

MECHANIZMY ÚČINKU ANXIOLYTIK

MUDr. Martin Votava, Ph.D., Mgr. Viktoria Agová, prof. MUDr. Miloslav Kršiak, DrSc.

3. LF UK, Ústav farmakologie, Praha

Nemoci spojené s patologickou úzkostí jsou jednou z nejčastějších poruch chování. Látky, které se používají k jejímu léčení, především ovlivňují GABAergní (benzodiazepiny) a serotonergní (antidepresiva) systém. Tato práce podává přehled o hlavních mechanismech působení stávajících anxiolytik a dále o dalších možnostech jejího ovlivnění. Současná terapie působí do značné míry nespecificky, a proto se výzkum soustředí na ovlivnění dalších receptorových systémů. Mezi nejdůležitější patří noradrenergický systém, ovlivnění receptorů pro kortikotropin-releasing faktor, neurokininových, cholecystokininových či glutamátových NMDA receptorů.

Klíčová slova: úzkost, anxiolytika, benzodiazepiny, SSRI.

ANXIOLYTICS AND THEIR MECHANISM OF ACTION

Anxiety diseases are one of the most frequent psychic disorders. Drugs, which are currently used, act mainly on GABAergic (benzodiazepines) or serotonergic (antidepressants) systems. This review summarizes the main mechanisms of action of anxiolytics and shows other possible options of anxiety treatment. The current therapy of anxiety is non-specific and thus researchers are still finding other neuromediator systems to influence. The most promising systems in the development of new anxiolytics are noradrenergic system, corticotropin-releasing factor receptors, neurokinin, cholecystokinin or glutamatergic NMDA receptors.

Key words: anxiety, anxiolytics, benzodiazepines, SSRI.

Úvod

Nemoci spojené s patologickou úzkostí (diagnóza F 40 – F 43 dle MKN-10) jsou jednou z nejčastějších poruch chování. Patologická úzkost se vyskytuje při depresivních stavech a jiných psychických chorobách nebo je součástí samostatných nosologických jednotek (tabulka 1). Dále se úzkost může vyskytnout v závislosti na jiném somatickém onemocnění (např. spojená s bolestí, viz. infarkt myokardu, dušnost při astmatickém záchvatu či při neurologických onemocněních), po požití určitých léků (např. psychostimulancia, anticholinergika, sympatomimetika či dopaminergní látky) a po vysazení nejčastěji tlumivých látek (benzodiazepiny, barbituráty, etanol apod.).

Anxiolytika (dříve nazývaná též „malé trankvilizéry“) především pozitivně ovlivňují afektivitu. Odstraňují psychické napětí, strach, úzkost, zlepšují náladu, současně však způsobují útlum (hypnosedativní působení). Mnoho farmak této skupiny je blízké příbuzných s hypnotiky a liší se jen v poměru anxiolytického a hypnosedativního působení. Látky této skupiny mají také často myorelaxační a antikonvulzivní účinky.

Jako „anxiolytika“ byla či je používána rovněž celá řada látek, které však mají v různé mí-

ře vyjádřen především sedativní či hypnotický účinek. Tak může být popisováno anxiolytické působení etanolu, hypnotik, H1-antihistaminik, sedativních neuroleptik či antikonvulziv (působících především na GABA systém).

Jedním z nejstarších anxiolytik je etanol, po jehož požití jsou popisovány euforické, stimulační i anxiolytické účinky (po nižších dávkách). Vyšší dávky etanolu jsou spojeny s účinky sedativními a hypnotickými. V devatenáctém století a první polovině 20. století pak byly používány další látky, především bromidy, barbituráty (barbital 1903, fenobarbital 1912, secobarbital 1930), karbamáty (meprobamat 1955) a piperidindiony (glutetimid). Všechny tyto látky buď zesilují účinky kyseliny γ -aminomáselné (GABA) na GABA-A receptorovém komplexu či přímo tento chloridový kanál otevírají. Dále mají celou řadu nežádoucích účinků včetně vzniku závislosti, vysoké toxicity a závažných lékových interakcí.

Při studiu neurobiologie úzkosti a při klinické empirické terapii byly postupně identifikovány tři hlavní neuromediatorové systémy, které se na jejím vzniku a šíření zejména podílejí. Jedná se o GABAergní systém především v limbic-

kém systému, mozkové kůře a hippocampu, noradrenergický systém vycházející z locus coeruleus a serotonergní (5-HT) systém především v nucleus raphé. S těmito systémy je úzce spjat systém stresových hormonů, a to celá kaskáda od corticotropin-releasing faktoru (CRF), přes adrenokortikotropní hormon (ACTH) až po vlastní hormony kůry nadledvin (kortizol).

Gabaergní systém

Gabaergní systém, zejména GABA-A receptor, je jedním z nejčastěji zastoupených receptorů v CNS a hraje i důležitou roli v regulaci úzkosti. Jak již bylo zmiňováno v úvodu, mnoho látek používaných k jejímu ovlivnění v minulosti působilo právě na tento systém. V druhé polovině minulého století byly objeveny benzodiazepiny, rychle se staly léčbou volby a nahradily do té doby používané barbituráty a ostatní látky. Během několika let se však přišlo na to, že i léčba benzodiazepiny, jakkoliv je lepší než léčba barbituráty, má svá omezení. Rovněž na ni vzniká závislost a tolerance a je účinná především při generalizované úzkostné poruše či při akutních stavech panické poruchy. Většinou selhává v léčbě

Tabulka 1. Úzkostné poruchy

- generalizovaná úzkostná porucha
- panická porucha
- fobické úzkostné poruchy
- smíšená úzkostně-depresivní porucha
- sociální úzkostná porucha
- obsedantně-kompulzivní porucha
- posttraumatická stresová porucha

Tabulka 2. Hlavní skupiny anxiolytik

- Antidepresiva SSRI – v současnosti léky první volby pro většinu úzkostných poruch
- Benzodiazepiny – byly nejdůležitější a nejvíce klinicky používanou skupinou anxiolytik, stále důležité při akutní terapii
- Parciální agonisté 5HT_{1A} receptorů – poměrně nová skupina léčiv, dosahují účinnosti SSRI bez nežádoucích sedativních účinků, vykazují však pozdější nástup anxiolytického účinku.
- Tricyklická antidepresiva – vhodná pro určité pacienty nereagující na SSRI, doplňková terapie
- Beta-adrenergické blokátory – možno použít na snížení somatických a vegetativních příznaků (tremor, palpitace), neovlivňují afektivní složku úzkosti
- Alfa2-adrenergické agonisté – zatím používány k sedaci, tlumí však účinně i úzkost

ostatních úzkostných poruch (sociální fobie, posttraumatická stresová porucha, obsedantně-kompulzivní porucha).

Benzodiazepiny se s vysokou afinitou vážou na část receptorového proteinu pro GABA a způsobují jeho alosterickou modulaci. GABA zvyšuje transmembránový vstup chloridových iontů chloridovým iontovým kanálem receptorového proteinu do buňky a tím zvyšuje membránový potenciál příslušné buňky (hyperpolarizace). Zvýšený vstup chloridových iontů je způsoben zvýšenou pravděpodobností otevření chloridového kanálu, tedy častějším otevíráním. GABA-A receptor se skládá z pěti podjednotek, přičemž nejčastěji jsou u obratlovců zastoupeny podjednotky α (typ 1–6), β (typ 1–3) a γ (typ 1–3). Dále se u savců vyskytují podjednotky δ , ρ , ϵ , π a θ . Vazebné místo pro benzodiazepiny je mezi podjednotkami α a γ a zejména typ podjednotky α je rozhodující pro určení výsledného efektu stimulace tohoto receptorového komplexu. Benzodiazepiny se vážou na receptory, které obsahují podjednotky $\alpha_{1,2,3,5}$. Zatímco podjednotka α_1 je spojována především se sedativními a hypnotickými účinky (např. zolpidem či zopiklon se selektivně vážou na tento typ receptorů, tzv. ω_1 receptor), pro anxiolytické působení jsou nejdůležitější podjednotky α_2 a do určité míry i α_3 (10). Tyto podjednotky se nacházejí především v limbickém systému a mozkové kůře, zatímco výskyt podjednotky α_1 není takto specificky lokalizován. Typ α_5 se nachází v hipocampu a uplatňuje se především v kognitivní funkci a paměti (8). Za anxiolytický účinek benzodiazepinů je zodpovědné především ovlivnění retikulární formace, limbického systému a kůry mozkové, tedy systémů, které jsou spjaty s emocemi a celkovou aktivací mozkové kůry. Jejich inhibicí se snižuje vliv zevních i vnitřních stimulů na vyšší psychická „centra“ i zpracování těchto stimulů. Současně je ztlíženo i přepojení psychické alterace na vegetativní nervový systém („psycho-vegetativní rozpojení“). Dále bylo zjištěno, že deficit GABA-A systému je predispozicí vzniku úzkostného onemocnění u lidí (12). S tím jsou v souladu i naše výsledky, kdy jsme u plachých myší zjistili výrazně nižší obsah GABA v kůře mozku než u sociabilních jedinců (19).

Látky, které by selektivně ovlivňovaly GABA-A receptor obsahující α_2 a α_3 podjednotky, se v současnosti intenzivně vyvíjejí. Mezi takové zástupce patří např. experimentální substance SL651498, L-838417 a NGD 91-3. Z klinického hlediska jsou zajímavá chinolono-va antibiotika. Fluorchinolony zvyšují účinek GABA přes komplex GABA-A receptoru a dokonce působí selektivně přes α_2 -podjednotku. U pacientů užívajících tato chemoterapeutika byl pozorován anxiolytický a antikonvulzivní účinek, nezpůsobují sedaci a mohly tak před-

stavovat novou skupinu léčiv v terapii úzkosti (7).

Další směr ovlivnění úzkosti je pomocí parciálních agonistů benzodiazepinového vazebného místa na GABA-A receptoru, např. abecarnil, bretazenil, pagoclon či imidazenil. Avšak tyto látky zatím nenašly v klinické praxi velké uplatnění. Další možnost ovlivnění úzkosti přes GABA-A receptor je např. pomocí neurosteroidů, látek, které mají na tomto receptoru rovněž své vazebné místo (např. progesteron, allopregnanolon). Tyto látky však ovlivňují i další receptory, např. NMDA, AMPA či nikotinové. Neurosteroidy jsou intenzivně studovány zejména z důvodu jejich endogenní anxiolytické aktivity (2). Mnoho úsilí bylo také věnováno ovlivnění GABA-B receptoru, ale zdá se, že tento receptor nebude pro ovlivnění úzkosti rozhodující (5). Dalšími látkami, které ovlivňují GABAergní systém, jsou některá antikonvulziva. Antikonvulziva mohou zvyšovat GABA neurotransmisi inhibicí zpětného příjmu GABA (tiagabin), inhibicí GABA transaminázy (vigabatrin), zvyšováním syntézy GABA a způsobovat zvýšené uvolňování GABA prostřednictvím inhibice napěťově řízených iontových kanálů. Rovněž jejich uplatnění v klinické léčbě úzkosti je zatím ve fázi preklinických či klinických studií.

Serotonergní systém

Vzhledem k tomu, že nasazení benzodiazepinů do léčby úzkosti v 60. letech minulého století nesplnilo očekávání především při chronické léčbě či při léčbě jiných poruch než generalizované úzkostné poruchy, soustředil se výzkum na vyvinutí jiných anxiolytik, která by byla účinná i u dalších typů úzkosti a měla lepší bezpečnostní profil. Od konce 60. let se do klinické praxe léčby úzkosti zařadila tricyklická antidepressiva a inhibitory monoaminoxidázy. Tato jsou účinná především v léčbě panické poruchy, sociální fobie a generalizované úzkostné poruchy. Zhruba od poloviny 80. let se začaly v léčbě úzkostných poruch používat inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI), které při chronickém podávání ovlivňují většinu typů úzkosti (4).

Serotonergní systém je vzhledem k mnoha druhům jeho receptorů zatím nejméně jasně definován v neurobiologii úzkosti a jeho úloha při úzkostných poruchách nebyla doposud dořešena. Zjednodušená představa je, že úzkostné stavy jsou „syndrom nadbytku serotoninu“ v protikladu k depresi, která je „syndrom nedostatku serotoninu“. Látky typu parciálních agonistů serotoninových receptorů jsou proto účinné při obou těchto stavech. Funkce serotonergního systému je dále komplikovanější vzhledem k přítomnosti více podtypů serotoninových receptorů, jejich presynaptické i postsynaptické lokalizaci, jakož i adaptivními změnami samotných receptorů během patologických stavů. Dále bylo zjištěno, že při terapii deprese je významným faktorem neuroprotektce a neurogeneze, která je chronickým podáváním antidepressiv typu SSRI stimulována. Tento mechanismus se jistě podílí i na anxiolytické účinnosti těchto látek (15).

mi samotných receptorů během patologických stavů. Dále bylo zjištěno, že při terapii deprese je významným faktorem neuroprotektce a neurogeneze, která je chronickým podáváním antidepressiv typu SSRI stimulována. Tento mechanismus se jistě podílí i na anxiolytické účinnosti těchto látek (15).

Nejvíce experimentálních údajů je o receptoru 5-HT_{1A}, jehož stimulace úzkost snižuje. Také jedno z posledních anxiolytik uvedených do praxe, buspiron, je parciálním agonistou tohoto receptoru. Rovněž ovlivnění 5-HT_{1B} receptoru je spojeno se zvýšenou agresivitou a nižší úrovní úzkostného chování v experimentálních modelech. Ale mimo buspironu látky, které na tyto receptory působí buď jako agonisté, nebo jako antagonisté (tzv. serenika) v klinické praxi při léčbě úzkosti či naopak agresivity, neuspěly. Parciální agonisté 5-HT_{1A} receptoru působí buď jako agonisté, anebo jako antagonisté, a to v závislosti na množství přítomného endogenního ligandu. V případě nadbytku serotoninu, jako se to předpokládá při úzkostné poruše, vyvolávají parciální agonisté antagonistický účinek. Serotoninové receptory typu 5-HT_{1A} mají funkci autoreceptoru a jsou lokalizovány především presynapticky a somatodendriticky a mimo jiné ovlivňují i výdej noradrenalinu z locus coeruleus. U geneticky upravených myší, které postrádaly tento receptor (5-HT_{1A} knock-out), byla zjištěna vyšší míra úzkosti (6). Předpokládá se, že pro anxiolytické působení jsou podstatné adaptační změny na 5-HT_{1A} receptorech, což vysvětluje pozdější nástup klinického účinku (17).

Dalším receptorem, který byl intenzivně zkoumán z hlediska ovlivnění úzkosti, je 5-HT₃ receptor, jehož antagonisté se používají v klinické léčbě nauzey a zvracení. Ačkoliv v některých animálních modelech tyto látky úzkost ovlivňovaly, v klinických pokusech jejich použití většinou selhalo (13).

Noradrenergní systém

Úzkostné stavy a stres jsou spojeny s aktivací noradrenergního systému v hypothalamu, amygdale a locus coeruleus. Projekce z locus coeruleus směřuje mimo jiné do hypothalamo-hypofyzo-adrenokortikální osy, kde stimuluje stresovou odpověď organismu. Další jeho projekce směřují do amygdaly, prefrontální kůry, hippocampu či thalamu, oblastí, které jsou spojeny s úzkostí či reakcí na stres. Jako poměrně slibné se proto jeví ovlivnění centrálních adrenergních receptorů (14). Alfa2-adrenergní agonisté, kteří mají centrální působení a snižují tonus sympatiku prostřednictvím presynaptických receptorů v experimentálních modelech, prokázaly svoji účinnost v redukcii „úzkostných“ prvků chování (např. klonidin či dexmedetomidin).

din) a alfa2-adrenergní antagonisté (např. yohimbin) naopak působily anxiogenně.

Další skupinou látek, která ovlivňuje zejména vegetativní projev úzkostných poruch, jsou betablokátory. Obecně beta-blokátory snižují např. třes, pocení, palpitace či tachykardii, avšak jejich účinnost při ovlivnění doprovázejícího psychického stavu nebyla dostatečně prokázána. Vegetativní příznaky jsou nejlépe ovlivněny neselektivními beta-blokátory, kde se kombinuje účinek beta1 (např. palpitace) a beta2 (např. svalový třes, snížená motilita GIT, pocení). Největší evidence je při použití propranololu, v ČR je registrována velmi podobná látka metipranolol. Pro zablokování úzkostné reakce je tak účinnější zablokovat výdej noradrenalinu např. pomocí alfa2-adrenergních agonistů, vlastní zablokování pouze beta receptorů ovlivní psychický stav pacienta minimálně. Tyto látky však nezpůsobují sedaci, a proto mohou být teoreticky použity k zvládnutí vegetativní reakce při stresové zátěži (18).

Ostatní systémy

Při vzniku a „průběhu“ úzkostné reakce hraje důležitou roli kortikotropin-releasing faktor (CRF), který spouští celou stresovou reakci. V experimentálních modelech bylo dále zjištěno, že CRF hraje důležitou roli při ovlivnění úzkosti. CRF se váže na receptory CRF-1 a CRF-2, které se liší svojí lokalizací v CNS a farmakologickým profilem. Zdá se, že pro ovlivnění (snížení) úzkosti je důležitý antagonismus na receptoru CRF-1 a agonismus na receptoru CRF-2. Antagonisté receptoru CRF-1 jsou v současné době v preklinickém výzkumu či ve fázi počátečních klinických studií (1).

Dalšími zajímavými látkami v experimentálních studiích úzkosti jsou tzv. tachykininy. Jedná se o peptidy (substance P, neurokinin A a B), které se váží na neurokininové (NK) receptory. Tyto receptory jsou mimo jiné umístěny v oblastech mozku, spojených s regulací nálady a emocí. Antagonisté těchto receptorů (NK1, 2 a 3) jsou rovněž ve fázi preklinického i klinického výzkumu (15).

Glutamátové NMDA receptory jsou nejčetnější receptory v CNS, a proto jejich patologie a ovlivnění hraje pravděpodobně roli ve většině psychických chorob. Nicméně právě nespecifická jejich lokalizace je asi největší překážkou selektivního ovlivnění určité mozkové funkce. Mimo to jsou antagonisté NMDA receptoru (např. MK-801) poměrně toxičtí, a proto se do klinické praxe dostávají látky se slabší aktivitou na těchto receptorech (např. memantin) či látky, které jsou velmi nespecifické (např. ketamin, dextrometorfan). V současné době probíhá mnoho především preklinických studií

s antagonisty různých podtypů NMDA i AMPA receptoru (11) a je poměrně pravděpodobné, že některá selektivní látka v ovlivnění úzkosti bude úspěšná.

Rovněž slibně se v experimentálních studiích jeví látky, které blokují receptory pro cholecystokinin (CCK). CCK je polypeptid, který ovlivňuje výdej dalších neurotransmiterů, včetně serotoninu, dopaminu, GABA, substance P, neuropeptidů Y a VIP. V experimentálních i klinických studiích byl prokázán anxiogenní vliv CCK, jeho podání způsobuje příznaky úzkostného stavu a u pacientů s panickou poruchou může vyvolat záchvat (3). Byla syntetizována celá řada antagonistů receptoru CCK-B, avšak ani v experimentálních, ani v klinických studiích nebyla prokázána jejich výrazná anxiolytická účinnost (20).

Závěr

Z uvedeného přehledu je patrné, že úzkost lze ovlivňovat různými mechanismy. Úzkost je fylogeneticky velmi starý etologický prvek, a proto i mozkové systémy, které ji ovlivňují,

patří k těm fylogeneticky starším. Takové systémy je pak těžké ovlivnit pomocí jednoho neurotransmiteru, neboť jsou regulovány poměrně nespecifickými mechanismy (např. GABAergní či adrenergní systém) a tato regulace bývá zpravidla doplněna o další receptorové systémy. Úzkost je tak společně např. s agresivitou poměrně těžko specificky ovlivnitelná, na rozdíl např. od deprese či schizofrenie, které postihují mozkové struktury fylogeneticky mladší a do určité míry je lze specificky ovlivňovat (i když úplné remise bývá dosaženo zřídka). I přes tyto potíže není pochyb o tom, že vývoj nových anxiolytik bude i nadále pokračovat, neboť je to z komerčního hlediska směr velice zajímavý. Například v roce 2003 se v České republice předepsalo více balení benzodiazepinových anxiolytik než antidepresiv a neuroleptik dohromady. Vývoj nových anxiolytik se bude zaměřovat především na snižování nežádoucích účinků a je zatím otázkou, která skupina látek bude jako další v klinické léčbě úspěšně nasazena.

Podpořeno grantem GAČR 305/05/P003 a výzkumným záměrem MSM0021620816

Literatura

1. Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB (1999) The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J. Endocrinol.* 160: 1–12.
2. Bitran D, Shiekh M, McLeod M (1995) Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnanolone at brain GABA (A) receptors. *J. Neuroendocrinol.* 7: 171–177.
3. Borisenko SA, Meng QH, Rauhala P, Mannisto PT (1996) Neurochemical mediators of anxiety have inconsistent effects on hypothalamic self-stimulation in rats. *Pharmacol. Toxicol.* 78: 354–360.
4. Borsini F, Podhorna J, Marazziti D (2002) Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacology (Berl)* 163: 121–141.
5. Cryan JF, Kaupmann K (2005) Don't worry, B' happy!: a role for GABA(B) receptors in anxiety and depression. *Trends Pharmacol. Sci.* 26: 36–43.
6. Gross C, Zhuang X, Stark K, Ramboz S, Oosting R, Kirby L, Santarelli L, Beck S, Hen R (2002) Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* 416: 396–400.
7. Johnstone TB, Hogenkamp DJ, Coyne L, Su J, Halliwell RF, Tran MB, Yoshimura RF, Li WY, Wang J, Gee KW (2004) Modifying quinolone antibiotics yields new anxiolytics. *Nat. Med.* 10: 31–32.
8. Korpi ER, Grunther G, Luddens H (2002) Drug interactions at GABA(A) receptors. *Prog. Neurobiol.* 67: 113–159.
9. Low K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM, Rulicke T, Bluethmann H, Mohler H, Rudolph U (2000) Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* 290: 131–134.
10. McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR, Farrar S, Myers J, Cook G, Ferris P, Garrett L, Bristow L, Marshall G, Macaulay A, Brown N, Howell O, Moore KW, Carling RW, Street LJ, Castro JL, Ragan CI, Dawson GR, Whiting PJ (2000) Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha(1) subtype. *Nature Neuroscience* 3: 587–592.
11. Meldrum BS (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 130: 1007S–1015S.
12. Nutt DJ, Malizia AL (2001) New insights into the role of the GABA(A)-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *Br. J. Psychiatry* 179: 390–396.
13. Olivier B, van Wijnngaarden I, Soudijn W (2000) 5-HT3 receptor antagonists and anxiety: a preclinical and clinical review. *European Neuropsychopharmacology* 10: 77–95.
14. Redmond DE, Jr., Huang YH (1979) Current concepts. II. New evidence for a locus coeruleus-norepinephrine connection with anxiety. *Life Sci.* 25: 2149–2162.
15. Santarelli L, Gobbi G, Debs PC, Sibille ET, Blier P, Hen R, Heath MJ (2001) Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 1912–1917.
16. Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301: 805–809.
17. Szabo ST, de Montigny C, Blier P (2000) Progressive attenuation of the firing activity of locus coeruleus noradrenergic neurons by sustained administration of selective serotonin reuptake inhibitors. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 3: 1–11.
18. Tornatzky W, Miczek KA (1994) Behavioral and autonomic responses to intermittent social stress: differential protection by clonidine and metoprolol. *Psychopharmacology (Berl)* 116: 346–356.
19. Uhlířová L, Sustkova-Fiserová M, Kršák M (2004) Behavioral effects of flumazenil in the social conflict test in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 171: 259–269.
20. van Megen HJ, Westenberg HG, den Boer JA, Kahn RS (1996) Cholecystokinin in anxiety. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 6: 263–280.