

Summary

Pharmacological experimental research on the adverse effects of alprazolam+bromazepam association

In the present paper we have researched, through experimental pharmacology studies, the pharmacotoxicological potential of the association between two benzodiazepine drugs: alprazolam and bromazepam. Our research has performed using specific pharmacological tests to evaluate the effect of miorelaxant (rotarod test) and effect on memory and spatial acquisition (Morris aquatic labyrinth). The doses administered were alprazolam 0.5 mg/kg body weight and bromazepam 0.75 mg/kg body weight. Based on our research, we can state that the studied benzodiazepines, alprazolam and bromazepam, at the doses administered alone or in combination, do not adversely affect the ability of mice to maintain on the rotating spindle or the ability to learn and to remember platform position in the Morris aquatic labyrinth test.

Keywords: alprazolam, bromazepam, rotarod test, aquatic labyrinth Morris

Резюме

Фармакологические экспериментальные исследования побочных эффектов ассоциации алпразолам+бромазепам

В этой статье мы поставили себе цель провести доклинические исследования фармакотоксикологического потенциала ассоциации между двумя бензодиазепинами: альпразоламином и бромазепамом. Наши исследования проводились на мышах с помощью специфических фармакологических тестов для оценки влияния миорелаксанта (тест ротарода) и влияния на память и пространственное поглощение (водный лабиринт Морриса). Доза альпразолама была 0,5 мг/кг массы тела и бромазепа – 0,75 мг/кг массы тела. Основываясь на наших исследованиях, мы можем констатировать, что два исследуемых бензодиазепина, альпразолам и бромазепам в указанных дозах, вводимых отдельно или в комбинации, не оказывают отрицательного влияния на способность мышей поддерживать ось вращения или способность учиться и помнить позицию платформы в тесте водного лабиринта Морриса.

Ключевые слова: альпразолам, бромазепам, тест ротарода, водный лабиринт Морриса

Introducere

De la descoperirea lor la începutul anului 1960 și până în prezent, benzodiazepinele s-au numărat printre cele mai prescrise medicamente datorită multiplelor acțiuni farmacologice (anxiolitică, hipnoinductoare, anticonvulsivantă, miorelaxantă), care le-au conferit o importantă valoare terapeutică și le-au permis folosirea într-o varietate de afecțiuni. Utilizarea lor pe scară largă se datorează într-o mare măsură tolerabilității și siguranței acestora. În comparație cu alte medicamente deprimante ale sistemului nervos

CZU: 615.214.22.065

CERCETĂRI FARMACOLOGICE EXPERIMENTALE PRIVIND EFECTELE ADVERSE ALE ASOCIERII ALPRAZOLAM+BROMAZEPAM

Cornel CHIRIȚĂ, Anca ZANFIRESCU, Cristina Daniela MARINECI, Emil ȘTEFĂNESCU, Cristina Elena ZBÂRCEA, Oana Cristina ȘEREMET, Bruno Ștefan VELESCU, Simona NEGREȘ, Dragoș Paul MIHAI,
Disciplina Farmacologie și Farmacie clinică,
Facultatea Farmacie,
UMF Carol Davila, București, România

Rezumat

În lucrarea de față ne-am propus cercetarea preclinică a potențialului farmacotoxicologic al asocierii dintre două benzodiazepine: alprazolam și bromazepam. Cercetările noastre s-au efectuat la șoareci prin teste farmacologice specifice de evaluare a efectului miorelaxant (testul rotarod) și a efectului asupra memoriei și achiziției spațiale (labirintul acvatic Morris). Dozele administrate au fost: alprazolam 0,5 mg/kg corp și bromazepam 0,75 mg/kg corp. În urma cercetărilor efectuate, putem afirma că cele două benzodiazepine studiate, alprazolam și bromazepam, la dozele administrate, singure sau în asociere, nu influențează în sens negativ abilitatea șoarecilor de a se menține pe axul în rotație sau capacitatea de a învăța și de a memora poziția platformei în testul labirintului acvatic Morris.

Cuvinte-cheie: alprazolam, bromazepam, testul rotarod, labirintul acvatic Morris

central, benzodiazepinele prezintă un indice terapeutic ridicat și un potențial farmacotoxicologic scăzut, printre reacțiile adverse numărându-se somnolența reziduală, incoordonarea motorie, scăderea memoriei de lungă durată, toleranța și farmacodependența la tratamente îndelungate [3, 6, 7].

Benzodiazepinele se utilizează mult în tratamentul tulburărilor anxioase și al insomniilor, deși ghidurile actuale privind farmacoterapia anxietății nu mai recomandă în prezent folosirea pe termen lung a acestei grupe farmacologice, din cauza toleranței și reacțiilor adverse, mai frecvente în special la vârstnici [5, 8].

În cazul tulburărilor comportamentale severe, în practica medicală se întâlnește frecvent prescrierea de benzodiazepine asociate, de regulă un anxiolitic de zi (alprazolam, medazepam) alături de unul cu componentă sedativ-hipnotică mai mare (bromazepam, nitrazepam).

Literatura de specialitate menționează că asocierea dintre două benzodiazepine trebuie evitată din cauza apariției competiției pentru siturile de legare ale benzodiazepinelor, cu antagonizarea reciprocă a efectelor. Creșterea dozelor, ca urmare a necunoașterii acestui fenomen, poate provoca intoxicații cu efecte paradoxale (dezorientare, agitație) [3].

În lucrarea de față ne-am propus cercetarea, prin studii de farmacologie experimentală, a potențialului farmacotoxicologic al asocierii dintre două substanțe din clasa benzodiazepinelor: alprazolam și bromazepam. Alprazolamul este un anxiolitic cu latență și durată de acțiune relativ scurte, care prezintă în plus față de restul benzodiazepinelor și efect antidepressiv, fiind indicat în depresia anxioasă. Bromazepamul este un reprezentant cu timp de înjumătățire mai lung și cu o potență ridicată a efectului anxiolitic și celui hipnoinductor.

Cercetările noastre s-au concentrat pe studierea efectului miorelaxant și amnezic al celor două benzodiazepine asociate. În acest sens, am întreprins primele studii preclinice prin efectuarea unor teste farmacologice specifice de evaluare a efectului miorelaxant (testul rotarod) și a efectului asupra memoriei și achiziției spațiale (labirintul acvatic Morris) [1, 2, 4].

Materiale și metode

Animale: șoareci albi, masculi, din specia NMRI, cu greutatea corporală cuprinsă între 22 și 45 g, proveniți de la biobaza UMF Carol Davila.

Materiale:

Substanțe folosite:

- alprazolam, susp. 1/10000 și 1/20000;
- bromazepam, susp. 1,5/10000 și 1,5/20000;
- apă distilată + tween 80.

Bazinul (labirintul) cu apă: diametrul 122 cm; înălțimea 25 cm, cu suprafețe nereflectorizante (mate);

interiorul este vopsit în negru pentru testarea animalelor albe. Este necesară amplasarea bazinului într-o cameră cu numeroase repere vizuale. Acestea pot fi intenționale sau preexistente. Este esențial ca aceste repere să nu fie modificate pe parcursul testării. Bazinul a fost împărțit în patru cadrane: NE, NV, SE, SV.

Platforma: circulară, cu un diametru de 10 cm, scufundată 1 cm sub apă. Platforma a fost plasată în cadranul NV al bazinului.

Sistemul de monitorizare: plasat astfel încât să poată înregistra toate mișcările șobolanilor aflați în bazin.

Rotarod Ugo Basile pentru șoareci.

Condiții experimentale. Apa din bazin a avut temperatura de aprox. 22°C. Am lucrat în următoarele condiții de mediu: temperatura ambientă – 23±1°C, umiditatea – 55±5 %, iluminare artificială.

Observatorul a stat nemișcat într-o poziție constantă, în dreptul poziției S a bazinului. În acest caz, observatorul devine el însuși un reper pentru animale.

Mod de lucru. Experimentul a fost efectuat în perioada 14 martie – 11 aprilie 2017. După aducerea animalelor de la biobază, acestea au fost ținute în cuști separate de restul animalelor din laborator, în scopul adaptării fiziologice și psihologice la noile condiții de viață. Ulterior, animalele au fost mutate câte 10 în cuști de plexiglas de dimensiuni potrivite, care asigurau acces *ad libitum* la hrană și apă.

Activitățile de cercetare care au necesitat lucrul pe animalul de experiență au fost efectuate cu respectarea prevederilor Directivei 2010/63/UE din 22 septembrie 2010 ale Ordonanței de Guvern nr. 37/30.01.2002 referitoare la protecția animalelor folosite în scopuri experimentale sau în alte scopuri științifice, ale GAP (Good Animal Practice) și ale GLP (Good Laboratory Practice). Protocolul de lucru pe animalele de experiență a fost întocmit în conformitate cu normele de bioetică, ținând cont de utilizarea unui număr cât mai mic de animale de experiență, dar suficient din punct de vedere al acurateții științifice.

Pentru determinarea acțiunilor benzodiazepinelor asupra memoriei și tonusului muscular, am luat în lucru 48 de șoareci, împărțiți în patru loturi a câte 12 animale.

Substanțele au fost administrate după cum urmează:

- Lot 1 (lot-martor): apă distilată – 0,1 ml/10 g corp p.o.
- Lot 2: APZ (alprazolam) – 0,5 mg/kg corp susp. 0,005% p.o.
- Lot 3: BRZ (bromazepam) – 0,75 mg/kg corp susp. 0,0075% p.o.
- Lot 4: APZ 0,5 mg/kg corp susp. 0,01% + BRZ 0,75 mg/kg corp susp. 0,015% p.o.

Determinările experimentale s-au desfășurat astfel:

➤ **Testul rotarod** – după 1, 7, 14 și 21 de zile de administrare.

Înainte de administrarea compușilor, șoarecii au fost aduși în camera de testare și au fost ținuți fără hrană timp de câteva ore, pentru a se asigura o absorbție cât mai bună a substanțelor administrate. Testările s-au efectuat cu o latență de aproximativ o oră din momentul administrării. Administrarea substanțelor s-a efectuat la intervale de 7 minute, pentru a permite testarea animalelor la același interval de timp din momentul administrării.

S-a folosit modul de lucru accelerat. Viteza de începere a fost de 4 rpm, iar cea de final – de 35 rpm. Durata maximă a testului a fost de 300 sec. Animalul a fost așezat invers față de direcția de rotație și s-a notat turația la care a căzut șoarecele.

➤ **Testul labirintului acvatic Morris** – începând cu ziua a 22-a de administrare.

Achiziție spațială (zilele 1-5):

■ Se pune animalul în poziția de start dorită în labirint, cu fața la peretele bazinului.

■ Animalul este eliberat la nivelul apei (nu aruncat!). Se pornesc camera video și un cronometru.

■ Se oprește cronometrul atunci când animalul ajunge/atinge platforma; timpul limită = 60 secunde. Animalele care nu au găsit platforma în acest timp sunt plasate pe platformă sau ghidate spre ea.

■ Se lasă animalul pe platformă în timpul intervalului inter-proces = 15 secunde.

■ Se pune animalul în labirint într-un nou loc de pornire și se repetă procesul până când fiecare animal a efectuat patru sesiuni de învățare.

■ În următoarele 5 zile, se repetă zilnic sesiunile de învățare.

Memoria de referință (ziua a 6-a):

■ Se îndepărtează platforma.

■ Se pune animalul într-o poziție nouă de start în labirint, cu fața la peretele bazinului – de exemplu, la 180° față de poziția inițială a platformei.

■ Se pornesc camera video și un cronometru.

■ Se scoate animalul după 30 secunde.

În timpul determinărilor, animalele sunt ferite de stimuli externi care ar putea să le modifice comportamentul (zgomote, variații de lumină etc.). Experimentatorul urmărește de la distanță animalul, notând eventualele stereotipii sau comportament modificat.

Bazinul cu apă și axul în rotație vor fi foarte bine curățate de dejecții sau de alte urme ale fiecărui animal testat, pentru ca acestea să nu influențeze următoarea determinare.

Prelucrarea statistică. Analiza statistică a rezultatelor s-a efectuat cu ajutorul softului Graphpad

Prism 5. Acest soft utilizează testul "t" Student (pentru două loturi) și testul ANOVA (pentru mai multe loturi) pentru a prelucra populațiile cu distribuție normală. În caz de distribuție anormală, am efectuat testul Mann-Whitney (pentru două loturi) și testul Kruskal-Wallis (pentru mai multe loturi). Verificarea tipului de distribuție (normală/anormală) s-a realizat cu ajutorul testului d'Agostino & Pearson.

Rezultate și discuții

Testul rotarod. După administrarea acută, șoarecii tratați cu asocierea APZ+BRZ au căzut de pe axul în rotație la o turație mai mică decât celelalte loturi de animale, semn al unui posibil ușor efect miorelaxant. Rezultatele nu sunt însă semnificative statistic față de lotul-martor sau față de loturile tratate cu o singură benzodiazepină.

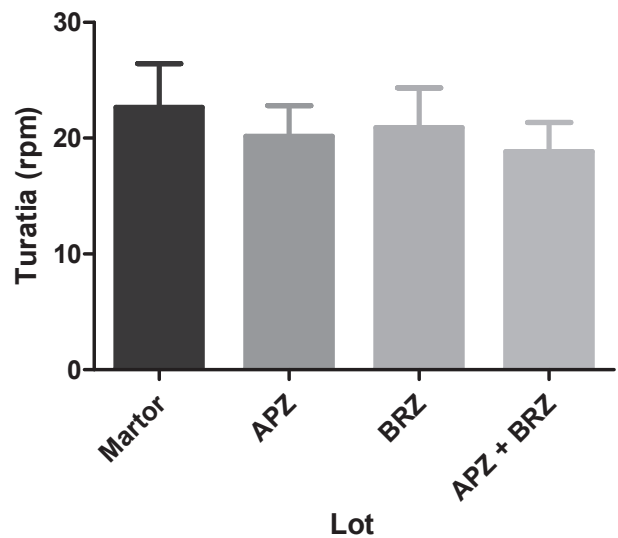


Figura 1. Turația la care au căzut șoarecii – testul rotarod; testare acută

După 7 zile de administrare, toate loturile tratate cu benzodiazepine în mono- sau în biterapie au prezentat un foarte redus efect miorelaxant, nesemnificativ statistic față de lotul-martor.

Testul rotarod – turația (rpm). Testare după 14 zile de administrare

Animal	Martor	APZ	BRZ	APZ + BRZ
Media/lot ± ds	27,92± 10,02	23,75± 13,10	28,75± 7,25	28,00± 12,01
Distribuție normală	NU	DA	NU	DA
Efect % față de martor		-14,94%	2,97%	0,29%
Kruskal-Wallis	ns			

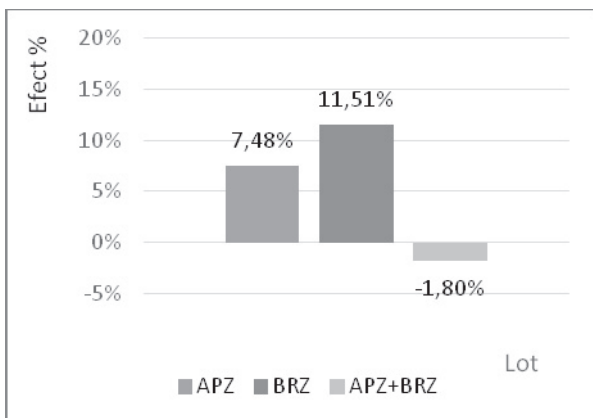
După 14 zile de administrare, șoarecii tratați cu alprazolam au căzut de pe ax la turația cea mai mică, însă efectul față de martor este redus. Deviația-standard în cadrul lotului este mare, ceea ce face ca rezultatul să nu fie semnificativ statistic față de lotul-martor.

După 21 de administrări zilnice, se constată o uniformizare a comportamentului șoarecilor în testul rotarod, ceea ce este în conformitate cu datele din literatură ce susțin faptul că se poate instala toleranța pentru efectul miorelaxant.

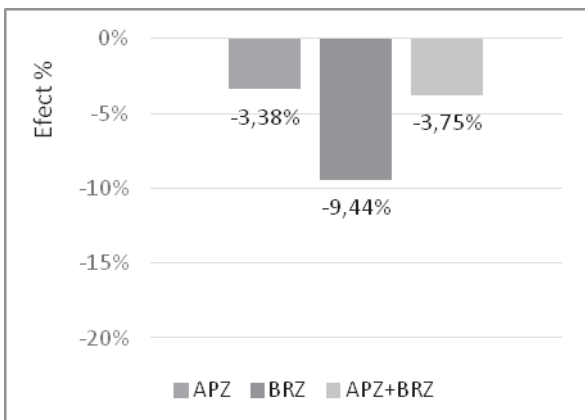
În urma acestui test, putem concluziona că cele două benzodiazepine folosite în testul rotarod nu au produs decât un foarte redus efect miorelaxant, ne semnificativ statistic, efect care scade treptat pe parcursul administrărilor repetate.

Labirintul acvatic Morris (zilele 1-5). În prima zi de testare, benzodiazepinele administrate în monoterapie au produs o ușoară scădere a latenței cu care șoarecii au găsit platforma submersă, efectele fiind însă reduse și ne semnificative statistic față de lotul netratat. Asocierea APZ+BRZ nu influențează acest parametru în testul labirintului acvatic Morris, valoarea latenței fiind comparabilă cu cea înregistrată la martor.

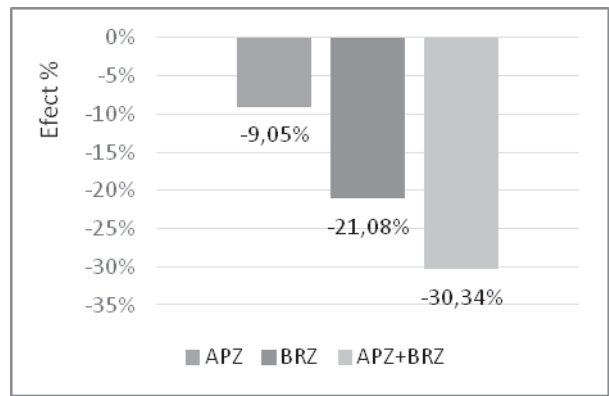
În ziua a doua de testare, se constată o scădere semnificativă a latenței pentru toate loturile, comparativ cu prima zi. Este semnul că șoarecii au învățat poziția platformei în spațiu și astfel o găsesc mult mai repede. Diferențele dintre cele patru loturi testate sunt extrem de mici, semn că benzodiazepinele administrate nu au influențat semnificativ capacitatea șoarecilor de a găsi platforma.



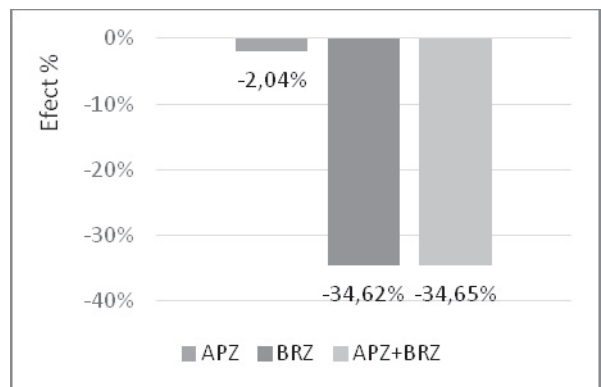
ZIUA 1



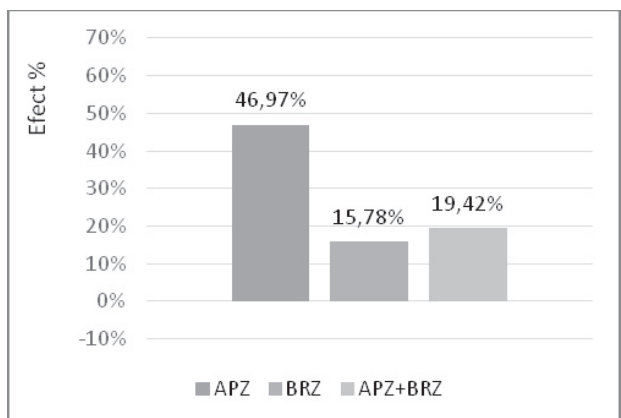
ZIUA 2



ZIUA 3



ZIUA 4



ZIUA 5

Figura 2. Latența până la găsirea platformei – efect % față de martor (zilele 1-5)

În zilele trei și patru de testare, atât BRZ administrat singur, cât și asocierea APZ+BRZ au determinat o scădere a timpului de găsire a platformei, semnificative statistic față de lotul-martor ($p < 0,05$ – „t” Student).

În a cincea zi de testare, toate benzodiazepinele administrate au produs o creștere a latenței până la găsirea platformei submersă, cu efecte cuprinse între 15% și 47%. APZ administrat singur a influențat cel mai mult capacitatea de învățare a șoarecilor, aceștia ajungând la platformă cel mai încet. Rezultatele obținute nu sunt

însă semnificative statistic, dar este primul semn de influențare a memoriei de către aceste substanțe.

În ziua a șasea, după îndepărtarea platformei submerse, rezultatele au arătat că cele două benzodiazepine administrate, singure sau în asociere, la dozele utilizate de noi, nu au influențat negativ memoria de referință a șoarecilor. Astfel, șoarecii tratați cu asocierea APZ+BRZ au petrecut cel mai mult timp și au parcurs cea mai mare distanță în cadranul NV, în care s-a aflat platforma. De asemenea, au petrecut cel mai mult timp și au avut și cele mai multe treceri prin zona P, definită ca zona exactă în care s-a aflat poziționată platforma înainte de a fi îndepărtată.

Concluzii

În urma cercetărilor experimentale efectuate, putem afirma că cele două benzodiazepine studiate, alprazolam și bromazepam, la dozele administrate, singure sau în asociere, nu influențează în sens negativ abilitatea șoarecilor de a se menține pe axul în rotație sau capacitatea de a învăța și de a memora poziția platformei în testul labirintului acvatic Morris. În vederea stabilirii exacte a influenței benzodiazepinelor asupra tonusului muscular și a memoriei spațiale ale animalelor, sunt necesare cercetări suplimentare, la alte niveluri de doze și cu înlăturarea a cât mai multor factori generatori de erori.

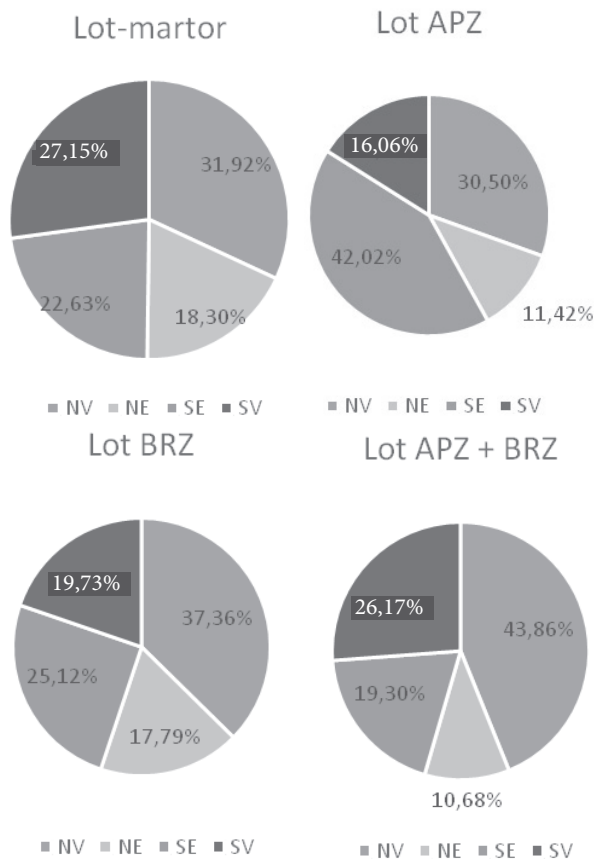


Figura 3. Timpul petrecut în cele patru cadrane ale bazinului, după îndepărtarea platformei (%)

Bibliografie

1. Bourin M., Hascoet M., Mansouri B., et al. *Comparison of behavioral effects after single and repeated administrations of four benzodiazepines in three mice behavioral models*. In: Journal of Psychiatry and Neuroscience, 1992; nr. 17(2), p. 72-77.
2. Brooks S., Dunnett B. *Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide*. In: Nature Reviews Neuroscience, 2009; nr. 10, p. 519-529.
3. Cristea Aurelia Nicoleta (sub redacția). *Tratat de Farmacologie*. Ediția I. București: Editura Medicală, 2006, p. 46-65.
4. Deacon R. *Measuring Motor Coordination in Mice*. In: Journal of Visualized Experiments, 2013; nr. 75, p. 2609.
5. Kurko T., Saastamoinen L., Tähkää S., et al. *Long-term use of benzodiazepines: Definitions, prevalence and usage patterns – a systematic review of register-based studies*. In: European Psychiatry, 2015; nr. 30(8), p. 1037-1047.
6. Lister R.G. *The Amnesic Action of Benzodiazepines in man*. In: Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 1985; nr. 9, p. 87-94.
7. Roth T., Roehrs T., Wittig R., Zorick F. *Benzodiazepines and memory*. In: British Journal of Clinical Pharmacology, 1984; nr. 18 (suppl. 1), p. 45-49.
8. Uzun S., Kozumplik O., Jakovljević M., Sedić B. *Side effects of treatment with benzodiazepines*. In: Psychiatria Danubina, 2010; nr. 22(1), p. 90-93.

Anca Zanfirescu, conferențiar universitar,
UMF Carol Davila, București,
tel.: +40723632617,
e-mail: zanfirescuanca@yahoo.com.