie") | - | - | - | - | - | - | - | - | 5 dni | - |
| Czy został uwzględniony podział na HR/LR* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Środek dezynfekujący | - | - | - | - | 5% roztwór alkoholu | 70% roztwór alkoholu | 20% roztwór alkoholu (etanol) | - | 70% roztwór alkoholu (etanol) | 70% roztwór alkoholu |
| Oświetlenie podczas testu | - | 186 lux | Przyćmione światło fluorescencyjne padające z góry | 100 W | 40 W | 20 lux | - | 25 lux | 50 lux | - |
| Temperatura hotelowania [°C] | - | 23 ± 1 | 22 ± 1 | ok. 22 | 22-25 | 22 ± 3 | 21±1 | 25 ± 2 | 22-24 | 22 ± 2 |
| Wzbogacenie środowiska | - | - | - | - | - | - | - | - | rukki, tunele | - |
| Płeć badaczy | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Dodatkowe aspekty | - | W OFT znajdował się dodatkowo obiekt wykonany z białej porcelany | - | - | - | - | - | - | - | - |

*HR – high responders, wysoce reaktywne; LR – low responders, nisko reaktywne; „-” brak danych w publikacji.

Większość badań przeprowadzanych jest na samcach (Beery i Zucker, 2011; McCarty i in., 2012). Wśród badań neurobiologicznych, opublikowanych w 2009 r., na 5,5 samców przypadła 1 samica (Beery i Zucker, 2011). Samce szczurów wykazują mniejszą ruchliwość oraz lękliwość (Scholl i in., 2019; Knight i in., 2021;). Dodatkowo, hormony płciowe mogą wpływać na metabolizm badanych substancji lub na przebieg choroby, dlatego wnioski z badań przeprowadzanych wyłącznie na samcach mogą nie mieć zastosowania w przypadku samic (Buters i Reichen, 1990; Wiley i Evans, 2008; McCarty i in., 2012). Pomimo, że wszystkie powyższe czynniki mogą znacząco wpłynąć na wyniki testów, część autorów nie wspomina o nich w swoich publikacjach (Tab. 1).

W 2009 przeprowadzono metaanalizę, która obrazuje powagę tego problemu. Kilkenny i in. przeanalizowali 271 publikacji, skupiając się na metodyce wybranych badań na modelach zwierzęcych. Wykazali, że szczep zwierząt użytych w doświadczeniach nie został podany w 1% publikacji, płeć zwierząt w ponad 25% publikacji, wiek w 57% badań, a w 54% brak informacji o masie ciała zwierząt. Dodatkowo, naukowcy w 4% badań nie podali liczby zwierząt badanych w doświadczeniu. Kilkenny i in. (2009) przeprowadzili również analizę jakości opisywanych przez nich badań i wskazali, że duża część doświadczeń nie została zaprojektowana w optymalny sposób.

Samokrytyczna debata dotycząca odtwarzalności eksperymentów w nauce toczy się od wielu lat, co pozwala udoskonalać system publikowania. Wielu naukowców skłania się ku stwierdzeniu, że, ich rolą jest prowadzenie badań, poprzez które chcą wносить do nauki nowe obiecujące odkrycia. Wskutek wielu prac naukowych, nastąpiła radykalna poprawa stanu wiedzy społeczeństwa w temacie chorób zakaźnych, chorób krążenia oraz onkologii. Jednakże, w przypadku niektórych wieloczynnikowych chorób złożonych, aktualna wiedza jest w dalszym

ciągu wybrakowana i niepełna (Begley i Ioannidis, 2015). Ostatnie lata potwierdziły słabość obecnego systemu badań i ich publikacji, wykazując nawet 75-90% ich niepowtarzalności. U podstawy tego zjawiska leżą powszechne i fundamentalne błędy w praktykach badawczych, takie jak brak standaryzacji testów behawioralnych, brak wielu istotnych danych w metodologii publikacji, czy wybór niewłaściwego modelu zwierzęcego. Błędy dotyczące badań podstawowych i przedklinicznych są istotne, ponieważ badania te są podstawą, na której opierają się przyszłe badania kliniczne. Obawy dotyczące nieodtwarzalności badań naukowych, nie podważają słuszności metod naukowych, są raczej pewnego rodzaju ostrzeżeniem w sferze inwestycji. Rzetelność badań naukowych pozwoli na efektywne wykorzystanie cennych środków. Należy dodać również, że brak powtarzalności badań naukowych jest znaczącym problemem dla małych firm, które w przeciwieństwie do dużych firm biotechnologicznych i farmaceutycznych, nie posiadają pokaźnego zaplecza finansowego, z którego finansowane są projekty naukowe i badania (Begley i Ioannidis, 2015).

Zwierzęta a ludzie

Gryzonie, w szczególności szczury i myszy, są szeroko stosowanymi organizmami modelowymi wykorzystywanymi do poznania różnorodnych zjawisk fizjologicznych. Decydując się na przeprowadzenie badania z udziałem zwierząt należy ustalić, czy uzyskane dane są wiarygodnym odzwierciedleniem procesów zachodzących w organizmie człowieka. Pomimo, że mózgowia gryzoni mają podobny plan budowy oraz homologiczne pętle neuronalne, to niektóre procesy fizjologiczne znacznie różnią się od tych, które obserwuje się u ludzi. Niestety, niewielu autorów publikacji opierających się na eksperymentach na zwierzętach wspomina o krokach jakie podjęli, aby zmaksymalizować prawdopodobieństwo, że ich badania będą prawidłowo odzwierciedlać badane zjawiska występujące u ludzi (Garner, 2014).

Przykładowo, powstało wiele badań nad wpływem stresu na fizjologię i behavior szczurów. Problemem jest to, że reakcja fizjologiczna szczurów wywołana stresem jest o wiele bardziej gwałtowna w porównaniu do fizjologicznej odpowiedzi na stres u człowieka (Sachar, 1975). Dodatkowo szczury wykazują odmienną aktywność enzymatyczną w porównaniu do ludzi. Głównym hormonem stresowym u szczurów jest kortykosteron, ponieważ w przeciwieństwie do naszego gatunku nie posiadają 17- α -hydroksylazy, który u człowieka jest przekształcany w kortyzol, główny hormon stresowy (Raff, 2016). Z powodu powyższych różnic, rezultaty badań mogą być znacznie odmienne u nas. Na przykład, prenatalny stres u szczurów zaburza produkcję testosteronu, co skutkuje feminizacją behawioru potomstwa (Ward, 1972; 1984). U ludzi nie obserwuje się tego efektu, gdyż prenatalny kortyzol koreluje ze stężeniem testosteronu we krwi płodu (Gitau, 2005). Ponadto, ciąża u szczurów trwa o wiele krócej niż u innych ssaków, przez co obserwowane efekty prenatalnego stresu mogą być bardziej wyraziste (Ward, 1984). Nasuwają się więc pytania: badanie skutków prenatalnego stresu na modelu szczurzym jest właściwe, skoro nie odzwierciedla w pełni procesów fizjologicznych zachodzących u człowieka? Czy nie powinniśmy badać tego zjawiska na innych modelach zwierzęcych (np. takich, u których ciąża trwa dłużej, tak jak u ludzi)? Szczury są zwierzętami, które są dobrze zbadane, a ich utrzymanie jest proste i tanie, dlatego są tak powszechnymi zwierzętami w badaniach. Jednym z wyzwań współczesnej neurobiologii jest dobór odpowiedniego gatunku modelu zwierzęcego do badanego zjawiska, tak aby jak najlepiej odzwierciedlał to zjawisko u ludzi (Żakowski, 2020). Wybór nieodpowiedniego organizmu modelowego może skutkować tym, że np. badany lek okaże się skuteczny na etapie przedklinicznym z udziałem zwierząt, natomiast na etapie klinicznym z udziałem ludzi okaże się

nieskuteczny lub jego skutki uboczne będą zbyt duże.

Od 80 do 97% substancji, które okazały się skuteczne na etapie przedklinicznym nie spełnia swojej roli w badaniach klinicznych. Powodem tego może być odmienność ludzi od zwierząt, złe modelowanie danej jednostki chorobowej (choroby wywołuje się sztucznie, np. przez lezje chemiczne, a u ludzi występują one naturalnie), brak możliwości dokładnego zbadania subtelnych różnic w poszczególnych chorobach (np. pogorszenie pamięci związane z procesem starzenia znacznie różni się od utraty pamięci w wyniku choroby Alzheimerera, czy urazu mózgu, a bada się je u zwierząt za pomocą tego samego testu – labiryntu wodnego Morrisa), czy też zbyt małej różnorodności próby doświadczalnej zwierząt, która nie odzwierciedla różnorodności płciowej, fenotypowej, czy też genetycznej w populacji ludzkiej (Garner, 2014; i literatura tam cytowana).

Podsumowanie

Standaryzacja badań umożliwia uzyskiwanie wiarygodnych oraz porównywalnych wyników. Brak instytucji, która wydawałaby wytyczne dotyczące projektów badań na modelach zwierzęcych sprawia, że nie jest możliwe by porównać eksperymenty. Zaniebdaniem jest brak w publikacjach kluczowych informacji dotyczących płci i wieku zwierząt doświadczalnych, płci badaczy oraz warunków przeprowadzanego badania i stosowanej aparatury. Ponadto, przy metaanalizach badań często pomija się ważne różnice między doświadczeniami, takie jak kolor zastosowanego aparatu czy stosowane środki dezynfekujące. Czynniki te mogą istotnie wpływać na behavior zwierząt, a w konsekwencji na wyniki badań. Z powyższych argumentów, możemy wywnioskować, że konieczne jest opracowanie wytycznych dotyczących badań na modelach zwierzęcych, celem zwiększenia ich wiarygodności i porównywalności.

Literatura

- Abuhamdah, R.M., van Rensburg, R., Lethbridge, N.L., Ennaceur, A., Chazot, P.L., 2012. Effects of methipip and JNJ-5207852 in Wistar rats exposed to an open-field with and without object and in Balb/c mice exposed to a radial-arm maze. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 6, 54.
- Antunes, F.T.T., de Souza, A.H., Caminski, E.S., Greggio, S., Venturin, G.T., da Costa, J.C., Taffarel, M., Rebelo, I.N., Gomez, M.V., Correa, D.S., Vilanova, F.N., Regner, A.P., Dallegrave, E., 2021. Neuroprotective effects of the CTX 01512-2 toxin against neurotoxicity induced by 3-nitropropionic acid in rats. *Neurotoxicology*, 87, 30-42.
- Beery, A.K., & Zucker, I., 2011. Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35(3), 565-572.
- Begley, C.G., Ioannidis, J.P., 2015. Reproducibility in science: improving the standard for basic and preclinical research. *Circulation Research*, 116(1), 116-126.
- Berrettini, W. H., Harris, N., Ferraro, T. N., Vogel, W. H., 1994. Maudsley reactive and non-reactive rats differ in exploratory behavior but not in learning. *Psychiatric genetics*, 4(2), 91-94.
- Buters, J.T., Reichen, J., 1990. Sex difference in antipyrine 3-hydroxylation. An in vivo-in vitro correlation of antipyrine metabolism in two rat strains. *Biochemical Pharmacology*, 40(4), 771-777.
- File, S.E., 1978. The ontogeny of exploration in the rat: habituation and effects of handling. *Developmental Psychobiology*, 11(4), 321-328.
- Garner, J.P., 2014. The significance of meaning: why do over 90% of behavioral neuroscience results fail to translate to humans, and what can we do to fix it?. *ILAR Journal*, 55(3), 438-456.
- Gitau, R., Adams, D., Fisk, N.M., & Glover, V., 2005. Fetal plasma testosterone correlates positively with cortisol. *Archives of disease in childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 90(2), F166-F169.
- Gould, T.D., Dao, D.T., Kovacsics, C.E., 2009. The Open Field Test. [w:] Gould, T. (red.), *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice*. Neuromethods, 42. Humana Press, Totowa, NJ.
- Guillen, J., 2012. FELASA guidelines and recommendations. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 51(3):311-321.
- Hogg S., 1996. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 54(1), 21-30.
- Hughes, R.N., Hancock, N.J., 2016. Strain-dependent effects of acute caffeine on anxiety-related behavior in PVG/c, Long-Evans and Wistar rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 140, 51-61.
- Kabbaj, M., Devine, D.P., Savage, V.R., Akil, H., 2000. Neurobiological correlates of individual differences in novelty-seeking behavior in the rat: differential expression of stress-related molecules. *Journal of Neuroscience*, 20(18), 6983-6988.
- Kilkenny, C., Parsons, N., Kadyszewski, E., Festing, M.F., Cuthill, I.C., Fry, D., Hutton, J., Altman, D.G., 2009. Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting of research using animals. *PLoS One*, 4(11), e7824.
- Kisková, J., Smajda, B., 2008. Open field behavior and habituation in rats irradiated on the head with gamma-rays. *Acta Physiologica Hungarica*, 95(3), 307-312.
- Lequin, R.M., 2005. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, 51(12), 2415-2418.
- Li, L., Kang, Y.X., Ji, X.M., Li, Y.K., Li, S.C., Zhang, X.J., Cui, H.X., Shi, G.M., 2018. Finasteride inhibited brain dopaminergic system and open-field behaviors in adolescent male rats. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 24(2), 115-125.
- McCarthy, M.M., Arnold, A.P., Ball, G.F., Blaustein, J.D., & De Vries, G.J., 2012. Sex differences in the brain: the not so inconvenient truth. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(7), 2241-2247.
- Nosek, K., Dennis, K., Andrus, B. M., Ahmadiyeh, N., Baum, A. E., Solberg Woods, L. C., Redei, E. E., 2008. Context and strain-dependent behavioral response to stress. *Behavioral and brain functions : BBF*, 4, 23.
- Omary, M.B., Cohen, D.E., El-Omar, E.M., Jalan, R., Low, M.J., Nathanson, M.H., Peek, R.M., Jr, & Turner, J.R., 2016. Not All Mice Are the Same: Standardization of Animal Research Data Presentation. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2(4), 391-393.
- Papes, F., Nakahara, T.S., Camargo, A.P., 2018. Behavioral Assays in the Study of Olfaction: A Practical Guide. *Methods in Molecular Biology*, 1820, 289-388.
- Pitsikas, N., Georgiadou, G., Delis, F., Antoniou, K., 2019. Effects of Anesthetic Ketamine on Anxiety-Like Behaviour in Rats. *Neurochemical Research*, 44(4), 829-838.
- Poveda, C. M., Popović, N., Morales-Delgado, N., De la Cruz-Sánchez, E., Caballero Bleda, M., Popović,

- M., 2020. The diurnal variation of open-field habituation in rats. *Behavioural processes*, 178, 104186.
- Prut L., Belzung C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*, 463(1-3), 3-33.
- Psyrdellis, M., Pautassi, R.M., Mustaca, A., Justel, N., 2016. Cholinergic transmission underlies modulation of frustration by open field exposure. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 140, 8-16.
- Raff, H., 2016. CORT, Cort, B, Corticosterone, and now Cortistatin: Enough Already!. *Endocrinology*, 157(9), 3307-3308.
- Renczés, E., Borbélyová, V., Steinhardt, M., Höpfner, T., Stehle, T., Ostatníková, D., Celec, P., 2020. The Role of Estrogen in Anxiety-Like Behavior and Memory of Middle-Aged Female Rats. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 11, 570560.
- Resnik, D.B., Shamoo, A.E., 2017. Reproducibility and Research Integrity. *Accountability in Research*, 24(2), 116-123.
- Sachar, E.J., 1975. Hormonal Changes in Stress and Mental Illness. *Hospital Practice*, 10(7), 49-55.
- Scholl, J.L., Afzal, A., Fox, L.C., Watt, M.J., Forster, G.L., 2019. Sex differences in anxiety-like behaviors in rats. *Physiology & Behavior*, 211, 112670.
- Seliger, D.L., 1977. Effects of age, sex, and brightness of field on open-field behaviors of rats. *Perceptual Motor Skills*, 45(3 Pt 2), 1059-67.
- Sorge, R.E., Martin, L.J., Isbester, K.A., Sotocinal, S.G., Rosen, S., Tuttle, A.H., Wieskopf, J.S., Acland, E.L., Dokova, A., Kadoura, B., Leger, P., Mapplebeck, J.C., McPhail, M., Delaney, A., Wigerblad, G., Schumann, A.P., Quinn, T., Frasnelli, J., Svensson, C.I., Sternberg, W.F., Mogil, J.S., 2014. Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nature Methods*, 11(6), 629-632.
- Tsuda, M.C., Mahdi, S., Namchuk, A., Wu, T.J., Lucki, I., 2020. Vendor differences in anxiety-like behaviors in female and male Sprague Dawley rats. *Physiology & Behavior*, 227, 113131.
- Vuralli, D., Wattiez, A.S., Russo, A.F., Bolay, H., 2019. Behavioral and cognitive animal models in headache research. *The Journal of Headache and Pain*, 20(1), 11.
- Ward, I.L., 1972. Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. *Science (New York, N.Y.)*, 175(4017), 82-84.
- Ward, I.L., 1984. The prenatal stress syndrome: current status. *Psychoneuroendocrinology*, 9(1), 3-11.
- Wiley, J.L., Evans, R.L., 2008. Evaluation of age and sex differences in locomotion and catalepsy during repeated administration of haloperidol and clozapine in adolescent and adult rats. *Pharmacological Research*, 58(3-4), 240-246.
- Zhang, M., Liu, Y., Zhao, M., Tang, W., Wang, X., Dong, Z., Yu, S., 2017. Depression and anxiety behaviour in a rat model of chronic migraine. *The Journal of Headache and Pain*, 18(1), 27.
- Żakowski W., 2020. Animal Use in Neurobiological Research. *Neuroscience*, 433, 1-10.

Notka o Autorkach

Autorkami są absolwentki III roku Biologii medycznej I stopnia na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego.

Studiowałam neurobiologię, ponieważ interesuję się mechanizmami funkcjonowania mózgu. Pracę licencjacką poświęciłam tematowi degeneracji tkanki mózgowej w przebiegu depresji. Jest to niezwykle ciekawy oraz poważny problem, a wiele zagadnień jest nadal niezrozumiałych. Poza neurobiologią interesuję się sztuką oraz kinematografią – Aleksandra Sawicka.

Studiowałam biologię medyczną I stopnia, specjalność neurobiologia. Wybrałam ten kierunek, ponieważ fascynuje mnie, jak mózgowie „kieruje” zachowaniem człowieka i innych zwierząt. Uwielbiam zwierzęta, a moim hobby jest akwarystyka. W moim akwarium żyją m. in. afrykańskie żaby karłowate – Dominika Fortuna.

Kierunek neurobiologia nie został wybrany przeze mnie przypadkowo, ponieważ jest to dziedzina biologii, która najbardziej mnie interesuje. Dobrostan zwierząt, również tych wykorzystywanych w doświadczeniach, jest dla mnie bardzo ważny. Do moich innych zainteresowań należą sztuka, moda i gotowanie – Karolina Sieniawska.

Studiowałam neurobiologię. Uważam, że badania nad układem nerwowym pozwalają lepiej zrozumieć biologię i funkcjonowanie naszego organizmu. Poza neurobiologią interesuję się również psychologią, sportem i gotowaniem – Agnieszka Baranowska.

Studiowałam diagnostykę molekularną i biochemiczną. Moje zainteresowania koncentrują się głównie wokół mikrobiologii, a szczególnie interesujące dla mnie zagadnienia dotyczą mikrobiomu człowieka i bakterii o właściwościach probiotycznych. Czas wolny poświęcam na rozwijanie pasji do literatury i sportu – Adrianna Szymeczko.

Esej powstał w trakcie ćwiczeń warsztatowych „Współczesne problemy naukowe w biologii – tutoring naukowy” prowadzonych przez dr hab. Agnieszkę Kowalkowską, prof. UG – tutorkę, której głównym nurtem badawczym jest tkanka wydzielnicza storczyków. Esej konsultowałyśmy z dr Dorotą Myślińską, zajmującą się badaniami na zwierzętach.