

Instytut Nauk Fizjologicznych Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

Zbigniew ROLIŃSKI, Włodzimierz KOZAK

**Badania nad selektywnym działaniem niektórych benzodwuzepin
na agresywność myszy wywołaną drażnieniem prądem**

Исследование селективного влияния некоторых бензодиазепинов на
агрессивность мышей, раздраженных электрическим током

Studies of Selective Effects of some Benzodiazepines on Aggression in Footshock-
-induced Fighting (FSIF) in Mice

Pochodne benzodwuzepiny stanowią najliczniejszą grupę leków ataraktycznych używanych w lecznictwie. Leki te stosowane są przede wszystkim w terapii zaburzeń emocjonalnych — w stanach lęku, napięcia, agresywności. Wykazują również działanie przeciwdrgawkowe oraz miorelaksacyjne (19). Związki te są obecnie częściej stosowane niż barbiturany ze względu na większą skuteczność i słabsze działanie uboczne (14, 23, 26, 30). Wykazano, że benzodwuzepiny hamują występowanie agresywności w różnych modelach agresywnego zachowania zwierząt laboratoryjnych (1, 2, 17, 27, 32). Stwierdzono jednocześnie, że w poszczególnych modelach agresywnego zachowania benzodwuzepiny działają w różnym stopniu (5), często dopiero w dawkach zbliżonych do neurotoksycznych lub wyższych.

Zastosowanie tych leków w mniejszych dawkach podawanych jednorazowo (3) lub chronicznie (8, 9, 12) może nasilić częstość i intensywność pojawiania się stanów agresywnych. Może to być związane z tym, że leki te w pewnych przypadkach wyzwalają napastliwość w wyniku zniesienia lęku. Stwierdzono, że flurazepam i inne benzodwuzepiny mogą wyzwalać „paradoksalny” wzrost napastliwości u ludzi (11). Niektórzy autorzy uważają, że benzodwuzepiny wpływają hamująco na defensywno-agresywne reakcje stosunkowo selektywnie, natomiast w zachowaniu typu „atak” ich działanie antyagresywne obserwuje się dopiero po bardzo wysokich dawkach, przekraczających dawki neurotoksyczne (5). Z obserwacji na zwierzętach dzikich w ZOO wynika, że benzodwuzepiny są skuteczne w stanach agresywnych, których podłożem jest strach, ponieważ w takich przypadkach działają w stosunkowo niskich dawkach (13). Różna skuteczność benzodwuzepin w stanach agresywności z jednej strony wynika prawdopodobnie z wpływu tych leków na cały szereg neuronalnych systemów (4, 10), a z drugiej strony z faktu, że poszczególne postacie agresywności różnią się w swoim neurochemicznym profilu (18).

W badaniach nad agresywnością wywołaną drażnieniem prądem elektrycznym (footshock induced fighting — FSIF) również wykazano antyagresywne działanie benzodwiazepin, jednak wyniki poszczególnych autorów w przypadku tego modelu zachowania agresywnego znacznie się różnią. Sofia (27) obserwowała tłumienie agresywności w FSIF dopiero po dawkach zbliżonych do neurotoksycznych, natomiast Christmas i Maxwell (1) uzyskali efekt antyagresywny po dawkach nie zaburzających koordynacji nerwowo-mięśniowej. Tak zróżnicowany stopień skuteczności benzodwiazepin w stanach agresywnych uniemożliwia dokładne wyjaśnienie mechanizmu antyagresywnego działania tych leków. Można przypuszczać, że kompleksowe scharakteryzowanie i ustalenie dokładnej lokalizacji receptorów benzodwiazepin w OUN doprowadzi do wyjaśnienia mechanizmu ich działania, w tym także ich efektów antyagresywnych (15, 28, 29).

Celem naszej pracy było zbadanie efektów antyagresywnych wybranych benzodwiazepin w FSIF u myszy oraz ustalenie, które leki z tej grupy odznaczają się najbardziej selektywnym działaniem w użytym modelu agresywności.

MATERIAŁ I METODY

Zwierzęta. Badania wykonano na białych myszach, samcach szczepu Swiss o wadze 19—22 g. Myszy trzymane były w klatkach po 10 w każdej, otrzymywały pokarm i wodę *ad libitum* i przebywały w pomieszczeniu o regulowanym 12-godzinnym cyklu światło—ciemność.

FSIF. Zachowanie agresywne myszy w FSIF wywoływano wg metody Tede-schi i wsp. (31). Pary myszy poddawano działaniu impulsów elektrycznych o napięciu 400 volt, energii 80 mJ z częstotliwością 1 impulsu na sek. Szczegółowy opis metody podano we wcześniejszej pracy (24). Użyte leki badano w dwóch testach trwających każdy po 180 sek. wykonywanych w odstępie 1 godz. Każdy lek testowano przy użyciu 4—8 par myszy agresywnych na każdą dawkę. Przy testowaniu każdego leku używano grupę kontrolną, 5 par myszy agresywnych, którym podawano odpowiedni rozpuszczalnik.

Leki. Do badań użyto: diazepam (Relanium-Polfa) 5, 10 i 15 mg/kg; temazepam (Signopam-Polfa) 1,5, 2 i 3 mg/kg; nitrazepam (Nitrazepam-Polfa) 0,25, 0,5 i 1 mg/kg; medazepam (Medazepam-Polfa) 1,5, 2,5, 5 i 10 mg/kg; clobazam (Clobazam-Hoechst AG) 1, 2 i 3 mg/kg; oxazepam (Oxazepam-Polfa) 3, 5 i 10 mg/kg; lorazepam (Lorans-Schiapparelli) 0,75, 1 i 3 mg/kg; chlordiazepoksyd (Elenium-Polfa) 5, 15 i 25 mg/kg; heksobarbital (Narcosanum-Polfa) 120, 175 i 200 mg/kg; pentobarbital (Nembutal-Abbott) 5, 15, 25 mg/kg. Wszystkie badane leki podawano 30 min. przed I testem dożyłkowo sondą w postaci zawiesiny w 1% roztworze metylocelulozy.

Działanie antyagresywne. W celu ustalenia selektywnego antyagresywnego działania badanych benzodwiazepin określono następujące efektywne dawki (ED_{50}) tych leków: 1) ED_{50} antyagresywną (AA), tj. dawkę, która redukowała ilość epizodów walki o 50% w porównaniu do kontroli, 2) ED_{50} neurotoksyczną (NDT), tj. dawkę, która powodowała u 50% testowanych myszy spadanie z pręta obrotowego w ciągu 5 min. Badania działania neurotoksycznego wykonano wg metody Dunham i Miya (6). Leki podawane były w analogicznych warunkach jak w FSIF w następujących dawkach: diazepam — 7, 10 i 15 mg/kg; temazepam — 3, 6 i 8 mg/kg; nitrazepam — 1,25, 1,5 i 3 mg/kg; medazepam — 7, 8,5 i 10 mg/kg; clobazam — 2, 7 i 10 mg/kg; lorazepam — 3, 5 i 7,5 mg/kg; chlordiazepoksyd — 5,

10 i 25 mg/kg; heksobarbital — 50, 75 i 150 mg/kg; pentobarbital — 10, 25 i 35 mg/kg. Obie efektywne dawki obliczono wg metody Litchfielda i Wilcoxa (16).

Dla określenia rozpiętości pomiędzy dawką antyagresywną a neurotoksyczną badanych leków wyznaczono indeks terapeutyczny:

$$IT = ED_{50}NTD / ED_{50}AA$$

WYNIKI

Określono siłę działania antyagresywnego, a także neurotoksycznego wybranych benzodwazepin w porównaniu z heksobarbitem i pentobarbitem. Miarą selektywności antyagresywnego działania testowanych benzodwazepin w FSIF u myszy było zestawienie dwu efektywnych dawek (ED_{50} mg/kg), tj. działania neurotoksycznego $ED_{50}NTD$ i antyagresywnego działania $ED_{50}AA$.

Tab. 1. Efektywne dawki antyagresywne ($ED_{50}AA$) pochodnych benzodwazepiny i pochodnych kwasu barbiturowego w zestawieniu z dawkami neurotoksycznymi ($ED_{50}NTD$) w FSIF u myszy

Comparison of antiaggressive effective doses ($ED_{50}AA$) of benzodiazepines and barbiturates in FSIF in mice with neurotoxic effective doses ($ED_{50}NTD$)

Badane związki	$ED_{50}AA$ (w mg/kg)	n	$ED_{50}NTD$ (w mg/kg)	n	$\frac{ED_{50}NTD}{ED_{50}AA}$
Diazepam	6,7 (4,15—11,3)*	15	10,1 (7,2—14,1)	12	1,51
Temazepam	1,51 (1,17—1,95)	15	6,5 (4,5—9,4)	12	4,30
Nitrazepam	0,27 (0,17—0,43)	15	1,7 (1,12—2,58)	12	6,30
Medazepam	3,5 (1,79—6,83)	15	9,2 (8,21—10,3)	12	2,63
Clobazam	2,0 (1,32—3,04)	18	5,1 (3,6—7,1)	12	2,55
Oxazepam	5,5 (3,1—9,5)	24	4,5 (3,0—6,75)	12	0,82
Lorazepam	0,9 (0,6—1,3)	24	3,5 (2,5—4,9)	12	3,89
Chlordiazepoksyd	10,0 (4,7—21,0)	24	10,2 (7,5—13,7)	12	1,02
Heksobarbital	nie wykazano	24	58,0 (41,5—81,2)	12	—
Pentobarbital	nie wykazano	24	36,0 (19,0—67,5)	12	—

$ED_{50}AA$ — antyagresywna — antiaggressive.

$ED_{50}NTD$ — neurotoksyczna — neurotoxic.

n — ilość par myszy lub myszy — number of couples of mice or mice.

* Granice ufności przy 5% ryzyku — limits of confidence at the 5% of risk.

Najbardziej selektywnie działającym antyagresywnie związkiem spośród badanych benzodwazepin okazał się nitrazepam. Świadczy o tym duża rozpiętość pomiędzy efektywną dawką antyagresywną a efektywną dawką powodującą neurotoksyczne działanie tego leku. Stwierdzono również wysoką selektywność w działaniu antyagresywnym u myszy dla temazepamu i lorazepamu. W dalszej kolejności pod względem siły działania antyagresywnego należy wymienić medazepam i clobazam. Diazepam jest preparatem bardzo słabo działającym antyagresywnie w użytym modelu agresywności u myszy. Lek ten powodował tłumienie występowania epizodów walki dopiero po wysokich dawkach, niewiele różniących się od dawki neurotoksycznej. Pozostałe użyte do badań benzodwazepiny, tj. chlordiazepoksyd i oxazepam, nie wykazały działania antyagresywnego. Dawki antyagresywne tych leków były na poziomie dawki neurotoksycznej, a nawet ją przewyższały. Badane pochodne kwasu barbiturowego — heksobarbital i pentobarbital nie odznaczały się antyagresywnym działaniem. Nie udało się uzyskać zmniejszenia ilości epizodów walki przez te leki nawet w dawkach wielokrotnie przewyższających neurotoksyczne. Wyniki badań przedstawiono w tab. 1.

OMÓWIENIE I DISKUSJA

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że podanie myszom benzodwazepin w zasadzie powodowało tłumienie agresywności. Wyniki badań innych autorów (1, 2, 13, 17, 21, 27, 32) również wykazały antyagresywne działanie wielu związków z grupy benzodwazepin w różnych typach agresywnego zachowania, ale w wielu przypadkach efekt antyagresywny uzyskano dopiero po dawkach neurotoksycznych. Różny stopień skuteczności w hamowaniu agresywności po benzodwazepinach wykazano także w FSIF u myszy. Ocena własna badanych benzodwazepin na podstawie przyjętych kryteriów pozwala stwierdzić, że nitrazepam najsilniej tłumił objawy agresywnego zachowania. Wyniki te są zgodne z badaniami Christmas i Maxwell (1), którzy również wykazali silne działanie nitrazepamu w agresywności typu walczące myszy i szczury ($ED_{50}=1,2$). Chlordiazepoksyd i oxazepam w badaniach tych autorów działały antyagresywnie około 4 razy słabiej niż nitrazepam. Autorzy ci stwierdzili również, że amylobarbital i meprobamat użyte do badań w celu porównawczym odznaczały się bardzo małą skutecznością w hamowaniu zachowania agresywnego w FSIF u myszy i szczurów (1). W naszych badaniach chlordiazepoksyd i oxazepam w porównaniu do innych benzodwazepin nie wykazały selektywnego działania antyagresywnego. Użyte dawki tych dwóch związków redukujące agresywność u myszy pokrywały

się z dawkami neurotoksycznymi. Również związki pochodne kwasu barbiturowego — heksobarbital i pentobarbital nie działały antyagresywnie.

Wysoką selektywnością działania antyagresywnego w FSIF u myszy (w kolejności po nitrazepamie) charakteryzowały się temazepam i lorazepam. Wysoka skuteczność temazepamu jest trudna do wytłumaczenia w aspekcie badań własnych i innych autorów (1). Temazepam (metabolit diazepam) jest chemicznie najbardziej zbliżony do oxazepamu (20). W działaniu antyagresywnym różni się natomiast zasadniczo. Temazepam zarówno *per se*, jak i w połączeniu z beta-blokerami (25) działał w FSIF u myszy selektywnie, natomiast oxazepam — jak wykazały nasze badania oraz innych autorów (1) — nieselektywnie. Silnie antyagresywnie działał także lorazepam, którego efektywna dawka antyagresywna była niższa niż temazepam, ale wykazano mniejszą rozpiętość pomiędzy dawką antyagresywną a neurotoksyczną.

Nieco mniejszą selektywnością w działaniu antyagresywnym w badanym teście wyróżniały się medazepam i clobazam. Ten ostatni należy do 1,5 benzodwazepin, które różni się od 1,4 benzodwazepin silnym działaniem anksjolitycznym, a słabym sedacyjnym. Według Felding i wsp. (7) clobazam przebadany w FSIF u myszy razem z diazepamem i chlordiazepoksydem okazał się znacznie silniejszym lekiem antyagresywnym niż chlordiazepoksyd, ale mniej silnym niż diazepam. W naszej ocenie clobazam miał działanie silniejsze zarówno od chlordiazepoksydu, jak też od diazepamu, który działał nieselektywnie w badanym typie agresywności. Efekt antyagresywny stwierdzono dopiero po wysokich dawkach na poziomie dawki neurotoksycznej. Podobnie ocenili działanie antyagresywne diazepam i inni autorzy (22).

Na podstawie przeprowadzonych badań można wnioskować, że poszczególne pochodne benzodwazepin różni się znacznie w swoim profilu działania w przypadku oceny ich efektu antyagresywnego. Wszystkie badane pochodne benzodwazepiny działają silniej antyagresywnie niż pochodne kwasu barbiturowego.

PISMIENNICTWO

1. Christmas A. J., Maxwell D. R.: A comparison of the effects of some benzodiazepines and other drugs on aggressive and exploratory behaviour in mice and rats. *Neuropharmacology* 9, 17, 1970.
2. Cole H., Wolf H.: The effects of some psychotropic drugs on conditioned avoidance and aggressive behaviours. *Psychopharmacologia* 8, 389, 1966.
3. Cole H. F., Wolf H. H.: Laboratory evaluation of aggressive behavior of the grasshopper mouse (*Onychomys*). *J. Pharmaceut. Sci.* 59, 969, 1970.
4. Costa E., Guidotti A., Mao C. C., Suria A.: New concepts on the mechanism of action of benzodiazepines. *Life Sci.* 17, 167, 1975.

5. Di Mascio A.: The effects of benzodiazepines on aggression: reduced or increased. *Psychopharmacologia (Berl.)* **30**, 95, 1973.
6. Dunham N. W., Miya T. S.: A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J. A. Pharm. Ass.* **46**, 208, 1957.
7. Fielding S., Hoffman I.: Pharmacology of anti-anxiety drugs with special reference to clobazam. *Br. J. Clin. Pharm.* **7**, 78, 1979.
8. Fox K. A., Snyder R. L.: Effect of sustained low doses of diazepam on aggression and mortality in grouped male mice. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **69**, 663, 1969.
9. Fox K. A., Tuckosh J. R., Wilcox A. H.: Increased aggression among grouped male mice fed chlordiazepoxide. *Eur. J. Pharmac.* **11**, 119, 1970.
10. Garattini S., Mussini E., Randall L. (Eds.) *The benzodiazepines*, Raven Press, New York 1973.
11. Greenblatt D. J., Shader R. J., Koch-Weser J.: Flurazepam hydrochloride. *Clin. Pharmacol. Ther.* **17**, 1, 1975.
12. Gwaitani A., Marcucci F., Garattini S.: Increased aggression and toxicity in grouped male mice treated with tranquilizing benzodiazepines. *Psychopharmacologia* **19**, 241, 1971.
13. Heise G. A., Boff E.: Taming action of chlordiazepoxide. *Fedn. Proc. Am. Soc. Exp. Biol.* **20**, 393, 1961.
14. Heise G. A., Boff E.: Continuous avoidance as a baseline for measuring behavioural effects of drugs. *Psychopharmacologia (Berl.)* **3**, 264, 1962.
15. Lippa A. S., Critchett D., Sano M. C., Klepner C. A., Greenblatt E. N., Coupet J., Beer B.: Benzodiazepine receptors: Cellular and behavioral characteristics. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **10**, 831, 1979.
16. Litchfield J. T., Wilcoxon F.: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **96**, 99, 1949.
17. Malick J. B.: Selective antagonism of isolation-induced aggression in mice by diazepam following chronic administration. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **8**, 497, 1978.
18. Moyer K. E.: Kinds of aggression and their physiological basis. *Commun. Behav. Biol.* **2**, 65, 1968.
19. Nakamura M., Fukushima H.: Effect of benzodiazepines on central serotonergic neuron systems. *Psychopharmacology* **53**, 121, 1977.
20. Nicholson A. N.: Differential effects of the 1,4 and 1,5 benzodiazepines on performance in healthy man. *Br. J. Clin. Pharmac.* **7**, 838, 1979.
21. Randall L. O., Schallek W., Heise G. A., Keith E. F., Bagdon R. E.: The psychosedative properties of methaminodiazepoxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **129**, 163, 1960.
22. Randall L. O., Heise G. A., Schallek W., Bagdon R. E., Banziger R., Boris A., Moe R. A., Abrams W. B.: Pharmacological and clinical studies on Valium (TM): A new psychotherapeutic agent of the benzodiazepine class. *Current Therapeutic. Research* **3**, 405, 1961.
23. Raggiani A., Hürlimann A., Theiss E.: Some aspects of the experimental and clinical toxicology of chlordiazepoxide. *Proceeding of the European Society for the study of drug toxicity.* **9**, 79, 1968.
24. Roliński Z., Kozak W.: The role of catecholaminergic system in foot-shock-induced fighting in mice. *Psychopharmacology* **65**, 285, 1979.

25. Roliński Z., Kozak W.: A potentiated antiaggressive action of benzodiazepines combined with beta-adrenoreceptor antagonists in footshock-induced fighting test in mice. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **32**, 731, 1980.
26. Rushton R., Steinberg H.: Drug combinations and their analysis by means of exploratory activity in rats. *Neuropsychopharmacology Proceedings of the 1st International Congress of the Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum*, Amsterdam 1967.
27. Sofia R. D.: Effects of centrally active drugs on four models of experimentally-induced aggression in rodents. *Life Sci.* **8**, 705, 1969.
28. Squires R. F., Braestrup C.: The benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature (London)* **266**, 732, 1977.
29. Squires R. F., Benson D. J., Braestrup C., Coupet C., Klepner C. A., Myers V., Beer B.: Some properties of brain specific benzodiazepine receptors: New evidence for multiple receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **10**, 825, 1979.
30. Steinberg H., Tomkiewicz M.: Animal behaviour models in psychopharmacology. In chemical influences on behaviour. CIBA Foundation Study Group. **35**, 199, 1970.
31. Tedeschi D. H., Fowler P. J., Miller R. B., Macko E.: Pharmacological analysis of footshock-induced fighting behaviour. In *Aggressive Behaviour*. Garattini S., Sigg E. B. (Ed.) New York, John Wiley and Sons Inc., 1969.
32. Valzelli L., Giacalone E., Garattini S.: Pharmacological control of aggressive behavior in mice *Europ. J. Pharmacol.* **2**, 144, 1967.

Wpł. 5 I 1981 r.

РЕЗЮМЕ

Исследовано противагрессивное действие некоторых бензодиазепинов по сравнению с производными барбитурной кислоты. Селективное действие бензодиазепинов предохраняющих выступление агрессивности, определено на основе терапевтического индекса (ThI), учитывая две эффективные дозы, а именно: эффективную невротоксическую дозу ($ED_{50}NTD$) и эффективную противагрессивную дозу ($ED_{50}AA$). Самое большое селективное противагрессивное действие, в случае агрессивности вызванной электрическим током у мышей, проявлял нитразепам, а потом последовательно темазепам, лоразепам, медазепам и хлоразепам. Диазепам проявлял сравнительно слабое действие. Остальные бензодиазепины нпр. хлордиазепоксид и оксазепам усмиряли агрессивность при невротоксических дозах. Такие производные барбитурной кислоты как гексобарбитал и пентобарбитал не вызывали противагрессивного действия у мышей. Результаты исследований свидетельствуют о том, что отдельные бензодиазепины в своем фармакологическом профиле имеют разное противагрессивное действие.

SUMMARY

There were studied antiaggressive actions of some benzodiazepines in comparison with some barbituric acid derivatives. Selective effects on aggression of benzodiazepines were determined on the basis of therapeutic index (IT) from the

two effective doses (ED_{50}): effective neurotoxic dose ($ED_{50}NTD$) and effective anti-aggressive dose ($ED_{50}AA$). The highest selective antiaggressive action in the FSIF in mice revealed nitrazepam and then temazepam, lorazepam, medazepam and clobazam. Diazepam showed a relatively slight antiaggressive action. The remaining benzodiazepines e.g. chlordiazepoxyd and oxazepam suppressed the aggressiveness just lately at neurotoxic doses. The examined derivatives of barbituric acid — hexobarbital and pentobarbital did not reveal antiaggressive action. The results of the studies suggest that individual benzodiazepines differ in their pharmacological profile in relation to their antiaggressive action.