

Kronik Diazepam Uygulamasının ve Diazepam Yoksunluğunun Kaçınma Davranışı Üzerindeki Etkisi

Belgin AYVAŞIK*
Ortadoğu Teknik Üniversitesi

Ünal ZAĞLI
Ankara Üniversitesi

Özden PALAOĞLU
Ankara Üniversitesi

Haldun SOYGÜR
Sosyal Sigortalar Kurumu Hastanesi

İ. Hakkı AYHAN
Ankara Üniversitesi

Özet

Bu araştırmanın temel amacı, düşük dozda kronik diazepam (DZ) uygulamasının ve diazepamdan yoksunluğun sıçanların iki yönlü şok kutusundaki kaçınma davranışı üzerindeki etkisini incelemektir. Yirmi dört sıçan seçkisiz olarak üç gruba (1 mg/kg DZ, 2 mg/kg DZ, kontrol grubu) ayrılmış, tüm sıçanlar kutunun zeminindeki ızgaralardan verilen elektrik şokundan (0.8 mA), kutunun içinden bir bölmeden diğerine geçerek kaçınmaları için eğitilmişlerdir. Yedi günlük bir süre içinde verilen 5 oturumluk bir eğitimden sonra, kronik ilaç uygulamasına başlanmıştır. Yirmi sekiz gün boyunca birinci gruba 1 mg/kg DZ (DZ1), ikinci gruba 2 mg/kg DZ (DZ2) ve üçüncü gruba (kontrol grubu – KONT grubu) ise ilacın çözülmediği eriyik verilmiştir. Bütün hayvanlar, kronik ilaç uygulamasının 1., 7., 14., 21. ve 28. günlerinde test edilmişlerdir. Yirmi sekiz günlük ilaç uygulamasından hemen sonra, iki haftalık DZ'den yoksunluk başlatılmıştır ve bütün hayvanlar yoksunluğun 1., 4., 7. ve 14. günlerinde test edilmişlerdir. DZ'nin akut uygulaması kaçınma davranışı üzerinde herhangi bir etki yaratmamıştır. Ancak ilaç uygulamasının ilk gününde tüm gruplar için (KONT, DZ1 ve DZ2 grupları) kaçınma davranışında bir artış gözlenmemiştir. DZ'nin kronik uygulamasının ve DZ'den yoksunluğun da kaçınma davranışını etkilemediği gözlenmiştir. Bu bulgunun, denek sayısının az olması, deney süresince denek kaybının ortaya çıkması, eğitimde tavan etkisi, enjeksiyonun başlamasının ve/veya sona ermesinin yarattığı anksiyöjenik etki gibi karıştırıcı değişkenlere bağlı olabileceği tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Diazepam, kaçınma, tolerans, yoksunluk, iki yönlü şok kutusu

Abstract

The present study was designed to evaluate the effects of chronic diazepam (DZ) treatment with low doses and diazepam withdrawal on the two-way shuttle-box avoidance performance in rats. After 24 rats were randomly assigned into three groups (1 mg/kg DZ, 2 mg/kg DZ and control groups), all animals were trained to avoid from an electrical foot shock (0.8 mA) delivered through the grid floor by crossing to the other compartment of the box. Following the avoidance training, the first group received 1 mg/kg DZ (DZ1), the second group received 2 mg/kg DZ (DZ2), and the control group (CONT group) was given a vehicle chronically for 28 days. All rats were tested on the 1st, 7th, 14th, 21st and 28th days of chronic treatment. Following chronic DZ treatment, two weeks of withdrawal from chronic DZ treatment started and all animals were tested on the 1st, 4th, 7th, and 14th days of withdrawal. Acute administration of DZ did not produce any impairment on avoidance performance. However, all groups showed a significant increment in avoidance performance for the first day of

* Yazışma Adresi: Y. Doç. Dr. Belgin Ayvaşık, ODTÜ, Psikoloji Bölümü, 06531 Ankara. e-posta: abelgin@metu.edu.tr

drug administration. Neither chronic administration of DZ nor withdrawal from it had a significant effect on avoidance performance. These findings were discussed by taking potential confounding variables, such as subject loss throughout the experiment, ceiling effect of training, anxiogenic effect of beginning, and discontinuation of injection, into consideration.

Key Words: *Diazepam, avoidance, tolerance, withdrawal, two-way shuttle-box*

Benzodiazepinler 1960'lerden beri dünyada en sık kullanılan ilaçlardır. Sedatif-hipnotik etkileri nedeniyle, özellikle 1980'lerde kullanım sıklıkları maksimum düzeye ulaşmıştır. Daha sonraları, bu ilaçların klinik etkilerine çok çabuk tolerans geliştiği ve bağımlılık yapma özellikleri nedeni ile yoksunluk sendromlarına neden oldukları için kullanım sıklıklarında düşme gözlenmiştir (Rickels, Schweiser, Case ve Greenblat, 1990; Taylor ve Arlow, 1988). Temel olarak "anksiyolitik" özellikleri nedeniyle kaygı bozukluklarının tedavisinde kullanılırlar. Anksiyolitik etkileri, sinir sisteminde benzodiazepin reseptörlerine bağlanarak, temelde ketleyici (inhibitory) bir nörotransmitter olan gamma-aminobütrik asit (GABA)'nın faaliyetinin artırılmasıyla ortaya çıkar. Anksiyolitik etkilerinin yanı sıra, sedatif-hipnotik, kas gevşetici, bellek kaybı ve epilepsi nöbetlerini azaltıcı ya da önleyici etkileri de vardır. Anksiyolitik etkileri, sedatif etkiye oranla daha düşük dozlarda ortaya çıkmaktadır. Diğer bir deyişle, düşük dozlarda anksiyolitik etki baskın iken, yüksek dozlarda sedatif etkinin artması nedeniyle, anksiyolitik, bellek kaybı gibi diğer davranışsal etkileri sedatif etkiden ayırdetmek güçleşmektedir (Harvey, 1985)

Benzodiazepinlerin ölçülen davranış ya da performans üzerindeki etkilerinin doza bağlı olarak değiştiği deney hayvanları ile yapılan pek çok çalışmada gösterilmiştir (Cook ve Sepinwall, 1975; Griffiths ve Goudie, 1987; Harvey, 1985; Sannerud ve ark., 1993; Wolgin, 1989). Bu çalışmalarda benzodiazepinlerin, düşük dozlarda ölçülen davranışı ya da performansı artırırken, yüksek dozlarda davranış ya da performansı azalttığı gösterilmiştir. Yüksek dozlarda ortaya çıkan performans azaltıcı etki daha çok sedatif etkiye bağlıdır. Doz arttıkça sedasyon arttığı için performansdaki azalmanın sedasyona mı, kaslardaki gevşeme nedeniyle motor davranışlardaki azalmaya mı yoksa ilacın öğrenme ve bellek üzerindeki etkilerine mi ya da anksiyolitik

etkiye mi bağlı olduğunu ayırdetmek zorlaşmaktadır.

1950'lerin sonlarında keşfedilen benzodiazepinler ile ilgili klinik ve deneysel çalışmalar günümüzde de yoğun olarak devam etmektedir. Deney hayvanları üzerinde, benzodiazepinlerin fizyolojik, farmakolojik ve davranışsal etkilerini değerlendirmek için çok çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Günümüzde bu teknikler, yeni keşfedilen benzodiazepin türevi ilaçların ya da benzodiazepinler dışında kalan yeni anksiyolitiklerin (örneğin, buspiron) fizyolojik ya da davranışsal etkilerini değerlendirmek amacıyla da kullanılmaktadır. Ayrıca, benzodiazepinlere tolerans gelişimi ve ilacın kesilmesinden sonra ortaya çıkan yoksunluk sendromlarının fizyolojik ve davranışsal etkileri de çeşitli deneysel teknikler kullanılarak test edilmektedir (File, 1985, 1990; Green ve Hodges, 1991).

Anksiyolitik ilaçların davranışsal etkilerinin deneysel olarak değerlendirilmesinde kullanılan teknikler temel olarak iki grupta toplanmaktadır. Birinci gruptaki teknikler, klasik ve edimsel koşullama teknikleridir (pekiştirme teknikleri, kaçma ve kaçınma teknikleri, çatışma teknikleri gibi). İkinci gruptaki teknikler ise herhangi bir koşullama içermeyen tekniklerdir. Yükseltilmiş artı şeklindeki labirent testi, açık alan testi, sosyal etkileşim testi bu tür testlere örnek olarak verilebilir (Green ve Hodges, 1991).

Benzodiazepinlerin davranışsal etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılan koşullama tekniklerinden birisi olan kaçınma teknikleri pasif ve aktif kaçınma olarak sınıflandırılır. Pasif kaçınma tekniğinde, organizma bir davranışı yaptığı zaman şok ile cezalandırılır. Örneğin, deney kutusu içindeki bir platformdan dışarıyı adım attığı zaman şok uygulanır. Hayvan şoktan kaçınarak bir davranışı yapmamayı öğrenir. Benzodiazepinler, düşük dozlarda pasif kaçınma performansında azalmaya neden olmaktadır. Gray'e (1982) göre, ilaç itici uyarıcının yarattığı ketlenmeyi ortadan

kaldırmakta ve itici uyarıcı tarafından cezalandırılan davranışın sıklığı artmaktadır.

Aktif kaçınma teknikleri ise, iki yönlü ve tek yönlü kaçınma olmak üzere iki gruba ayrılır. Tek yönlü aktif kaçınma tekniğinde genellikle bir başlama bir de hedef kutusu vardır. Hayvan başlama kutusuna bırakılır ve bir süre sonra şok verilir. Hayvan hedef kutusuna ulaştığı zaman şok kesilir. Benzodiazepinlerin tek yönlü aktif kaçınma performansı üzerinde hiç bir etkileri olmadığı gösterilmiştir (Gray, 1982).

İki yönlü kaçınma tekniği ile yapılan çalışmalarda ise daha çok iki yönlü şok kutusu (two-way shuttle box) kullanılır. Şok kutusu, ortasında hayvanın geçebileceği kadar açıklık bulunan bir engel ile ayrılmış iki bölmeden oluşur. Hayvan kutuya bırakılır, ses ya da ışık gibi bir ayırdedici uyarıcıyı takiben şok verilir ve hayvan diğer bölmeye geçtiği zaman şoktan kaçabilir. Belirli bir süre sonra, tekrar ses ya da ışık ve şok sunulur ve hayvan tekrar diğer bölmeye geçerek şoktan kaçabilir. Eğer hayvan ayırdedici uyarıcı verildiği anda diğer bölmeye geçerse, şoktan kaçınmayı öğrenmiş demektir.

İki yönlü kaçınma tekniği kullanılarak yapılan çalışmalar da daha çok kaçınma davranışının kazanılmasında benzodiazepinlerin etkileri üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalarda, hayvana herhangi bir eğitim verilmeksizin, deney kutusuna konulmadan hemen önce ilaç verilmekte ve kaçınma davranışının kazanılmasında ilacın etkisi ölçülmektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, ilacı alan grubun, kaçınma davranışını daha çabuk öğrendiği bulunmuştur. Bir benzodiazepin antagonisti olan Flumazenil'in ise benzodiazepinlerin kaçınma davranışının kazanılmasındaki kolaylaştırıcı etkisini kitlediği gözlenmiştir (Criswell ve Breese, 1993; Escorihuela, Fernandez-Teruel, Zapata, Nunez ve Tobena, 1993; Prunell, Escorihuela, Fernandez-Teruel, Nunez ve Tobena, 1994). Gray (1982), benzodiazepinlerin kaçınma davranışının kazanılmasını kolaylaştırmasını, ikincil itici uyarıcıların (ses ya da ışık gibi ayırdedici uyarıcılar) davranışı bastırma etkisinin benzodiazepinler tarafından ketlenmesi ile açıklamaktadır. Bu teknik, yaygın anksiyete bozukluğu için bir hayvan modeli olarak önerilmektedir.

Benzodiazepinlerin kronik uygulanmasının ve bunu takiben ilacın kesilmesinin neden olduğu yoksunluğun davranışsal etkileri daha çok pekiştirme teknikleri kullanılarak test edilmiştir. Kaçınma tekniği kullanılarak kronik benzodiazepin uygulamasının ve ilahtan yoksunluğun davranışsal etkilerine ilişkin çalışmalara ise literatürde hemen hemen hiç rastlanmamaktadır. Bir çalışmada, bir benzodiazepin türevi olan klordiazepoksid (CDP)'in akut uygulamasının, iki yönlü şok kutusunda kazanılmış kaçınma davranış performansını doza bağlı olarak azalttığı bulunmuştur. Doz arttıkça (15 - 33 mg/kg) CDP'nin kaçınma performansını azaltıcı etkisi artmaktadır. Akut doz cevap eğrisinin belirlenmesinden sonra, 3 hafta süre ile her gün uygulanan 60 mg/kg CDP'nin performansı azaltma etkisine tolerans geliştiği gösterilmiştir (Le, Khanna, Kalant ve Grossi 1986).

Bu çalışmanın amacı ise, bir benzodiazepin türevi olan diazepamın (DZ), düşük dozlarda kronik uygulamasının ve diazepamdan yoksunluğun iki yönlü şok kutusundaki kaçınma davranışına etkisini incelemektir. Deney hayvanları iki yönlü test kutusunda şoktan kaçınmak için eğitildikten sonra, 1 ve 2 mg/kg diazepamın kaçınma davranışı üzerindeki kronik etkileri 28 gün boyunca; ilaç kesildikten sonra, ilaca yoksunluğun etkileri ise 14 gün boyunca test edilmiştir. Doz arttıkça daha başkın olarak ortaya çıkabilecek olan sedatif etkiyi kontrol edebilmek için düşük doz tercih edilmiştir.

Yöntem

Denekler

Denekler, erkek, albino sıçanlardır (n = 24) ve deney başladığında ağırlıkları 180-200 gr. arasında olup yaşları yaklaşık 3 aydır. Deneyin eğitim aşamasında 3 hayvan rahatsızlandığı için araştırmadan çıkartılmış ve analizler eğitim ve kronik uygulama için 21 sıçan üzerinden yapılmıştır. Yoksunluk dönemi içinde de 3 hayvan rahatsızlandığı için analizler 18 denek üzerinden yapılmıştır. Deney süresince üçlü dördü gruplar halinde, su ve yiyeceğin her an var olduğu kafeslerde tutulmuşlardır. Buldukları odanın sıcaklığı $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 'dir ve odanın aydınlanma durumu 12 saat aydınlık (8:00 am - 8:00 pm) ve 12 saat

karanlık (8:00 pm – 8:00 am) olacak şekilde düzenlenmiştir.

Veri Toplama Aracı

Kaçınma davranışı iki yönlü şok kutusu (Columbus Instruments International Corporation, ABD) kullanılarak ölçülmüştür. Kutunun boyutları 60 x 29 x 26 cm'dir. Kutu tam ortasından, bir kontrplak aracılığı ile ikiye bölünmüştür ve kontrplağın tam ortasında hayvanın bir bölmeden diğerine geçmesini sağlayacak bir açıklık (8 x 4.5 cm) vardır. Kutu bir PC bilgisayara bağlıdır ve hayvanın kaçma ve kaçınma davranışlarını kayıt etmek için ise "V8/16 Reflex" programı kullanılmıştır.

İlaç

Diazepam (Hoffman La Roche), pH düzeyi 0.1 N NaOH ile 7.4'e ayarlanarak 0.1 N HCL içinde çözülmüştür. Daha sonra, 100 ml için 100 µl Tween 80 eklenerek, diazepam eriyiği elde edilmiştir.

İşlem

DeneySEL işlemler başlamadan önce hayvanlar seçkisiz olarak kontrol grubu, diazepam 1 mg/kg ve 2 mg/kg alacak iki deney grubu olmak üzere 3 gruba ayrılmışlardır. Bütün hayvanlar ilk önce, şok kutusunun tabanındaki ızgaralardan verilen şoktan (0.8 mA), kutunun bir bölmesinden diğerine geçerek kaçınmaları için eğitilmişlerdir. Her denemede 10 sn'lik ses uyarıcısını (60dB) 10sn şok izlemiştir. Ses ya da şok, hayvan bir bölmeden diğerine geçtiği an sona ermiştir. Ses verildiği anda hayvan bir bölmeden diğerine geçerse ses sona ermiş ve onu takiben şok verilmemiştir (kaçınma davranışı). Eğer hayvan şok verildiğinde bir bölmeden diğerine geçerse, şok sona ermektedir (kaçma davranışı). Ses ya da şok sona erdikten sonra, denemeler arasındaki süre 30 sn olup her oturum 30 denemeden oluşmuştur. Hayvanlar eğitimin 1., 2., 3., 4. ve 7. günlerinde test edilmişlerdir. Yedi günlük bir eğitim süresi sonucunda, tüm hayvanların denemelerin yaklaşık % 90'ında başarı ile kaçınma davranışına ulaştıkları görülmüştür.

Eğitim tamamlandıktan sonra kronik ilaç uygulamasına başlanmıştır. Birinci grup 28 gün

boyunca 1 mg/kg DZ (DZ1 grubu) (n = 6) alırken, ikinci grup 2 mg/kg DZ (DZ2 grubu) (n = 7) almıştır. Kontrol grubuna (n = 8) ise ilacın içinde çözüldüğü eriyik (vehicle) verilmiştir (KONT grubu). DZ ya da eriyik her gün, deney başlamadan 30 dak. önce hayvanların karın boşluğuna (intraperitoneally) iğne ile uygulanmıştır. Tüm hayvanlar, kronik ilaç uygulamasının 1., 7., 14., 21. ve 28. günlerinde test edilmişlerdir. Kronik DZ uygulamasını takiben, iki haftalık ilaçtan yoksunluk uygulamasına başlanmıştır. İki hafta süre ile hayvanlara ilaç ya da eriyik uygulanmamıştır. Yoksunluk süresince, 1., 4., 7. ve 14. günlerinde tüm hayvanlar test edilmiştir. Tüm deneysel işlemler gündüz 9:00 – 14:00 saatleri arasında gerçekleştirilmiştir.

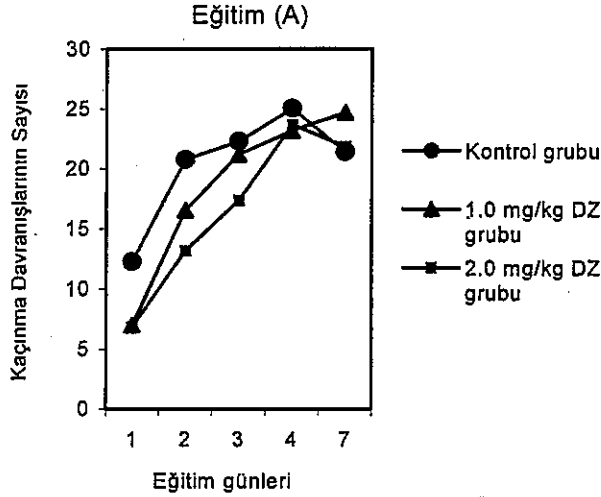
Bulgular

Kaçınma davranışının kazanılması için uygulanan eğitim, kronik DZ uygulaması ve DZ'den yoksunluk günlerinde ölçülen toplam kaçınma davranışları için doz-cevap eğrisi Şekil 1, 2 ve 3'de sunulmuştur. Şekil 1'de de görüldüğü gibi, kaçınma davranışları dördüncü günün sonunda % 90'a ulaşmış ve eğitimin son oturumunda (7. günde) davranışlarda sabitlik gözlenmiştir. Eğitim süresince doz grupları arasında fark olup olmadığını test etmek için 3 (grup: KONT, DZ1 ve DZ2 grubu) x 5 (eğitim günleri), son faktörde tekrar ölçümlü varyans analizi uygulanmıştır. ANOVA sonucunda, sadece gün temel etkisi anlamlı bulunmuştur ($F(4, 68) = 19.76, p < .001$); ne grup temel etkisi ne de grup x gün ortak etkisi anlamlıdır.

Eğitim süresince gruplar arasında aldıkları şok sayısı açısından fark olup olmadığını test etmek için toplam kaçma davranışı değişkenine 3 (grup: KONT, DZ1 ve DZ2 grubu) x 3 (eğitimin 1., 2. ve 3. günleri) son faktörde tekrar ölçümlü varyans analizi uygulanmış ve sonuçta sadece gün temel etkisi anlamlı bulunmuştur, $F(2, 34) = 20.99, p < .001$.

DZ'nin akut etkisini test etmek için, her üç grupta, eğitimin sonuncu günü ve ilaç uygulamasının ilk günü için veriler 3 (grup: KONT, DZ1 ve DZ2 grubu) x 2 (gün: eğitimin son günü ve kronik uygulamanın ilk günü), son faktörde tekrar ölçümlü varyans analizi ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak sadece gün temel etkisi anlamlı bulunmuştur,

$F(1, 18) = 4.47, p < .05$. Kronik ilaç uygulamasının ilk günündeki ortalama kaçınma davranışı sayısı ($\bar{X} = 25.33, SS = 3.41$), eğitimin son gününde gözlenen değerden ($\bar{X} = 22.62, SS = 5.39$) anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur. Grup temel etkisi ve grup x gün ortak etkisi anlamlı değildir.



Şekil 1. İki yönlü şok kutusunda eğitim sırasında gözlenen ortalama kaçınma davranışı sayısı.

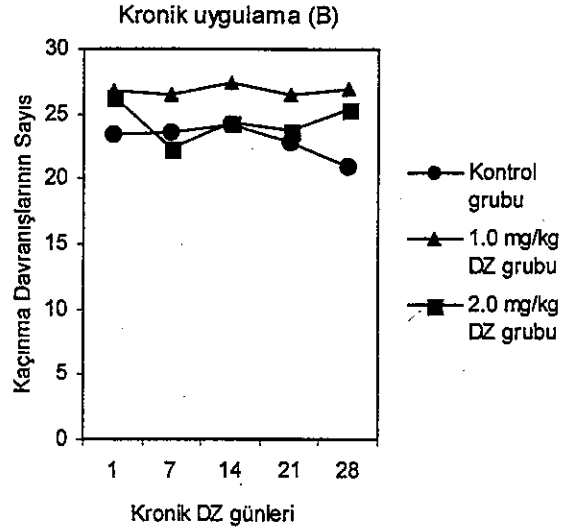
Not: Beşinci eğitim oturumu 7. günde verilmiştir.

Kronik DZ uygulamasının etkisini değerlendirmek için, kronik uygulama sırasında elde edilen toplam kaçınma davranışı açısından DZ alan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, 3 (grup: KONT, DZ1 ve DZ2 grubu) x 5 (kronik uygulama günleri), son faktörde tekrar ölçümlü varyans analizi uygulanmıştır. Grup ve gün temel etkisi ve grup x gün ortak etkisi anlamlı değildir (Bkz. Şekil 2).

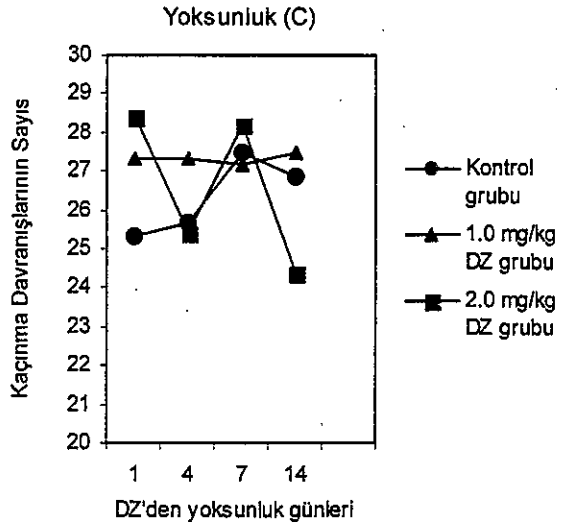
Kronik ilaç uygulamasının etkisini değerlendirmek için ayrıca, eğitimin son günü gözlenen kaçınma performansı, kronik uygulamanın 28. günü elde edilen performans ile 3 (grup: KONT, DZ1 ve DZ2 grubu) x 2 (gün: eğitimin son günü ve kronik uygulamanın son günü), son faktörde tekrar ölçümlü varyans analizi ile karşılaştırılmıştır. Temel ve ortak etkiler anlamsız bulunmuştur.

Toplam kaçınma davranışları için ilaçtan yoksunluğun etkisini test etmek için de 3 (grup:

KONT, DZ1 ve DZ2 grubu) x 4 (yoksunluk günleri) son faktörde tekrar ölçümlü varyans analizi uygulanmıştır. ANOVA sonucunda hem grup ve gün temel etkisi hem de grup x gün ortak etkisi anlamlı bulunmamıştır (Bkz. Şekil 3)



Şekil 2. Kronik DZ uygulaması sırasında gözlenen ortalama kaçınma davranışı sayısı.



Şekil 3. DZ'den yoksunluk sırasında gözlenen ortalama kaçınma davranışı sayısı.

Tartışma

Benzodiazepinlerin düşük dozda belirli bir pekiştirme tarifesine göre eğitilmiş deney hayvanlarında pekiştirilen davranış oranını arttırırken, yüksek dozda sedatif etkilerinden dolayı ilgili davranışı azalttıkları pek çok çalışmada rapor edilmiştir (Cook ve Sepinwall, 1975; Griffiths ve Goudie, 1987; Sannerud ve ark.; Wolgin, 1989). Bu araştırmada ise düşük dozdaki akut benzodiazepin uygulamasının kaçınma davranışı üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Düşük dozda benzodiazepinlerin davranış oranını arttırdığı gözlenen çalışmalarda daha çok organizma bir davranışından dolayı pozitif bir uyarıcı ile (su, yiyecek gibi) ödüllendirilmektedir. Bu araştırmada ise sıçanlar bir davranış yaparak negatif bir uyarıcıdan (şok) kurtularak ödüllendirilmişlerdir. Literatürün tersine, bu araştırmada düşük dozda benzodiazepinlerin kaçınma performansını etkilememiş olmasını, ölçülen davranışların doğasına atfetmeden önce dikkate alınması gereken birkaç nokta vardır. Örneğin, eğitim süresince sıçanların yaklaşık % 90 düzeyinde performans göstermeleri sağlanmıştır ve kaçınma performansında ilaca bağlı bir değişiklik gözlenmemesi bu "tavan" etkisine bağlı olabilir.

Eğitimin son günü ve kronik uygulamanın ilk günü (akut uygulama) elde edilen veriler karşılaştırıldığında, dozdan bağımsız olarak tüm gruplarda ortalama kaçınma davranışında bir artış gözlenmiştir (eğitimin son günü tüm gruplar için $\bar{X} = 22.62$ iken kronik uygulamanın ilk günü için $\bar{X} = 25.33$ dür). ANOVA sonucunda grup temel etkisi ya da grup x gün ortak etkisi anlamlı olmadığı için bu artışı, DZ uygulamasına atfetmek yanlış olacaktır. Kaçınma davranışındaki bu anlamlı artış, eğitimin hemen sonunda ilaç ya da kontrol grubuna eriyik vermek için enjeksiyona başlamanın yarattığı "anksiyojenik" etkiye bağlı olabilir. İlaç uygulamasına başlamadan önce hayvanlara dokunulmasına (handling) bağlı olarak benzodiazepinlerin davranışsal etkilerinin farklılaşmasına dair araştırma bulguları vardır (File, Andrews, Wu, Zharkovsky ve Zangrossi, 1992; Gray, 1982). Bu nedenle, gelecek çalışmalarda, enjeksiyonun karıştırıcı etkisini ortadan kaldırmak için deneye alınan hayvanların tümüne, eğitim sırasında enjeksiyona başlamak, ilacın akut etkisini

görmek açısından daha sağlıklı sonuçlar verecektir. Nitekim, eğitimin son günü ile kronik uygulamanın son günü için kaçınma performansı karşılaştırıldığında, ne grup ve gün temel etkisi ne de ortak etki anlamlıdır. Bu da hayvanların enjeksiyona alışmış olmaları olarak değerlendirilebilir.

Kronik ilaç uygulaması boyunca da hem kontrol hem de diazepam gruplarının kaçınma performanslarında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. İlacın akut etkisi kaçınma davranışında bir değişiklik yaratmadığı ve 28 günlük kronik ilaç uygulaması sırasında da davranışsal değişiklik gözlenmediği için kazanılmış aktif kaçınma davranışının diazepam tolerans gelişimini ya da diazepamın bellek üzerindeki etkilerini değerlendirmek için kullanılabilir. Ancak, bu tür bir yorum yapmadan önce deneysel kısıtlılıklardan kaynaklanan bir kaç noktayı dikkate almak gerekmektedir. Birinci olarak, daha önce de belirtildiği gibi, eğitim süresince sıçanların %90 performans düzeyine ulaşmalarının neden olduğu tavan etkisi gözönüne alınmalıdır. Nitekim, hayvanlar % 50 düzeyinde kaçınma davranışı için eğitildikten sonra düşük dozlarda (0.5, 1 ve 2 mg/kg) diazepam uygulanmasının kazanılan kaçınma davranışında anlamlı olarak azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (Çelik, Deniz, Özbay, Palaoğlu ve Ayhan, 1999).

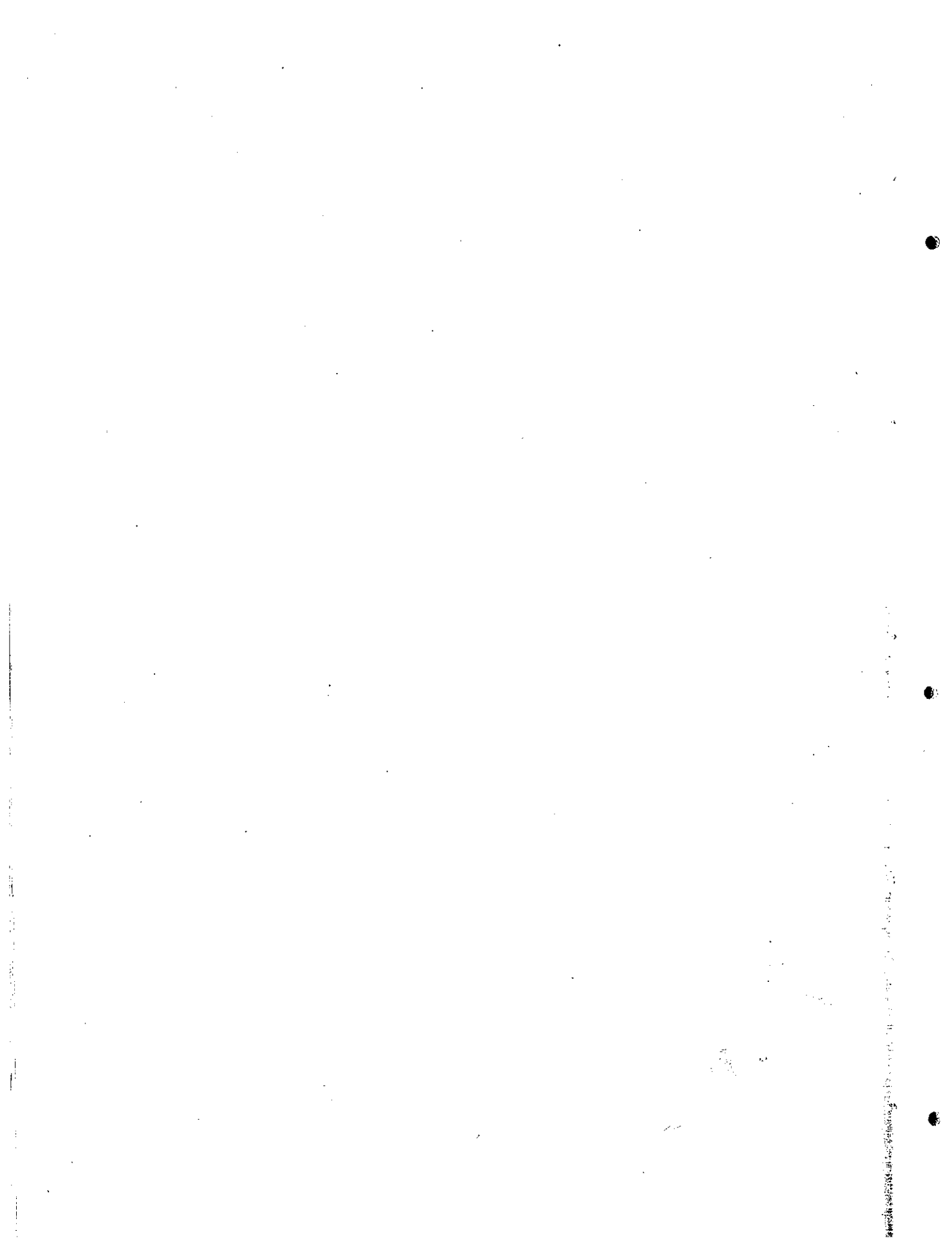
İkinci olarak ise kronik uygulama boyunca her gün ilaç ya da kontrol grubuna eriyik enjekte edilmesine rağmen sadece 1., 7., 14., 21. ve 28. günlerde hayvanlardan ölçüm alınmıştır. Bir hafta ara ile ölçüm alınmasının neden olduğu bir karıştırıcı etki de performansta hiç bir değişiklik gözlenmemesine neden olmuş olabilir. Bu nedenle gelecek çalışmalarda hem tavan etkisi hem de aralıklı ölçümün etkisi kontrol edilmelidir.

Benzodiazepinlerin ani olarak kesilmesinin yoksunluk belirtilerine neden olduğu hem insanlarla yapılan çalışmalarda (Rickels ve ark., 1990) hem de deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda (File, 1990) gösterilmiştir. Ancak bu çalışmada, DZ'den yoksunluğun kaçınma performansı üzerinde anlamlı bir etki yaratmadığı gözlenmiştir. Yine bu bulgu tavan etkisine ya da aralıklı performans ölçümüne bağlı olabilir.

Sunulan araştırmanın bir başka kısıtlılığı ise denek sayısının az olması ve araştırma süresince denek kaybının ortaya çıkmasıdır. Bu nedenle araştırma yukarıda belirtilen kısıtlılıklar kontrol edilerek daha fazla sayıda denek üzerinde tekrar edilmelidir. Böylece, kazanılmış kaçınma davranışı üzerinde benzodiazepinlerin kronik etkileri ve ilacın kesilmesinden sonra ortaya çıkan yoksunluk etkileri ya da benzodiazepinlerin öğrenme ve bellek üzerindeki etkileri daha sağlıklı bir şekilde ölçülebilir.

Kaynaklar

- Çelik, T., Deniz, G., Uzbay, İ. T., Palaoğlu, Ö., & Ayhan, I. H. (1999). The effects of flumazenil on two way active avoidance and locomotor activity in diazepam-treated rats. *European Neuropsychopharmacology*, 9(1-2), 45-50.
- Cook, L., & Sepinwall, J. (1975). Psychopharmacological parameters of emotion. In L. Levi (Ed.), *Emotions - their parameters and measurement* (pp. 379-404). New York: Raven Press.
- Criswell, H. E., & Breese, G. R. (1993). Similar effects of ethanol and flumazenil on acquisition of a shuttle-box avoidance response during withdrawal from chronic ethanol treatment. *British Journal of Pharmacology*, 119, 753-760.
- Escorihuela, R. M., Fernandez-Teruel, A., Zapata, A., Nunez, J. F., & Tobena, A. (1993). Flumazenil prevents the anxiolytic effects of diazepam, alprazolam and adinazolam on the early acquisition of two-way active avoidance. *Pharmacological Research*, 28(1), 53-58.
- File, S. E. (1985). Tolerance to the behavioral actions of benzodiazepines. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 9, 113-121.
- File, S. E. (1990). The history of benzodiazepine dependence: A review of animal studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 14, 135-146.
- File, S. E., Andrews, N., Wu, P. Y., Zharkovsky, A., & Zangrossi, Jr., H. (1992). Modification of chlordiazepoxide's behavioural and neurochemical effects by handling and plus maze experience. *European Journal of Pharmacology*, 218, 9-14.
- Gray, J. A. (1982). *The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system*. Oxford: Oxford University Press.
- Green S., & Hodges, H. (1991). Animal models of anxiety. In P. Willner (Ed.), *Behavioural models in psychopharmacology: Theoretical, industrial and clinical perspectives* (pp. 21-49). Cambridge: Cambridge University Press.
- Griffiths, J. W., & Goudie, A. J. (1987). Analysis of the role of behavioral factors in the development of tolerance to the benzodiazepine midazolam. *Neuropharmacology*, 26(2-3), 210-209.
- Harvey, S. C. (1985). Hypnotics and sedatives. In A. G. Gilman, L. S. Goodman, T. W. Rall & F. Murad (Eds.), *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* (7th ed.) (pp. 339-371). New York: MacMillan Publishing Company.
- Le, A. D., Khanna, J. M., Kalant, H., & Grossi, F. (1986). Tolerance to and cross-tolerance among ethanol, pentobarbital and chlordiazepoxide. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24, 93-98.
- Prunell, M., Escorihuela, R. M., Fernandez-Teruel, A., Nunez, J. F., & Tobena, A. (1994). Anxiolytic profiles of alprazolam and ethanol in the elevated plus-maze test and the early acquisition of shuttlebox avoidance. *Pharmacological Research*, 29(1), 37-46.
- Rickels, K., Schweiser, E., Case, G., & Greenblat, D. (1990). Long term therapeutic use of benzodiazepines I: Effects of abrupt discontinuation. *Archives of General Psychiatry*, 47, 899-907.
- Sannerud, C. A., Marley, J. M., Serdikoff, S. L., Alastra, A. J. G., Cohen, C., & Goldberg, S. R. (1993). Tolerance to the behavioral effects of chlordiazepoxide: Pharmacological and biochemical selectivity. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 267(3), 1311-1320.
- Taylor, C. B., & Arlow, B. (1988). *The nature and treatment of anxiety disorders*. New York: The Free Press.
- Wolgin, D. L. (1989). The role of instrumental learning in behavioral tolerance to drugs. In A. J. Goudie & M. W. Emmett-Oglesby (Eds.), *Psychoactive drugs: Tolerance and sensitization* (pp. 17-114). New Jersey: Humana Press.



Summary

Effects of Chronic Diazepam Treatment and Withdrawal on Avoidance Behavior

Belgin AYVAŞIK*
Middle East Technical University

Ünal ZAĞLI
Ankara University

Özden PALAOĞLU
Ankara University

Haldun SOYGÜR
Social Security Institution Hospital

İ. Hakkı AYHAN
Ankara University

Benzodiazepines (BDZs) have been among the most widely used drugs in the world since 1960s. Besides their anxiolytic effects, they have been shown to have sedative-hypnotic, muscle relaxant, amnesic, and anticonvulsant effects (Harvey, 1985). To evaluate physiological, pharmacological, and behavioral effects of BDZs, a wide variety of experimental techniques have been developed. These techniques are based on either conditioned responses (e.g., conflict tests, reinforcement schedules in operant conditioning) or unconditioned responses (e.g., elevated plus-maze, open field-test, social interaction test) (File, 1985, 1990; Green and Hodges, 1991).

One of the conditioned behavioral techniques is two-way shuttle-box avoidance (active avoidance). It has been shown that BDZs facilitate shuttle-box avoidance acquisition, and that the early acquisition of two-way shuttle-box avoidance is a valid animal model of anxiety (Criswell and Breese, 1993; Escorihuela, Fernandez-Teruel, Zapata, Nunez and Tobena, 1993; Prunell, Escorihuela, Fernandez-Teruel, Nunez and Tobena, 1994). However, development of tolerance to and withdrawal from chronic BDZ treatment have been rarely reported in active avoidance animal model of anxiety. The present study was undertaken to examine whether or not two-way shuttle-box avoidance performance is modified in rats during chronic treatment with and withdrawal from low doses of diazepam treatment.

Method

Subjects

The subjects were 24 male rats with the mean body weight of 180-200 gr. when training started. They were housed in groups of 3-4 per cage, with food and water available ad lib, in a temperature regulated room ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) with a 12 h. light-dark cycle (8:00 am on).

Apparatus

In this study, the avoidance performance was tested in a two-way shuttle-box (60 x 29 x 26 cm) (Columbus Instruments International Corporation). The apparatus was divided into two equal compartments by a door with a single opening (8 x 4.5 cm). The shuttle-box was connected to a PC computer equipped with an interface. The reflex V8/16 software was used to control events and record the avoidance-escape performances of rats in the shuttle-box.

Drug

Diazepam (Hoffman La Roche) was dissolved in 0.1 N HCL, and pH was adjusted to 7.4 with 0.1 N NaOH. By adding 100 μl of Tween 80 for 100ml, the suspension of diazepam was achieved.

* Address for correspondence: Dr. Belgin Ayvaşık, ODTÜ, Psikoloji Bölümü, 06531 Ankara, Turkey. e-mail: abelgin@metu.edu.tr

Procedure

Originally 24 animals were randomly assigned to three groups (control, 1 mg/kg DZ and 2 mg/kg DZ groups) before training. All animals were first trained to avoid from an electrical foot shock (0.8 mA) delivered through the grid floor by crossing to the other compartment in the shuttle-box. Each trial consisted of 10sec. of sound stimulus followed by 10sec. of electric shock. Sound or shock was finished when the animal crossed to the other side. Then, a 30sec. intertrial interval was presented and each session included 30 trials. A 90% avoidance performance was obtained after five training sessions over a seven-day training period. During training, three rats became sick of unknown reasons and were excluded from the experiment.

After the training was completed, chronic drug administration days were started. One group received 1 mg/kg DZ (DZ1) ($n=6$), the second group received 2 mg/kg DZ (DZ2) ($n=7$) and the control group ($n=8$) was given vehicle chronically for 28 days. All rats were tested on the 1st, 7th, 14th, 21st and 28th days of chronic treatment where DZ were administered 30 min. before the experimental sessions. Following chronic DZ treatment, two weeks of an observational period for withdrawal from chronic DZ treatment started and all animals were tested on the 1st, 4th, 7th and 14th days of withdrawal. DZ and vehicle were quitted during withdrawal days. Three more animals were sacrificed in the withdrawal sessions because of unknown sickness.

Results

Diazepam dose-effect data for the number of avoidance responses during the training, chronic DZ treatment and withdrawal from DZ treatment are shown in Figure 1, 2, and 3.

To assess the effects of acute administration of DZ, the data for the last day of training were compared to the first day of chronic treatment in all three different dose groups with a two-way analysis of variance. ANOVA did show a significant day main effect ($F(1,18) = 4.47, p < .05$). The average avoidance responses in the last day of chronic training ($\bar{X}=22.62, SD = 3.41$) was significantly less than those in the first day of chronic training ($\bar{X}=25.33, SD = 5.39$).

A two-way analysis of variance (ANOVA) was applied to total number of avoidance responses.

Chronic DZ treatment or withdrawal days served as within-subjects repeated measures factor (5 days for chronic treatment: 1st, 7th, 14th, 21st and 28th days; 4 days for withdrawal: 1st, 4th, 7th and 14th days) and the chronic treatment groups (3 groups: 1.0 and 2.0 mg/kg DZ and control groups) as the between-subjects factor.

ANOVA did not yield any dose and day main effects and interaction effects for both chronic DZ treatment and withdrawal days.

Discussion

Response increment effects of lower doses and response suppression effects of the higher doses of BDZs have been reported in the reinforcement schedules of operant conditioning (Cook ve Sepinwall, 1975; Griffiths and Goudie, 1987; Sannerud ve ark.; Wolgin, 1989). In the present study, neither 1.0 mg/kg nor 2.0 mg/kg DZ produced a dose-related increment or suppression of responding in the shuttle-box avoidance performance in rats. However, it has been showed that acute administration of the low doses of BDZ and vehicle increased the number of avoidance in all groups. This effect might be due to "anxiogenic" effect of injection that had been started at the first day of drug administration. Acquired avoidance performance was not changed throughout chronic treatment and withdrawal days. These findings can be considered as "ceiling" effect of training since all animals were acquired 90% performance during training. Furthermore, during chronic treatment and withdrawal, all animals were only tested once a week. This intermittent testing might be another confounding variable in measuring avoidance performance. Since six animals were lost throughout different phases of the experiment, this study should be repeated with a larger sample of animals by controlling potential confounding variables such as ceiling effect of training, anxiogenic effect of beginning, or discontinuation of injection.