

**Praca poglądowa***Review*ADAM HAMED<sup>1</sup>, ANNA SKÓRZEWSKA<sup>2</sup>, MAŁGORZATA LEHNER<sup>2</sup>, ADAM PŁAŻNIK<sup>1,2</sup>**Tofizopam. W poszukiwaniu mechanizmów działania 2,3-benzodiazepin***Tofisopam. The investigation of the mechanism of 2,3-benzodiazepines (homofthalazines) action*<sup>1</sup>Zakład Farmakologii Klinicznej i Doświadczalnej Akademii Medycznej w Warszawie<sup>2</sup>Zakład Neurochemii Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie**STRESZCZENIE**

Większość stosowanych w klinice leków przeciwlękowych to substancje strukturalnie związane z 1,4-benzodiazepinami. Tofizopam był pierwszą z pochodnych różniących się od tzw. klasycznych benzodiazepin ulokowaniem atomów azotu, tzn. w przypadku tofizopamu atomy azotu sąsiadują ze sobą w pozycji 2,3-. Ta różnica w strukturze cząsteczki prawdopodobnie odpowiedzialna jest za odmienny profil farmakologiczny oraz kliniczny tofizopamu.

Od lat 60. zsyntetyzowano szereg substancji z rodziny 2,3-benzodiazepin i nazwano tę grupę homofthalazynami. Niektóre z tych substancji np. tofizopam, girizopam, nerizopam – wykazują efekt przeciwlękowy oraz przeciwpyschotyczny. Miejsca wiązania homofthalazyn różnią się od tych, z którymi się wiążą klasyczne 1,4-benzodiazepiny. Lezje chemiczne systemu striato-pallido-nigralnego, uszkodzenie chirurgiczne szlaków strato-nigralnych oraz ekspresja białka c-Fos w zwłokach podstawy mózgu po podaniu 2,3-benzodiazepiny wskazuje, że homofthalazyny strukturalnie związane z tofizopamem wiążą się z neuronami projekcyjnymi prążkowie. Mechanizm działania 2,3-benzodiazepin pozostaje nie znany. Tofizopam zwiększa powinowactwo 1,4-benzodiazepin do miejsca benzodiazepinowego w receptorze GABA-A. Przypuszcza się, że efekt działania tofizopamu może wiązać się wpływem na transmisję GABA-ergiczną, jednakże w porównaniu w 1,4-benzodiazepinami nie wykazuje on właściwości przeciwdrgawkowych. Tofizopam wywiera również wpływ depresyjny na układ dopaminergiczny. Inne badania nad mechanizmem działania homofthalazyn wskazują na prawdopodobną rolę w transdukcji sygnału opioidowego. Artykuł ten podsumowuje wiedzę na temat farmakologii 2,3-benzodiazepin strukturalnie związanych z tofizopamem.

**SUMMARY**

A great number of anxiolytics used in the clinical practice is structurally related to 1,4-benzodiazepines. Tofisopam is the first derivative which differs from the so-called classical benzodiazepines in the position of the nitrogen atoms i.e. in the case of tofisopam they are vicinals (2,3-). The difference in its structure is suspected to be responsible for the different pharmacological and clinical profile of tofisopam.

Since 60', several members of the 2,3-benzodiazepine (homophthalazines) family have been synthesized. Some of this compounds- tofisopam (Grandaxin®), girizopam, narizopam – exert anxiolytic and antipsychotic activities. Sites in the brain where actions homophthalazines are mediated differ from those of 1,4-benzodiazepines.

Chemical lesioning of the striato-pallido-nigral system, surgical transections of the striato-nigral pathway and activation of c-fos expression in basal ganglia after application of 2,3-benzodiazepines suggest that these compounds mainly bind to projecting neurons in the striatum. The mechanism of homophthalazines action is still unknown. Tofisopam increases the affinity of benzodiazepine receptors (a benzodiazepine binding site on GABA-A receptors) for 1,4-benzodiazepines. The psychoactive effect of tofisopam seems to be mediated by influencing GABAergic transmission, however, in contrast to

1,4-benzodiazepines, tofizopam has no anticonvulsive potency. Tofizopam also exert an inhibitory influence on the dopaminergic system. Few studies on the mechanism of action of 2,3-benzodiazepines indicate their possible role in opioid signal transduction. The present paper summarizes the main pharmacological actions of the 2,3-benzodiazepines family.

**Słowa kluczowe:** leki przeciwlękowe, 2,3-benzodiazepiny, homoftalazyny, tofizopam, badania przedkliniczne

**Key words:** anxiolytic drugs, basal ganglia, 2,3-benzodiazepines, homoftalazines, tofisolam, preclinical studies

## TOFIZOPAM. W POSZUKIWANIU MECHANIZMÓW DZIAŁANIA 2,3-BENZODIAZEPIN

Początek badań przedklinicznych nad pochodnymi 2,3-benzodiazepin (2,3-BDZ) datuje się na lata 60., kiedy Kőrösi i Lång zsyntetyzowali szereg związków chemicznych wykazujących zdolność redukcji zachowań o typie agresywnym oraz o właściwościach sedatywnych, jednocześnie pozbawionych właściwości miorelaksacyjnych oraz przeciwdrgawkowych (7).

Zsyntetyzowane w latach 70. 2,3-benzodiazepiny stanowią niejednorodną pod względem mechanizmu działania grupę substancji. Aby zaznaczyć odrębność 2,3-benzodiazepin od klasycznych benzodiazepin (BDZ) nazwano je homoftalazynami.

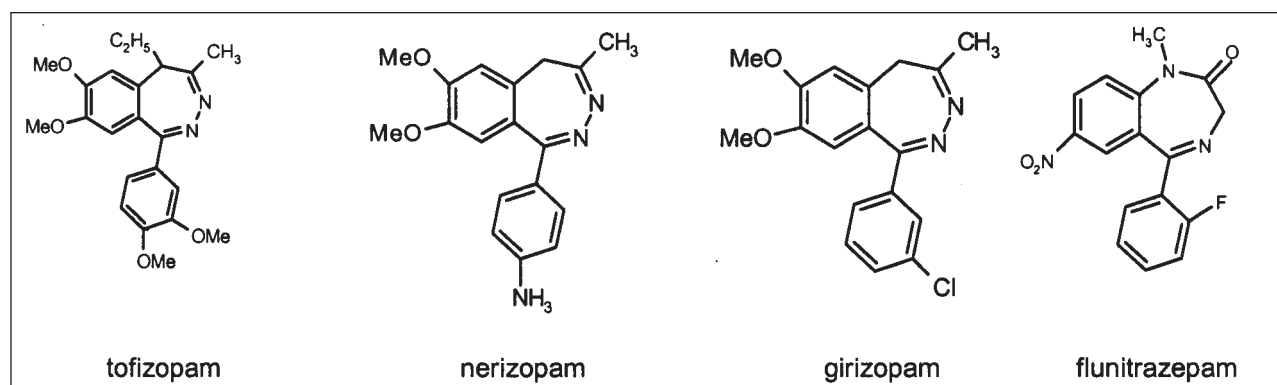
W odróżnieniu od znanych, klasycznych 1,4-benzodiazepin, 2,3-benzodiazepiny charakteryzuje odmienna budowa cząsteczki. Atomy azotu w bicyklicznym układzie benzodiazepiny umiejscowione są w pozycji 2 oraz 3 (w klasycznych benzodiazepinach atomy azotu występują w pozycjach 1 oraz 4). Benzodiazepiny są małymi heterocyklicznymi cząsteczkami przyjmującymi postać centroidów, można je otrzymać różnymi metodami, co pozwala na różnicowanie podstawników, a to z kolei umożliwia dokładne zbadanie przestrzeni konformacyjnej. Przestrzeń konformacyjną bicyklicznego centroidu zarówno 1,4- jak i 2,3-benzodiazepiny można badać zmieniając pięć różnych podstawników (5).

W związku z wyżej wymienionymi właściwościami struktury chemicznej benzodiazepin, uzyskano na

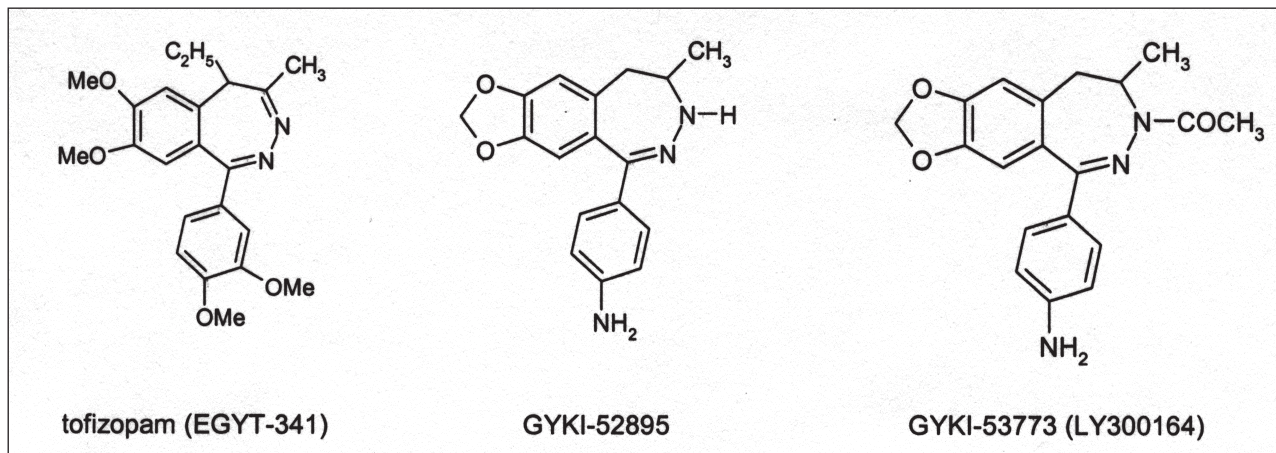
drodze syntezy kombinatorycznej wiele pochodnych zarówno 1,4- jak i 2,3-benzodiazepin o różnej aktywności biologicznej.

Mechanizm działania 2,3-benzodiazepin nie jest poznany. Badania przedkliniczne wykazały, że 2,3-benzodiazepiny w odróżnieniu od 1,4-benzodiazepin nie wiążą się z miejscem benzodiazepinowym receptorów dla kwasu 4-aminobutanowego ( $\gamma$ -aminomasłowego, GABA). Rdzeń cząsteczki, w zależności od miejsca ulokowania oraz rodzaju podstawnika (grupy funkcyjnej) wykazuje odmienne efekty farmakologiczne zarówno na poziomie komórkowym jak i behawioralnym.

Na podstawie analizy zależności aktywności od struktury chemicznej (Chemistry and Structure Activity Relationships Analysis) pochodne 2,3-BDZ uszeregowano w trzy odrębne podgrupy: 1) związki podobne do macierzystej pochodnej – tofizopamu. Spośród nich najwyższą aktywnością biologiczną charakteryzują się girizopam oraz nerizopam. Tofizopam (EGYT-341) wykazuje działanie anksjolityczne, stabilizujące nastrój oraz niewielkie działanie pobudzające (7). Tofizopam, nerizopam oraz girizopam (ryc. 1) wykazują powinowactwo do specyficznych miejsc wiązania 2,3-BDZ zlokalizowanych w szlaku pallidono-nigro-striatalnym. Badacze węgierscy (7) sugerują, że efekt przeciwlękowy związany jest z wpływem na endogeny system opioidowy (patrz niżej). Najlepiej poznana 2,3-benzodiazepiną o działaniu przeciwlękowym jest tofizopam (Grandaxin); 2) Związki o właściwościach hamowania wychwytu zwrotnego dopa-



**Rycina 1.** Wzory strukturalne benzodiazepin. Od lewej 2,3-BDZ: tofizopam, nerizopam, girizopam oraz klasyczna 1,4-benzodiazepina – flunitrazepam



**Rycina 2.** Wzory strukturalne przedstawicieli trzech subgrup homoftalazyn

miny nie wykazują powinowactwa do miejsc wiązania [ $^3\text{H}$ ]-nerizopamu (tzn. miejsc w szlaku pallido-nigrostriatalnym). Przykładem tej grupy pochodnych jest GYKI-52895 (ryc. 2); 3) Związki o silnych właściwościach przeciwdrgawkowych oraz miorelaksacyjnych, podobnie jak substancje subgrupy drugiej nie wykazują powinowactwa do miejsc wiązania klasycznych 2,3-benzodiazepin ([ $^3\text{H}$ ]-nerizopamu). Badania elektrofizjologiczne wykazały właściwości niekompetycyjnego antagonisty AMPA. Najbardziej aktywny związek tej subgrupy to talampanel (LY 300164; GYKI-52895), potencjalny lek przeciwdrgawkowy (ryc. 2).

Związkiem rokującym największe nadzieje wśród homoftalazyn okazał się tofizopam (Grandaxin), który w niedługim czasie po przeprowadzeniu badań przedklinicznych (20, 14, 33, 24), oraz klinicznych (35, 4, 19, 17), został zarejestrowany w 1974 r. na Węgrzech jako lek przeciwlękowy pozbawiony działania sedatywnego. Obecnie jest także jednym z najczęściej stosowanych leków przeciwlękowych w Japonii. Ponadto tofizopam został zarejestrowany i wprowadzony do leczenia we Francji, Hiszpanii, Finlandii i w kilku nowych krajach Unii Europejskiej (Republika Czech, Słowacja, Łotwa, Litwa) oraz w Japonii, Korei Płd. i Argentynie.

Tofizopam nie wykazuje podobieństwa do mechanizmów działania klasycznych leków przeciwlękowych. Do tej pory, pomimo przeprowadzonych wielu badań nie można jednoznacznie określić mechanizmu działania tofizopamu i strukturalnie związanych z nim girizopamu oraz nerizopamu.

#### WPLYW TOFIZOPAMU I INNYCH POCHODNYCH NA PODSTAWOWE SZLAKI NEUROPRZEKAŹNIKOWE

Na przestrzeni 40 lat uzyskano dane wskazujące, że tofizopam, podobnie jak girizopam oraz nerizopam,

wpływa na co najmniej trzy ośrodkowe układy neuroprzebieżnikowe: dopaminergiczny, GABA-ergiczny oraz opioidowy.

Poniżej opisujemy wpływ badanych leków na czynność podstawowych systemów neuroprzebieżnikowych, przy pomocy metod psychofarmakologii eksperymentalnej: badanie wiązania receptorowego, zmian w biochemii mózgu oraz efekty w testach behawioralnych na zwierzętach eksperymentalnych (modelach zmian aktywności psychomotorycznej, w modelach reakcji lękowych czy koordynacji ruchowej i działania kateleptycznego). Jest to ważna faza badań przedklinicznych, kwalifikująca leki do prób z udziałem ludzi.

#### *Wpływ homoftalazyn na ośrodkowy układ dopaminergiczny*

Wykazano, że niektóre substancje o rdzeniu 2,3-benzodiazepinowym pomimo hamowania transportera zwrotnego dopaminy (tzn. zwiększania stężenia dopaminy w synapsach), wykazują antagonistyczny wpływ względem działania amfetaminy (tofizopam).

Badania przedkliniczne wykazały hamowanie przez tofizopam (w dawce 84,0 mg/kg) nadmiernej ruchliwości indukowanej amfetaminą (w dawce 7,5 mg/kg), u myszy. Silniejsze działanie o charakterze zależnym od dawki zaobserwowano po zastosowaniu wyższych dawek (14).

Analizowano także wpływ tofizopamu na efekty dootrzewnowego stosowania kokainy u myszy. Dwa-dziesiąt minut po doustnym podaniu tofizopamu podawano kokainę w dawce 12,5 mg/kg. Zaobserwowano 50% redukcję nadmiernej aktywności lokomotorycznej po zastosowaniu tofizopamu w dawce 54,0 mg/kg. Podobnie jak w przypadku amfetaminy ten efekt był zależny od dawki.

Szczególnie interesujące wyniki uzyskano w badaniu wpływu tofizopamu na toksyczność amfetamino-

wą u myszy. Dootrzewnowe podawanie amfetaminy w dawce 12,5 mg/kg wywoływało efekt letalny. Natomiast podanie doustne tofizopamu (100 mg/kg) przed iniekcją amfetaminy ujawniało właściwości protekcyjne tego leku.

Badania kliniczne potwierdzające opisany kierunek wpływu na układ dopaminergiczny przeprowadzono przy pomocy metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Badano ludzki płyn mózgowo-rdzeniowy i stwierdzono, że tofizopam w dawce 100 mg/kg podany drogą doustną obniża poziom metabolitu dopaminy – HVA (kwasu homowanilinowego). Nie odnotowano natomiast wpływu leku na poziomy 5-HIAA (5-hydroksyindolo-3-octan – metabolit serotoniny) oraz MHPG (3-metoksy-4-hydroksyfenyloglikol – metabolit adrenaliny oraz noradrenaliny) (11).

Odmienne efekty wpływu tofizopamu na układ dopaminergiczny otrzymał Chopin i wsp. (2). Tofizopam zwiększał liczbę zachowań charakterystycznych dla działania ligandów dopaminergicznych (amfetaminy, amineptyny), takich jak skoki i wspinanie – objawy stereotypii („jumping behavior”, „climbing behavior”), tzn. potęgował zachowania dopaminergiczne.

Powyższe badania wyraźnie wskazują na istotny udział tofizopamu, podobnie jak nerizopamu oraz girizopamu, w regulacji czynności ośrodkowego układu dopaminergicznego. Aby lepiej zrozumieć mechanizm tego zjawiska w naszym laboratorium przeprowadzono badania właściwości tofizopamu przy użyciu agonisty receptorów dopaminergicznych  $D_2$  kwiniroli (kwiniroli), podanego szczurom w dawce 1,0 mg/kg. W tym badaniu oceniano parametry lokomotoryczne (przebyty dystans, stopień eksploracji nowego otoczenia, liczbę i czas epizodów znieruchomienia) pomiędzy grupą zwierząt, którym podawano kwinirol (1,0 mg/kg) oraz grupą zwierząt, którym podawano kwinirol (1,0 mg/kg) łącznie z tofizopamem (150 mg/kg). Tofizopam redukuje pobudzenie eksploracji (liczbę odwiedzonych sektorów klatki – miara aktywności motorycznej) wywołane kwinirolem, nie wpływając na przebyty dystans. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy wymienionymi grupami w liczbie oraz czasie trwania epizodów znieruchomienia.

W badaniach własnych oceniany był także wpływ tofizopamu na awersyjną oraz apetytywną wokalizację ultradźwiękową zwierząt (modele zaburzeń emocjonalnych). Analiza wokalizacji ultradźwiękowej szczurów pozwala badaczom określić stan emocjonalny zwierzęcia. Szczury emitują dźwięki niesłyszalne dla człowieka, które możemy zaobserwować w formie spektrogramów. W zapisie spektrogramu w szerokim paśmie częstotliwości (5-120kHz) wyodrębnić można dwie główne ścieżki emisji dźwięków różniących się

częstotliwością, interwałami czasowymi, długością emisji oraz stabilnością (zmiennością) częstotliwości. Pierwsza ścieżka emisji dźwięku to wokalizacja awersyjna, oscylująca w paśmie częstotliwości 18-27 kHz (tzw. 22-kHz). Emisja wokalizacji w paśmie awersyjnym bezpośrednio wyraża negatywny stan emocjonalny zwierzęcia i wywołwana jest najczęściej bodźcami stresowymi. Drugą ścieżką emisji dźwięku jest wokalizacja apetytywna emitowana w paśmie 39-79.2 kHz, najczęściej w paśmie częstotliwości około 55-kHz.

Apetytywna wokalizacja różni się w parametrach akustycznych od pasma awersyjnego i odzwierciedla pozytywny stan emocjonalny zazwyczaj związany w interakcjami socjalnymi. Pasma apetytywne występuje zawsze powyżej częstotliwości 39 kHz, epizody są krótkie czas trwania epizodu zazwyczaj nie przekracza 100 ms (zakres 12-103 ms), różnice w częstotliwości w pojedynczym epizodzie mogą wynosić nawet 18 kHz.

Badanie wokalizacji ultradźwiękowej wykazało, że tofizopam w dawce 150 mg/kg nie redukuje awersyjnej wokalizacji, jak również jej nie wzmacniał. Natomiast lek referencyjny – buspiron w dawce 3,0 mg/kg istotnie statystycznie redukuje wokalizację awersyjną (pasmo 18-25 kHz), to znaczy działał przeciwnie. W kolejnym badaniu wykazano, że tofizopam w dawce 150 mg/kg istotnie statystycznie redukuje wokalizację ultradźwiękową „apetytywną” w paśmie 55-kHz. Emisja dźwięków w paśmie 55-kHz prawdopodobnie wiąże się ze zwiększoną aktywacją ośrodkowego układu dopaminergicznego, to znaczy, przeżywaniem przyjemności (36). Lek referencyjny – buspiron w dawce 3,0 mg/kg nie redukuje wokalizacji w tym paśmie. Opisane własne dane potwierdzają działanie antydopaminergiczne tofizopamu (dane nie opublikowane).

Aby jednoznacznie wykazać kierunek zmiany w czynności układu dopaminergicznego przez tofizopam konieczne jest przeprowadzenie kolejnych badań. Planowane eksperymenty badające wpływ tofizopamu na stężenia neuroprzebieżników oraz ich metabolitów w strukturach mózgu, prawdopodobnie wykażą w bardziej precyzyjny sposób rolę tofizopamu w regulacji czynności układu dopaminergicznego (wpływ na układ nigro-striatalny).

#### *Wpływ 2,3-benzodiazepin na czynność układu GABA-ergicznego*

Przeprowadzono liczne badania oceniające wpływ tofizopamu na układ GABA-ergicznego mózgu, miejsce działania 1,4-benzodiazepin. Tofizopam wykazuje odmienny profil farmakologiczny od klasycznych 1,4-benzodiazepin, nie powoduje sedacji ani miorelaksacji, nie działa przeciwdrgawkowo, jednakże wywołuje u ludzi efekt przeciwnie. Tofizopam nie

łączy się z miejscem benzodiazepinowym w recepto-  
rze GABA, ale jednocześnie pośrednio zwiększa powi-  
nowadztwo ligandów GABA-ergicznym do receptora  
GABA-A (33, 20). Część autorów, np. Saano i wsp.  
(28, 29, 30) sugerują, że efekt psychoaktywny tofizo-  
pamu wiąże się z wpływem na transmisję GABA-er-  
giczną w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN).

Badania Stengerta i wsp. z 1983 roku wykazały  
zwiększony efekt przeciwlękowy diazepamem po do-  
daniu tofizopamu w testach „karanego picia” oraz  
w teście konfliktowym („Geller-Seifter conflict test”).

W badaniach *in vitro* tofizopam zwiększał (o 30%)  
zdolność wiązania [<sup>3</sup>H]-flunitrazepamu do podjed-  
nostki benzodiazepinowej receptora GABA-A zarówno  
w hipokampie jak i mózdzku (20). Ponadto, wykaza-  
no potencjalizację działania 1,4-BDZ przez tofizopam  
w modelu drgawek rozniecanych pentylenetetrazo-  
lem (PTZ).

Tofizopam nie znosił drgawek indukowanych przez  
PTZ, ale w znaczący sposób (o 35%) zwiększał dzia-  
łanie przeciwdrgawkowe diazepamem (Mennini, 1982).  
Potencjalizacja działania diazepamem nie była wywoła-  
na interakcją farmakokinetyczną, o czym świadczył  
brak różnic w stężeniu zarówno diazepamem jak i des-  
metyldiazepamem (DDZ) (metabolitu diazepamem)  
w mózgu, w obu badanych grupach (20).

Wpływ tofizopamu na potencjalizację działania  
1,4-BDZ wykazano również w modelu drgawek wywo-  
ływanych 1-metylo-9H-pirydo-[3,4-b]indolem (har-  
maną). Harmana indukuje drgawki u myszy w 20 do  
40 sekund po iniekcji. Tofizopam (w dawkach 50-300  
mg/kg) nie wpływał na próg drgawkowy, natomiast  
diazepam (7,5 mg) znacząco zmniejszał drgawki in-  
dukowane przez harmanę. Efekt przeciwdrgawkowy  
diazepamem wzmocniony był nawet o 70% u zwierząt  
premedykowanych tofizopamem w dawce 300 mg/kg.  
Podobne wyniki otrzymano w modelu drgawek induko-  
wanych bodźcami elektrycznymi. Diazepam w daw-  
ce 10 mg/kg działał przeciwdrgawkowo, a efekt ten  
wzrastał o 65% w przypadku kiedy był podawany łącznie  
z tofizopamem (300 mg/kg) (33).

Stwierdzono także, że tofizopam nasila wiąza-  
nie [<sup>3</sup>H]-muscimolu (agonisty receptora GABA-A)  
do receptorów GABA w mózgu gryzoni (29). Inne  
2,3-benzodiazepiny, takie jak: nerizopam oraz girizo-  
pam wykazują podobne właściwości nasilania wiąza-  
nia 1,4-BDZ do receptora GABA-A. Jedynym ligan-  
dem, którego wiązanie z receptorem GABA-A jest  
blokowane przez tofizopam jest Ro-5—4684 (ligand  
obwodowych receptorów benzodiazepinowych) (24).  
Tofizopam w dawce 100 mg/kg znosił drgawki indu-  
kowane 1,4-benzodiazepiną Ro-5-4864, o właściwoś-  
ciach antagonistycznych (24, 12). Nie odnotowano

natomiast właściwości przeciwdrgawkowych leku  
w modelach drgawkowych z użyciem pentylenete-  
trazolu lub pikrotoksyny. Wart zaznaczenia jest fakt,  
że tofizopam w dawkach 25, 30 mg/kg skracał czas do  
wystąpienia drgawek wywołanych pentylenetetrazo-  
nem (60 mg/kg) lub pikrotoksyną (6,0 mg/kg) (24).

Wyżej opisane badania wykazują, że tofizopam  
potencjalizuje działania 1,4-benzodiazepin, jednak-  
że mechanizm molekularny tego zjawiska pozostaje  
niewyjaśniony. Tofizopam nasilał powinowactwo nie  
tylko agonistów ale również i antagonistów recepto-  
rów GABA, takich jak PTZ (tofizopam zmniejszał wiel-  
kość dawki PTZ-u potrzebną do wywołania drgawek).  
Próbując wytłumaczyć to zjawisko, warto zaznaczyć,  
że homoftalazyny, związane strukturalnie z tofizopa-  
mem wykazują właściwości selektywnego inhibitora  
fosfatazy 2A. W wyniku inhibicji tego enzymu (defo-  
sforylującego) zwiększa się stopień ufosforylowania  
receptora GABA-A, co prawdopodobnie nasila zdol-  
ność wiązania ligandów z tym receptorem.

Tofizopam dawkozależnie hamował aktywność lo-  
komotoryczną, interakcje socjalne oraz zachowania  
eksploracyjne szczurów w teście „holeboard” (otwar-  
te pole z otworami w podłodze). Natomiast antagoni-  
sta miejsca benzodiazepinowego receptora GABA-A,  
CGS 8216, w dawce 10 mg/kg, znosił efekty działania  
tofizopamu (26).

Oceniano również wpływ tofizopamu na parame-  
try snu wywołanego podaniem dootrzewnowym pen-  
tobarbitalu, w dawce 25,0 mg/kg (14). Dawka 25,0  
mg/kg leku nie powodowała wystąpienia snu u my-  
szy, jednakże podanie tofizopamu (50 mg/kg) 45 mi-  
nut przed iniekcją pentobarbitalu, w sposób zależny  
od dawki zwiększało odsetek zwierząt zapadających  
w sen. Świadczy to o potencjalizacji działania nasen-  
nego pentobarbitalu. Tofizopam w dawce 70 mg/kg  
o 100% wydłużał również czas snu wywołany hek-  
sobarbitalem (75 mg/kg Evipan; i.p.) u myszy (14).  
Natomiast podana dawka 200 mg/kg tofizopamu  
wydłużała o 281,5% czas snu wywołany hekso-  
barbitalem. Podobne doświadczenie przeprowadzono na  
szczurach stosując tofizopam w dawkach 100; 200;  
300 mg/kg (14). Nie zaobserwowano znamiennej po-  
tencjalizacji działania hekso-  
barbitalu przez tofizopam  
u szczurów; wydłużenie czasu snu nie przekraczało  
100% nawet po dawce 400 mg/kg.

Badania cytowane w tym rozdziale wykazują, że  
tofizopam wpływa pobudzająco na czynność ośrodko-  
wego układu GABA-ergicznego. Zwiększa powinowa-  
ctwo radioligandów GABA-A ([<sup>3</sup>H]-flunitrazepamu),  
potencjalizuje działania diazepamem u szczurów, oraz  
barbituranów (hekso-  
barbitalu oraz pentobarbitalu)  
u myszy. Mechanizm potencjalizacji efektów ligan-

dów receptora GABA-A pozostaje jednak niewyjaśniony i wymaga dalszych badań.

#### *Wpływ 2,3-benzodiazepin na układ opioidowy*

Przeprowadzono szereg badań oceniających wpływ tofizopamu na czynność układu opioidowego. Badania na myszach i kotach wykazały antagonistyczne działanie leku w stosunku do morfiny. Podskórne podanie morfiny (10 mg/kg) powodowało u kotów silne pobudzenie, które manifestowało się wzmożoną aktywacją motoryczną, nasilonym miauczeniem. Natomiast tofizopam w dawkach 50; 75; 100 mg/kg podany 1h przed iniekcją morfiny osłabiał efekty morfiny, a dawka 200 mg/kg całkowicie znosiła efekty leku opioidowego (14).

U myszy, tofizopam w dawce 210 mg/kg zmniejszał o połowę indukowaną przez morfinę reakcję polegającą na uniesieniu ogona („Straub tail reaction”, spowodowaną skurczem mięśnia krzyżowo-guziacznego) – efekt ten jest charakterystyczny dla opioidów. Wpływ tofizopamu miał charakter zależny od dawki. Z drugiej strony, zaobserwowano wzrost efektu przeciwbólowego morfiny po podaniu łącznym z tofizopamem (14).

W eksperymentach przeprowadzonych w latach 90. węgierscy badacze wykazali potencjalizację katelepsji indukowanej morfiną przez nerizopam i girizopam (7). Następnie, badacze ci stwierdzili, że nerizopam i girizopam zwiększają indukowany naloksonem spadek konsumpcji roztworu sacharozy w wodzie. Redukcja konsumpcji sacharozy w wodzie może świadczyć o hamowaniu zachowań apetytywnych. Nerizopam w badaniach *in vitro* zwiększał także liczbę miejsc wiązania [<sup>3</sup>H]-naloxonu do receptora opioidowego, w prążkowie.

Próbując wytłumaczyć mechanizm potencjalizacji efektów ligandów receptorów opioidowych przeprowadzono badania, które pokazały, że pochodne 2,3-benzodiazepiny wykazują właściwości selektywnego inhibitora fosfatazy 2A. Hamowanie tego enzymu defosforylującego – fosfatazy 2A (PP-2A) zwiększa stopień ufosforylowania receptora opioidowego  $\mu$ , co prawdopodobnie nasila zdolność wiązania ligandów z receptorem opioidowym. Sugerowano również, że efekt farmakologiczny tofizopamu może być związany ze zmianą wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału opioidowego w układzie striato-pallido-nigralnym.

Z opisanych badań analizujących wpływ homofalazyn na układy neuroprzebieżnikowe wynika, że 2,3-benzodiazepiny (na przykładzie tofizopamu) modyfikują czynność układu: dopaminergicznego, GABAergicznego oraz opioidowego. Sposób modyfikacji tych układów pozostaje jednak niewyjaśniony, ale niewą-

pliwie może mieć istotny wpływ na kliniczny efekt anksjolityczny oraz przeciwdepresyjny tofizopamu. Redukcja spontanicznej ruchliwości u myszy po podaniu tofizopamu oraz jego właściwości antagonistyczne w stosunku do ośrodkowych substancji stymulujących wywołujących pobudzenie lokomotoryczne, dowodzą także silnego działania uspokajającego tego leku.

### **TOPOGRAFIA MIEJSC WIĄZANIA HOMOFTALAZYN (2,3-BENZODIAZEPIN)**

Rzeczony rozwój technik laboratoryjnych na przestrzeni 30. ostatnich lat umożliwił lokalizację miejsc wiązania [<sup>3</sup>H]-girizopamu – radioligandu strukturalnie związanego z tofizopamem w OUN.

Tofizopam, nerizopam oraz girizopam wiążą się z tymi samymi substratami białkowymi (enzymami lub receptorami) w szlaku nigrostriatalnym (prążkowie). Badania autoradiograficzne z użyciem [<sup>3</sup>H]girizopamu wykazały wysoką gęstość miejsc wiązania w następujących strukturach: guzek węchowy (*tuberculum olfactorium*), jądro półleżące (*accumbens nucleus*), jądro ogoniaste (*caudate nucleus*), skorupa (*putamen*), gałka bladej (*globus pallidus*), jądro wewnętrzkonarowe (*entopeduncular nucleus*), istota czarna (*substantia nigra*). Nie stwierdzono wiązania tego radioligandu w innych strukturach ośrodkowego układu nerwowego (8).

Najwyższa gęstość wiązania występowała w gałce bladej (*globus pallidus*), jądrze ogoniastym (*caudate nucleus*), skorupie (*putamen*) oraz w istocie czarnej (*substantia nigra*). Duże zagęszczenie miejsc wiązania 2,3-BDZ zaobserwowano także w jądrze półleżącym (*accumbens nucleus*), brzusznej części gałki bladej (*globus pallidus*) z substancją bezimienną (*substantia innominata*) włącznie, guzku węchowym (*tuberculum olfactorium*) oraz w jądrze wewnętrzkonarowym (*entopeduncular nucleus*).

### **LOKALIZACJA AUTORADIOGRAFICZNA MIEJSCA WIĄZANIA RADIOLIGANDU**

Należy podkreślić, że rozmieszczenie miejsc wiązania 2,3-benzodiazepin w mózgu pokrywa się z lokalizacją receptorów GABA-A-ergicznymi, dopaminergicznymi, kanabinolowymi i opioidowymi. Ilościowe badanie autoradiograficzne nirizopamu, girizopamu oraz tofizopamu nie wykazało istotnych różnic między nimi w liczbie miejsc wiązania w szlaku striato-pallido-nigralnym (zwojach podstawy mózgu- *basal ganglia*). Wszystkie trzy związki silnie wiązały się

z białkami (enzymami lub receptorami) tego szlaku neuronalnego (9, 7). W badaniach z użyciem [<sup>3</sup>H]-gizopamu dowiedziono, że tofizopam, girizopam oraz nerizopam silnie wypierają radioligand z miejsca wiązania, co wskazuje na podobną lokalizację miejsc wiązania tych związków. Diazepam wykazywał również, lecz w niewielkim stopniu, zdolność wypierania [<sup>3</sup>H]-gizopamu (7). Natomiast serotonina, dopamina, GABA oraz kwas glutaminowy nie były w stanie wyprzeć radioligandu z miejsca jego wiązania.

Dodatkowo przeprowadzono szczegółowe badania autoradiograficzne, po wykonaniu selektywnych lezji chemicznych mózgu. Lezje dokonywano za pomocą związków cytotoksycznych, kwasu  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego (AMPA) (10, 50 i 100 nM), oraz kwasu kainowego, wstrzykiwanego szczurom do prądkowia, gałki bladej oraz istoty czarnej (10, 23). Uszkodzenie głowy jądra ogoniastego (głowej części prądkowia) powodowało spadek miejsc wiązania 2,3-benzodiazepin, znakowanych [<sup>3</sup>H]-gizopamem (8). Lezja gałki bladej powodowała zmniejszenie liczby miejsc wiązania 2,3-benzodiazepin w skorupie oraz w samej gałce bladej. Nie zaobserwowano zmian w wiązaniu radioligandu w istocie czarnej.

Jednostronne uszkodzenie istoty czarnej powodowało natomiast zmniejszenie liczby miejsc wiązania [<sup>3</sup>H]-gizopamu tylko w substancji czarnej, a nie wpływało na wiązanie w prądkowiu, gałce bladej, jądrze wewnątrzkonarowym, oraz w nieuszkodzonej istocie czarnej (10, 23).

Natomiast iniekcje neurotoksyny 6-hydroksydopaminy (6-OHDA), selektywnie uszkadzające neurony katecholaminergiczne, do substancji czarnej, nie wpływało na miejsca wiązania 2,3-benzodiazepin w prądkowiu oraz gałce bladej (23). Jednostronne chirurgiczne przecięcie pęczka przyśrodkowego przodomózgowia (*medial forebrain bundle*), włącznie ze szlakami zstępującymi strato-nigralnymi oraz wstępującymi nigrostriatalnymi, powodowało zanik miejsc wiązania [<sup>3</sup>H]-gizopamu (radioligandu 2,3-benzodiazepinowego) w istocie czarnej, natomiast nie wpływało na miejsca wiązania w prądkowiu, gałce bladej, brzuszonym prądkowiu czy jądrze półleżącym (23, 7).

Powyższe dane wskazują na ścisłe powiązanie 2,3-benzodiazepin z zstępującymi szlakami strato-nigralnymi (7). Ponadto, wyniki badań przy użyciu lezji chemicznych dowodzą, że 2,3-benzodiazepiny w prądkowiu są ulokowane postsynaptycznie, na neuronach projekcyjnych szlaku striato-nigralnego. Warto nadmienić, że jedna z izoform enzymu cykazy adenylowej – izoforma V wykazuje charakterystyczny schemat rozmieszczenia w mózgu, pokrywający się z miejscami wiązania [<sup>3</sup>H]-2,3-benzodiazepin. Dotych-

czas poznano dziewięć izoform cykazy adenylowej i tylko jeden jej podtyp – cykazy adenylowa V występuje wyłącznie w układzie strato-nigralnym, gdzie występują średniej wielkości neurony GABA-ergiczne, wykazujące również ekspresję receptorów D1-dopaminergicznych (7). Te dane potwierdzają związek homoftalazyn z ośrodkowym unerwieniem dopaminergicznym i GABA-ergicznym.

#### ANALIZA IMMUNOCYTOCHEMICZNA EKSPRESJI BIAŁKA C-FOS

Białko c-Fos jest produktem genu c-fos, przedstawiciela genów tzw. wczesnej odpowiedzi komórkowej. W komórkach nie pobudzonych poziom mRNA dla c-fos jest prawie niewykrywalny, natomiast stymulacja różnorodnymi bodźcami wywołuje szybką i silną ekspresję tego genu. Immunocytochemiczne oznaczenie białka c-Fos pozwala na mapowanie aktywacji neuronalnej (tzw. transkrypcyjnej) mózgu (16). Analiza immunocytochemiczna ekspresji białka c-Fos dwie godziny po podaniu nerizopamu (lub girizopamu) wskazuje na aktywację głowowej, grzbietowo-przyśrodkowej oraz bocznej części prądkowia (22). Komórki Fos-pozytywne występowały również w gałce bladej, guzku węchowym, stożku (*cone*) oraz łupinie (*shell*), ale nie w rdzeniu (*core*) jądra półleżącego (*accumbens nucleus*). Natomiast nie wykazano ekspresji białka c-Fos w istocie czarnej (*substantia nigra*), jądrze wewnątrzkonarowym oraz w jądrach podwzgórzowych.

Pięć godzin po podaniu nerizopamu liczba neuronów Fos-pozytywnych zmniejszyła się znacząco w prądkowiu, gałce bladej oraz w jądrze półleżącym, jednak co ciekawe, Fos-pozytywne neurony ujawniły się w warstwie zbitej (*compact*) i siateczkowej (*reticular*) istoty czarnej (22).

Wyniki badań ekspresji białka c-Fos wskazują, że 2,3-benzodiazepiny początkowo aktywują prądkowie, gałkę bladą, guzek węchowy oraz łupinę jądra półleżącego, a następnie proces aktywacji koncentruje się na warstwie zbitej i siateczkowej istoty czarnej.

#### PRZEGLĄD BADAŃ KLINICZNYCH

Tofizopam stosowany jest w zaburzeniach lękowych od 1976 roku. Szybko wchłania się z przewodu pokarmowego ( $t_{max}$  1-1,5h), okres półtrwania wynosi 6 godzin. Klinicznie nie wywiera działania nasennego, przeciwdrgawkowego, miorelaksacyjnego, nie pogarsza koncentracji, nie potęguje sedatywnego działania alkoholu (27). Pierwsza praca na temat ba-

dań klinicznych tofizopamu ukazała się w roku 1979 w *American Journal of Psychiatry* (13). Dotyczyła badania metodą podwójnie ślepej próby z użyciem placebo, przeprowadzonego w grupie 57 chorych leczonych ambulatoryjnie z powodu współwystępujących objawów lęku i depresji (4). W badaniu tym tofizopam okazał się skuteczniejszy niż placebo. Z kolei badania przeprowadzone w Diamant Laboratories na grupie 47 pacjentów z objawami depresji i lęku, pokazały istotne działanie anksjolityczne tofizopamu, stosowanego w dawce dobowej 200-300 mg (13). Przeprowadzono też kilka otwartych 4-tygodniowych badań u osób z zaburzeniami lękowymi i lękowo-depresyjnymi. Wykazały one przewagę działania leku nad placebo (35, 4). W kilku kolejnych badaniach wykazano skuteczność tofizopamu w hamowaniu zaburzeń psychicznych (dysforii) występujących podczas klimakterium (18, 3, 17, 19). U pacjentek stosujących w okresie menopauzy tofizopam w dawce 3 x 50 mg wykazano spadek poziomu adrenaliny oraz noradrenaliny we krwi (hormony stresu). Natomiast u tych samych pacjentek poziom prolaktyny we krwi uległ nieznacznemu zmniejszeniu, a poziom folikulostymuliny (FSH) oraz hormonu luteinizującego (LH) nie uległ zmianie (18). Dane z badań klinicznych wykazują na bardzo dobrą tolerancję leku i skuteczność zarówno w zaburzeniach lękowych, jak i w stanach lęku występujących na podłożu organicznym (1), w zespołach przedmiejscowych, w zaburzeniach klimakterycznych (19) i lęku współistniejącym z innymi zaburzeniami psychicznymi (21). Działanie przeciwłękowe 150-300 mg/dobę tofizopamu nie różniło się od działania 6-9 mg diazepam, ale tofizopam nie wywierał wpływu nasennego ani miorelaksacyjnego (cyt. za Rzewuska, 2003) (27).

We wszystkich badaniach kontrolowanych placebo bardzo rzadko (nie częściej niż w grupie placebo) obserwowano występowanie objawów niepożądanych (27). Wśród działań niepożądanych odnotowano zaburzenia żołądkowo-jelitowe, alergiczne reakcje skórne, bóle głowy, drętwienie kończyn, pobudzenie, suchość w ustach, zawroty głowy. Wyniki badań z roku 2003 wskazują, że u osób z lękiem uogólnionym poprawa po stosowaniu tofizopamu, hydroksyzyny i diazepam była bardzo podobna (27). Każdy z leków powodował istotną redukcję nasilenia objawów lękowych w skali Hamiltona zarówno po 2 tygodniach, jak i po 6 tygodniach leczenia. Nie stwierdzono różnic częstości występowania objawów niepożądanych podczas stosowania wszystkich trzech ocenianych leków (27). Do lat 80. w Europie przeprowadzono 29 badań w grupie 1200 pacjentów z użyciem tofizopamu. Dzięki tym badaniom wykazano charakter uspokajający oraz przeciwłękowy leku.

Efekt terapeutyczny wykazano u pacjentów z pobudzeniem psychomotorycznym, wykazujących objawy lęku oraz u pacjentów z zaburzeniami psychosomatycznymi. W licznych badaniach odpowiadających fazom IIIb i IV przeprowadzonych na Węgrzech, we Francji, w Japonii oraz Polsce w latach 70., 80., 90. a także w 2003 roku, stwierdzono skuteczność tofizopamu w leczeniu zaburzeń lękowych z towarzyszącymi dolegliwościami somatycznymi, obejmującymi dysfunkcje układu autonomicznego: serca i układu krążenia, przewodu pokarmowego, a także w zaburzeniach somatyzacyjnych związanych z klimakterium oraz w innych zaburzeniach lękowych i neurastenii. Jednocześnie, w wielu badaniach obserwowano właściwości tofizopamu odmienne względem 1,4-benzodiazepin. Istnieją doniesienia na temat korzystnych właściwości tofizopamu, takich jak: brak osłabienia sprawności psychomotorycznej, brak działania miorelaksacyjnego, niewielka częstość występowania działań niepożądanych oraz brak objawów wskazujących na ryzyko uzależnienia.

Niestety, tylko nieliczne badania kliniczne odpowiadają przyjętym standardom Dobrej Praktyki Klinicznej (GCP), co jednak nie wyklucza ich wiarygodności i rzetelności.

## PODSUMOWANIE

Wyniki szeregu badań behawioralnych oraz biochemicznych wykonanych na przestrzeni czterdziestu lat powiększyły naszą wiedzę na temat mechanizmu działania oraz efektów klinicznych 2,3-benzodiazepin. Konieczne jest przeprowadzenie kolejnych analiz w celu jednoznacznego określenia mechanizmu działania homoftalazyn, strukturalnie związanych z tofizopamem.

Homoftalazyny, ze względów podanych powyżej, pozostają interesującą grupą leków psychotropowych o efekcie uspokajającym i przeciwłękowym, pozbawionych potencjału uzależniającego. Ich wielokierunkowe działanie hamujące na układ dopaminergiczny, i modulujące czynność endogennych układów opioidowych, może przypominać do pewnego stopnia nowe leki neuroleptyczne, których częściowy agonizm względem układu dopaminergicznego i serotoninergicznego zaowocował bardzo ciekawym profilem działania antypsychotycznego. Homoftalazyny pozostają bardzo interesującą i nie odkrytą do końca grupą leków psychotropowych, o ciągle istotnym potencjale klinicznym. Potrzebne są jednak dalsze intensywne badania, wymagające bardzo dużych środków finansowych, co w świecie konkurujących firm oraz istnie-



nia dużej grupy leków konkurencyjnych jest bardzo trudne i wymaga dużej determinacji właściciela patentu. Brak dalszych badań może przekreślić szansę na karierę kliniczną homoftalazyn.

## PIŚMIENNICTWO

- Banki CM. Comparative study with Grandaxin and diazepam in alcohol withdrawal syndrome and gerontopsychiatric disorders. *Therapia Hungarica* 1983; 31, 3: 120-126.
- Chopin P, Stenger A, Couzinier JP, Briley M. Indirect dopaminergic effects of tofisopam, a 2,3-benzodiazepine, and their inhibition by lithium. *Jurnal Pharm Pharmacol* 1985; 37, 12: 917-919.
- Csillag M, Gimes G, Kiss C, Sebo J, Toth F, Bolla K. The treatment of climacteric syndrome with tofisopam. *Ther Hung* 1975; 23, 4: 164-169.
- Goldberg HL, Finnerly RJ. Comparative efficacy of tofisopam and placebo. *Am J Psychiatry* 1979; 136, 2: 196-199.
- Graham L Patrick. *Chemia medyczna – podstawowe zagadnienia 2003*, second edition. Oxford University Press. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2003.
- Horvath K. Highlights of CNS research at IDR: 2,3-benzodiazepines. Institute for Drug Research, Budapest, Hungary, 2001; 56: 56-60.
- Horvath EJ, Horvath K, Harmori T, Fetke MI, Sólyom S, Palkovits M. Anxiolytic 2,3-benzodiazepines, their specific binding to the basal ganglia. *Progress in Neurobiology* 2000; 60, 4: 309-342.
- Horvath EJ, Salomon C, Bakonyi A, Fetke MI, Palkovits M. [3H]-girisopam, a novel selective benzodiazepine for the 2,3-benzodiazepine binding site. *Brain Research Protocols* 1999; 4: 230-235.
- Horvath EJ, Hudak J, Palkovits M, Lankei Z, Gyure KI, Fetke MIK, Aranyi P. Autoradiographic localization and quantitative determination of specific binding sites of anxiolytic homophtalazines (formerly called 2,3-benzodiazepines) in the striato-pallido-nigral system of rats. *Molecular Brain Research* 1994; 22: 211-218.
- Horvath E, Hudak J, Palkovits M, Lenkei Z, Fekete IK, Aranyi P. A novel specific binding site for homophtalazines in rat brain. *European Journal of Pharmacology* 1993; 236: 151-153.
- Hovi-Viander M, Kanto J, Scheinin H, Scheinin M. Tofisopam and midazolam: differences in clinical effects and in changes of CSF monoamine metabolites. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1985; 20, 5: 492-496.
- Kenessey A, Graf L, Paldi-Haris P, Iang T. Interaction of 2,3-benzodiazepines with peripheral benzodiazepine receptors. *Pharmacol Research* 1987; 19, 1: 1-14.
- Kokoszka A, Bryła LA. Tofisopam – przegląd piśmiennictwa. *Psychofarmakoterapia Wiadomości Psychiatryczne* 2001; 4, 1: 21-24.
- Komlós E, Kosóczy L, Petőcz L, Vargha A, Grasser K. Pharmacology of 1-(3,4-dimethoxy-phenyl)-4-methyl-5-ethyl-7,8-dimethoxy-5H-2,3-benzodiazepine (EGYT-341). *Pharmacological Laboratory of EGYT Pharmacochemical Works Budapest, Hungary*, 1968; 373-471.
- Kanto J, Kangan I, Leppenen T, Manstikka M, Sivakov I. Tofisopam: a benzodiazepine derivative without sedative effect. *International Journal of Clinical Pharmacology* 1982; 20, 7: 309-312.
- Lehner M, Wisłowska A, Taracha E, Zienowicz M, Płaźnik A. The application of c-Fos-immunoreactivity in neuropsychopharmacology. *Post Psychiatr Neurol* 2003; 12, 3: 335-345.
- Libus J, Libusova E. Therapy and pseudoneurotic symptoms with tofisopam. *Agressologie* 1981; 22 (D): 21-22.
- Magyar Z, Böze T, Szecsenyi I, Gyopar E, Kardos G, Nemeskeri F. Study on the anxiolytic effect of tofisopam (Grandaxin) in relieving the psychical and vegetative symptoms in menopause. *Postgraduate Review for Doctors* 2000; 5: 74-76.
- Mashima S i wsp. EGYT-341 (Tofisopam) – Evaluation on the effects on climacteric disorders. A multicentere, double blind comparison trial with diazepam and estriol as contrast drugs, 1992.
- Mennini T, Abbiati A, Caccia S, Cotecchia S, Gomez A, Granatini S. Brain levels of tofisopam in the rat and relationship with benzodiazepine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1982; 321, 2: 112-115.
- Molcan J, Novotny V, Korinkova V, Konikova M. Tofisopam in therapy of anxious-depressive syndromes. *Agressologie* 1981; 22: 23-24.
- Palkovits M, Baffi JS, Berzsenyi P, Horvath EJ. Anxiolytic homoftalazines increase Fos-like immunoreactivity in selected brain areas of the rat. *European Journal of Pharmacology* 1997; 331: 53-63.
- Palkovits M, Lovas G, Horvath E. Binding of girisopam (a 2,3-benzodiazepine derivative) to the substantia nigra is prevented by lesions of the striatonigral pathway. *Neuroscience* 1998; 83, 3: 799-806.
- Pellow S, File SE. Behavioral actions of Ro 5-4864: a peripheral-type benzodiazepine? *Life Sci* 1984; 35, 3: 229-240.
- Pellow S, File SE. Is tofisopam an atypical anxiolytic? *Neurosci Biochem Rev* 1986; 10, 2: 221-227.
- Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1986; 24, 3: 525-529.
- Rzewuska M. Porównanie skuteczności i bezpieczeństwa leków w zaburzeniach lękowych uogólnionych. Wieloośrodkowa randomizowana podwójnie ślepa próba porównująca działanie tofisopamu, hydroksyzyny i diazepam. *Farmakoterapia w Psychiatrii i Neurologii* 2003; 3: 53-65.
- Saano V, Urtti A. Tofisopam modulates the affinity of benzodiazepine receptors in the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 1982; 17, 2: 367-369.
- Saano V. Tofisopam affects binding of [3H]muscimol to gamma-amino-butyric acid receptors in rat and mouse brains. *Pharmacol Res Commun* 1982; 14, 8: 745-757.
- Saano V. Tofisopam selectively increases the affinity of benzodiazepine binding sites for [3H]-flunitrazepam but not for beta[3H]-carboline-3-carboxylic acid ethyl ester. *Pharmacol Res Commun* 1982; 14, 10: 971-81.
- Saano V, Urtti A, Airaksinen MM. Increase in 3H-flunitrazepam binding in vitro and in vivo to rat brain benzodiazepine receptors by tofisopam, a 3,4-benzodiazepine. *Pharmacol Res Commun* 1981; 13, 1: 75-85.
- Saano V. Tofisopam selectively increases the action anticonvulsants. *Med Biol* 1986; 64, 4: 201-206.
- Saano V, Tacke U, Sopanen L, Airaksinen MM. Tofisopam enhances the action of diazepam against tremor and convulsions. *Med Biol* 1983; 61, 1, 49-53.
- Salomon C, Horvath EJ, Fekete MI, Aranyi P. A novel specific binding site for anxiolytic homophtalazines in the rat brain. *FEBS Lett* 1992; 308, 2: 215-217.
- Sladka R, Dostalova J, Haskovcova V, Jarosova M, Faltus F, Slanska J, Filip V. A placebo-controlled clinical trial with tofisopam in the treatment of anxiety neurosis. *Therapia Hungarica* 1979; 27, 4: 176-180.
- Wintink J, Brudzyński SM. The related roles of dopamine and glutamate in the initiation of 50-kHz ultrasonic calls in adult rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2001; 70: 317-323.

*Adres korespondencyjny:*

*Zakład Neurochemii*

*Instytut Psychiatrii i Neurologii.*

*ul. Sobieskiego 9, 02-957 Warszawa*