

Originalni rad

Efekat benzodiazepina na kontrakciju preparisane traheje zamorca izazvane histaminom

Mirjana Mirić^{1,2}, Bojan N. Joksimović¹, Biljana Mijović¹,
Slavica Ristić¹, Vladimir Turuntaš¹, Vedrana R. Vidojević¹

¹Medicinski fakultet Foča, Univerzitet Istočno Sarajevo, Foča,
Bosna i Hercegovina

²Medicinski fakultet Kosovska Mitrovica, Univerzitet u Prištini, Srbija

Kratak sadržaj

Uvod. Disajni putevi su biološke strukture koje se šire i skupljaju mijenjajući volumen pluća i tonus bronha. Gama-amino buterična kiselina (GABA) je neurotransmiter koji je značajan inhibitor u centralnom nervnom sistemu sisara. Benzodiazepini su lijekovi koji imaju direktan bronhodilatatorni efekat na glatku muskulaturu disajnih puteva. Oni učestvuju u količini otpuštenog acetilholina i odgovora mišića na nadražaj. Cilj istraživanja je bio da se utvrdi da li benzodiazepini redukuju kontrakciju izolovane traheje zamorca koja je indukovana histaminom.

Metode. Mjerena je tenzija glatke muskulature traheje zamorca čija je kontrakcija indukovana histaminom. Korišćeno je 10 zamorca oba pola, prosječne težine od 610 g. Pripremljeni preparat traheje zamorca tretiran je rastućim koncentracijama histamina od 0,01, 0,1 i 1,0 mg/mL pri čemu je konstriktorni odgovor registrovan fiziografom firme Godart "Ferstransducer" na višekanalnom pisaču "Watanable". Preparat je ispiran Krebsovim rastvorom, a poslije ponovne stabilizacije postupak se ponavljao uz dodavanje benzodiazepina u rastućim koncentracijama.

Rezultati. Prethodna inkubacija trahealnih prstenova zamorca benzodiazepinom u koncentraciji od 0,014 mg/mL smanjila je kontraktilnu sposobnost traheje indukovanu sa 0,01 mg/mL histamina za 82,3%. Korišćenje benzodiazepina u koncentraciji od 0,028 mg/mL smanjilo je kontrakciju za 85,2%, a koncentracija benzodiazepina od 0,042 mg/mL dovela je do najvećeg pada kontraktilnosti za 88,2%.

Zaključak. Dobijeni rezultati ukazuju da veće koncentracije benzodiazepina smanjuju kontraktilnu sposobnost traheje izazvane histaminom.

Glavne riječi: kontraktilnost traheje zamorca, GABA, benzodiazepini, histamin

Adresa autora:
Bojan Joksimović

Karađorđeva br. 88, 73 300 Foča
joksimovic_bojan@yahoo.com

Uvod

Disajni putevi predstavljaju biološke strukture koje se šire i skupljaju mijenjajući volumen pluća i tonus bronha. Glatki mišići bronha su normalno pod većim uticajem parasimpatikusa u odnosu na simpatičke uticaje [1]. Uloga holinergičkog nervnog sistema u regulaciji bronhomotornog tonusa je u refleksnoj bronhokonstrikciji i povećanoj sekreciji bronhalnih žlijezda. Nakon stimulacije holinergičkih parasimpatičkih postganglijskih vlakana dolazi do oslobađanja acetilholina iz intrapulmonalnih završetaka vagusnog nerva. Acetilholin direktno uzrokuje konstrikciju glatke muskulature stimulacijom muskarinskih receptora [1,2,4]. Stimulacijom adrenergičkog nervnog sistema tj. adrenergičkih simpatičkih vlakana kod zdravih osoba dolazi do bronhodilatacije (povećanja prohodnosti disajnih puteva) i inhibicije žlezdane sekrecije. Ova dilatacija glatke muskulature disajnih puteva je omogućena uz pomoć beta2 receptora. Gama-amino buterična kiselina (GABA) je neurotransmiter koji je značajan inhibitor u centralnom nervnom sistemu sisara [2,3,4]. Histamin (beta-imidazolyl-ethylamine) ima bronhokonstriktivni efekat uz pomoć H1 receptora [5]. Najveća količina histamina se proizvodi u mastoidnim ćelijama koje su gusto lokalizovane u mukoznom sloju zida disajnih puteva. Histamin također uzrokuje bronhokonstrikciju indirektno, djelovanjem na nervne završetke nervus vagusa [6,7].

GABA djeluje posredstvom GABA-A, GABA-B i GABA-C postsinaptičkih receptora koji se nalaze u mozgu i perifernim tkivima uključujući i pluća. GABA receptori učestvuju u količini otpuštenog acetilholina, a samim tim i u modulaciji odgovora mišića na nadražaj [2,4]. Benzodiazepini su lijekovi koji se koriste kao muskulorelaksanti, anksiolitici i antikonvulzivi [3]. Benzodiazepini imaju direktan i indirektan bronhodilatatorni efekat na glatku muskulaturu disajnih puteva [8]. Prvi je uzrokovan inhibicijom voltažno-zavisnih Ca²⁺ kanala, što vodi ka relaksaciji glatkih mišića [4]. Postoje periferni benzodiazepinski receptori koji su dominantno lokalizovani u spoljašnjoj membrani mitohondrija. Istraživanja dokazuju da ovi receptori mogu dovoditi do modulacije u bronhomotornom tonusu [9-11]. Drugi, indirektan efekat benzodiazepina je takav da povećavaju neurotransmisionu aktivnost GA-

BA-e na nivou postsinaptičkih receptora kao i na nivou svih neuroaksona u centralnom nervnom sistemu [8].

Cilj istraživanja bio je da se utvrdi da li benzodiazepini redukuju (antagonizuju) kontrakciju izolovane traheje zamorca koja je indukovana histaminom.

Metode rada

U ovom ispitivanju mjerena je tenzija glatke muskulature traheje zamorca čija je kontrakcija indukovana histaminom. Istraživanjem je obuhvaćeno 10 zamoraca, oba pola, prosječne tjelesne težine 610 g. Zamorci su prethodno čuvani i hranjeni u standardnim uslovima, a eksperiment je rađen uvijek u isto doba dana, od 9 do 13 časova u Laboratoriji za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Kosovskoj Mitrovici. Svi eksperimenti na zamorcima vršeni su u skladu sa principima međunarodne deklaracije o dobrobiti životinja: Guide care and USE Laboratory Animals, NIH publication No 85-23.

Poslije incizije kože vrata i presijecanja prednje fascije vrata pristupalo se vratnom dijelu traheje. Izvađeni izolovani organ traheje se odmah potapao u Krebs-Henseleit-ov rastvor čija temperatura je bila 37°C. Traheja je oslobođena od okolnog vezivnog tkiva i načinjen je longitudinalni rez na anteriornoj strani traheje, a zatim poprečnim presjecima su napravljeni preparati koji su sadržali 5-6 trahealnih prstenova. Jedan takav preparat se stavljao u stakleno vodeno kupatilo ispunjeno sa 44 ml Krebs-Henseleit-ove solucije čija je temperatura iznosila 37°C i kroz koje je kontinuirano vršena aeracija gasnom smješom 95% O₂ i 5% CO₂. Trahealni preparat je jednim krajem, specijalnim metalnim kopčama, fiksiran za dno vodenog kupatila, a drugim krajem je bio vezan za "Statham" force transducer. Preparat traheje se na početku eksperimentalne procedure istežao do tenzije od 1 g, a zatim ostavljao u narednih 60 min radi ekvilibracije i uspostavljanja "steady state".

Na ovakav način pripremljeni preparat traheje zamorca tretirali smo rastućim koncentracijama histamina (Histamin, Sigma-Aldrich, Germany) od 0,01, 0,1 i 1,0 mg/mL pri čemu je registrovana jačina kontrakcije poslije svake koncentracije posebno, a konstriktorni odgovor

Tabela 1. Efekti primjene benzodiazepina na procenat promjene kontraktilnog odgovora izolovane traheje izazvan histaminom. Postoji evidentna tendencija smanjenja odgovora na histamin ukoliko koncentracija benzodiazepina u mediju koji okružuje izolovani organ trahealnih prstenova raste.

Koncentracija histamina/ Koncentracija benzodiazepina	0,01 mg/mL	0,1 mg/mL	1,0 mg/mL
0,014 mg/mL	82,3%	29,6%	24,5 %
0,028 mg/mL	85,2%	36,7%	36,6%
0,042 mg/mL	88,2%	47,3%	51,7%

registrovan fiziografom firme Godart "Ferstransducer" na višekanalnom pisaču "Watanable". Preparat je ispiran Krebs-Henseleit-ovim rastvorom. Poslije perioda stabilizacije tkiva (vraćanja igle pisača na nultu poziciju) dodavane su rastuće koncentracije benzodiazepina (Apaurin, Krka, Slovenija) od 0,014 mg/mL; 0,028 mg/mL i 0,042 mg/mL i to za svaku koncentraciju histamina.

Rezultati

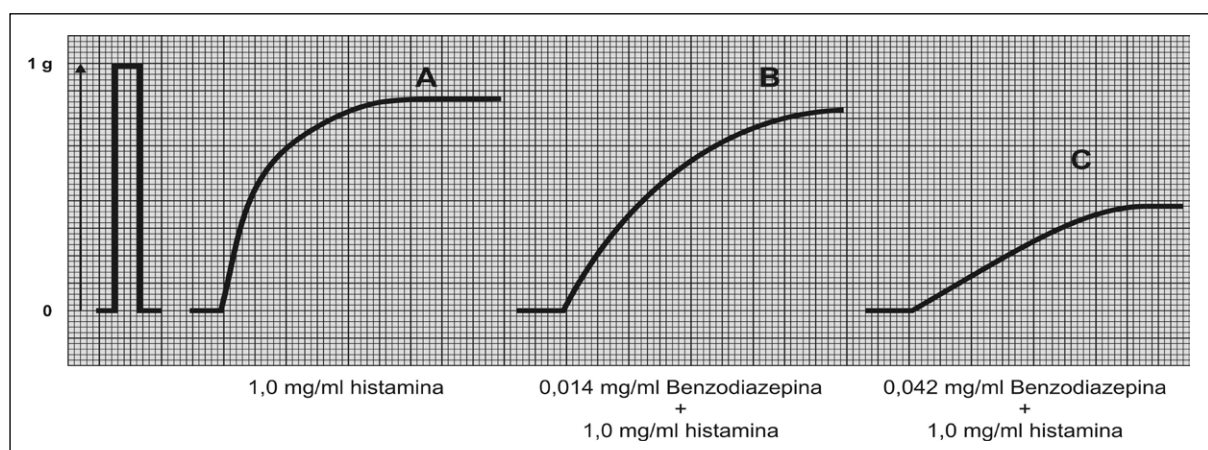
Eksperimentalnim istraživanjem obuhvaćeno je 10 zamoraca, kod kojih je poslije žrtvovanja uzeta traheja. Izolovane traheje zamoraca provocirane su rastućim koncentracijama histamina (0,01, 0,1 i 1,0 mg/mL). Registrovana je jačina kontrakcije poslije svake koncentracije posebno. Poslije perioda stabilizacije tkiva (vraćanje igle pisača na nultu poziciju) dodavane su rastuće koncentracije benzodiazepina

(0,014 mg/mL; 0,028 mg/mL i 0,042 mg/mL).

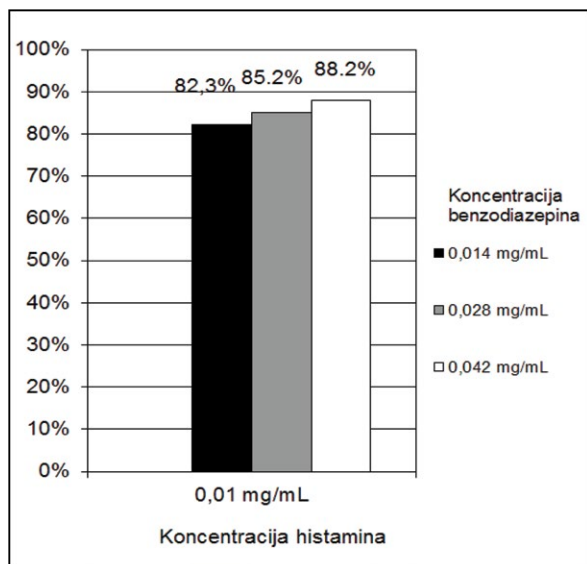
Na grafikonu 1 prikazane su krivulje kontrakcija traheje poslije datog histamina u koncentraciji od 1,0 mg/mL (A) kao i poslije davanja jedne i tri koncentracije benzodiazepina (B i C). Jasno je uočljivo da najmanja koncentracija benzodiazepina utiče samo na farmakokinetiku histamina, dok trostruka veća koncentracija značajno blokira njegove efekte.

Na tabeli 1 se vidi da veće koncentracije benzodiazepina smanjuju kontraktilnu sposobnost traheje na primjenjene koncentracije histamina. Iz tabele 1 zapažamo da primjena većih koncentracija benzodiazepina smanjuje kontraktilnu sposobnost traheje stimulisane histaminom, nezavisno da li je pri tome primjenjen histamin u koncentraciji od 0,01; 0,1 ili 1,0 mg/mL.

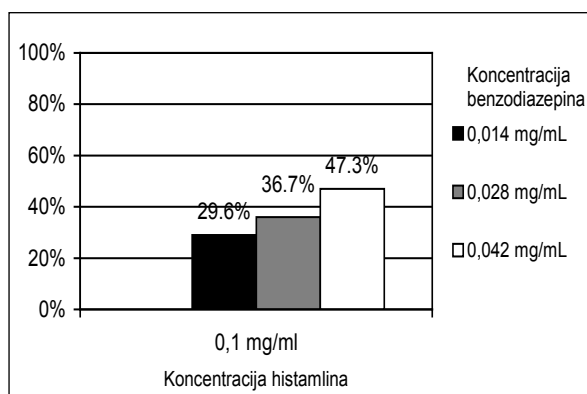
Prethodna inkubacija trahealnih prstenova zamorca benzodiazepinom u koncentraciji od



Grafikon 1. Krivulja kontraktilnog odgovora izolovane traheje zamorca na histamin (1,0 mg/mL) prije (A) i poslije rastućih koncentracija benzodiazepina (B i C) kod iste eksperimentalne životinje. Prethodna inkubacija trahealnih prstenova benzodiazepinom (0,042 mg/mL, krivulja C) prouzrokovala je značajno smanjenje kontraktilnog odgovora na histamin.



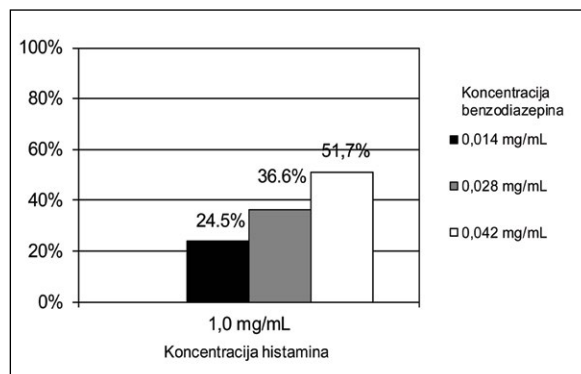
Grafikon 2. Efekti primjene benzodiazepina na redukciju amplitude kontraktilne sposobnosti traheje zamorca čija je kontrakcija stimulisana primjenom histamina (0,01 mg/mL).



Grafikon 3. Efekti primjene benzodiazepina na redukciju amplitude kontraktilne sposobnosti traheje zamorca čija je kontrakcija stimulisana primjenom histamina (0,1 mg/mL).

0,014 mg/mL smanjila je kontraktilnu sposobnost traheje indukovanu sa 0,01 mg/mL histamina za 82,3%. Korišćenje benzodiazepina u koncentraciji od 0,028 mg/mL smanjilo je kontrakciju za 85,2%, a koncentracija benzodiazepina od 0,042 mg/mL dovela je do najvećeg pada kontraktilnosti za 88,2% (Grafikon 2).

Na grafikonu 3 se vidi da je kontrakciju, koja je indukovana koncentracijom histamina od 0,1 mg/mL, prva koncentracija benzodiazepina od 0,014 mg/mL smanjila za 29,6%, koncentracija benzodiazepina od 0,028 mg/mL smanjila je kontrakciju za 36,7%, a treća koncentracija benzodiazepina od 0,042 mg/



Grafikon 4. Efekti primjene benzodiazepina na redukciju amplitude kontraktilne sposobnosti traheje zamorca čija je kontrakcija stimulisana primjenom histamina (1,0 mg/mL).

mL dovela je do najvećeg pada kontraktilnosti za 47,3%.

Kod izolovane traheje zamorca čija je kontrakcija indukovana sa najvećom koncentracijom histamina od 1 mg/mL, koncentracija benzodiazepina od 0,014 mg/mL smanjila je kontraktilnu sposobnost traheje za 24,5%. Druga koncentracija benzodiazepina od 0,028 mg/mL smanjila je kontraktilnu sposobnost traheje za 36,6%. Koncentracija benzodiazepina od 0,042 mg/mL dovela je do najvećeg pada kontraktilnosti za 51,7% (Grafikon 4).

Diskusija

Traheja je fibromuskularni cijevni organ čiji ventrolateralni zid gradi hijalina hrskavica, a dorzalni zid glatki mišić. Glatki mišići disajnih puteva od traheje do respiratornih bronhiola su pod kontrolom eferentnih vlakana autonomnog nervnog sistema. Različiti tipovi neurotransmitera i peptida učestvuju u regulaciji kontraktilnosti disajnih puteva (GABA, serotonin, tahikinin i glutamat). Efektorske ćelije disajnih puteva (glatki mišić bronha i krvnih sudova, žlijezde) su gusto inervisane od strane vlakana parasimpatičkog i simpatičkog nervnog sistema, koji regulišu tonus glatke muskulature disajnih puteva, žljezdanu sekreciju i dijametar krvnih sudova. Disajni putevi su primarno inervisani od strane autonomnog parasimpatičkog nervnog sistema [1,2,8].

Histamin predstavlja agonistu holinergičkih receptora i primjenjen in vivo ili in vitro imitira efekte parasimpatičke inervacije

na muskulaturu respiratornih puteva, dakle izaziva konstrikciju bronha. Iz tog razloga histamin se može koristiti kao lijek u bronhoprovokacionim testovima za dokazivanje bronhijalnog reaktiviteta, a takođe iz tog razloga mi smo ga koristili u ovom istraživanju kao lijek koji izaziva bronhokonstrikciju [5,6,7].

Većina radova istraživala je centralne efekte GABA-ergičnog sistema na regulaciju prohodnosti disajnih puteva, a istraživanja o njegovim eventualnim perifernim efektima su manje dostupna u literaturi i manje se o njima zna. Na osnovu dosadašnjih saznanja znamo da povećana parasimpatička inervacija dovodi do bronhokonstrikcije i da ona biva blokirana ili smanjena davanjem GABA, koja ima relaksirajući efekat na glatku muskulaturu respiratornih puteva [2,12,13].

Našim istraživanjem utvrdili smo da povećan tonus glatke muskulature izolovane traheje zamorca nastao indukovanjem histamina biva smanjen poslije davanja benzodiazepina. Benzodiazepini su lijekovi koji imaju direktne i indirektne bronhodilatatorne efekte na glatku muskulaturu disajnih puteva [9,10]. Direktan efekat ispoljavaju inhibišući voltažno zavisne Ca^{2+} kanale, a indirektan pojačavajući neurotransmisionu ulogu GABA na nivou postsinaptičkih receptora, a rezultat toga je porast broja otvorenih kanala za hlor [4,7]. GABA djeluje posredstvom GABA-A, GABA-B i GABA-C receptora koji su smješteni u plućima. GABA-A receptor se sastoji iz α i β subjedinice čijom se konformacijom formira kanal kroz koji struje joni hlora u ćeliju, a to je posljedica aktivacije GABA-A receptora od strane neurotransmitera koji se veže za β subjedinicu [3,4,14].

Centralni senzorni efekat GABA ispoljava preko intermedijarne hemosenzitivne zone koja je odgovorna za centralni ventilatorni hemosenzitivitet. Ubrizgavanjem muscimola u ovu zonu dolazi do pada krvnog pritiska i usporenog srčanog rada. Veoma značajno otkriće uz pomoć imunocitohemijske tehnike je prisustvo GABA-ergičnih neurona u ovoj zoni. Smatra se da su ove ćelije odgovorne za respiratornu depresiju poslije davanja muscimola. Dokazano je da benzodiazepini davani lokalno na površne strukture intermedijarne zone mogu da prouzrokuju pad tonusa glatke muskulature disajnih puteva, prije nego djelovanjem na dublje neurone dorzalne grupe

vagusa i nukleusa ambigusa koji inerviše eferentnim nervnim putem disajno stablo [4,10,13].

Zna se da GABA-B specifični agonisti smanjuju otpor u disajnim putevima tako što modulišu oslobađanje acetilholina sa parasimpatičkih vlakana. Sa druge strane, GABA-B receptorski agonist, baklofen, može pojačati odgovor disajnih puteva imitirajući dejstvo histamina kod astmatičnih pacijenata. Ovo paradoksalno dejstvo baklofena vodi nas ka hipotezi da možda postoje postganglionski GABA-B receptori koji vežu Gi protein, za koji se zna da slabi relaksaciju glatke muskulature disajnih puteva [9,10,11].

Mnoga laboratorijska proučavanja dokazala su da derivat GABA, baklofen, djeluje na respiratorne spinalne neurone u zavisnosti od koncentracije. Manje koncentracije baklofena od (0,5-2 mg/kg) povećavaju učestalost akcionih potencijala na freničnom i interkostalnim neuronima. Ove promjene nisu vidljive za vrijeme inspiratornog punjenja i bez efekta su na trajanje ekspiracije. Srednja koncentracija od (2-4 mg/kg) povećava trajanje inspiracije. Veća koncentracija od (4-10 mg/kg) parališe inspiraciju [9].

Neka istraživanja nam pokazuju da benzodiazepini poput Diazepama ili Midazolama imaju inhibitorni uticaj na Ca^{2+} i K^{+} kanale čime dovode do bronhodilatacije, a istovremeno smanjuju kontraktilnu sposobnost traheje na primjenjene koncentracije histamina. Nema informacija da li je taj efekat rezultat djelovanja na GABA receptore u traheji ili efekata benzodiazepina koji mimoilaze stimulaciju GABA receptora [4,8].

Zaključak

Dobijeni rezultati ukazuju da parasimpatička inervacija, koja davanjem histamina vodi ka konstrikciji bronha, biva smanjena davanjem benzodiazepina. Benzodiazepini uz pomoć GABA ostvaruju relaksirajući efekat na glatku muskulaturu disajnih puteva inhibišući mišićnu sprovodljivost, smanjujući otpor u disajnim putevima i smanjujući kontraktilnost mišića traheje. Naša istraživanja su pokazala da veće koncentracije benzodiazepina smanjuju kontraktilnu sposobnost traheje na primjenjene koncentracije histamina.

Literatura

- Cuss FM, Barnes PJ. Airway smooth muscle and disease workshop: epithelial mediators. *Am Rev Resp Dis* 1987;136(4 Pt 2):32-35.
- Chapman RW, Hey JA, Rizzo CA, Bolser DC. GABA B receptors in the lung. *Trends Pharmacol Sci* 1993;14(1):26-29
- Haxhiu MA, Lunteren E, Cherniack NS, Deal EC. Benzodiazepines acting on ventral surface of medulla cause airway dilation. *Am J Physiol* 1989;25(4 Pt 2):R810-15.
- Matera MG, D'Agostino B, Costantino M, Mangrella M, Calderaro V, Rossi F. K⁺ channels and guinea-pig trachea: a possible functional modulation by GABA B receptors. *Pulm Pharmacol* 1994;7(4):259-263.
- Smuda C, Bryce PJ. New developments in the use of histamine and histamine receptors. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011;11(2):94-100.
- Zampeli E, Tiligada E. The role of histamine H₄ receptor in immune and inflammatory disorders. *Br J Pharmacol* 2009; 157(1): 24-33.
- Szewczyk G, Pyzlak M, Klimkiewicz J, Smiertka W, Miedzińska-Maciejewska M, Szukiewicz D. Mast cells and histamine: do they influence placental vascular network and development in preeclampsia? *Mediators Inflamm* 2012;2012:307189. Published online 2012 June 19. doi: 10.1155/2012/307189
- Raeburn D, Miller LG, Summer WR. Peripheral type benzodiazepine receptor and airway smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;245(2):557-62.
- Vinkers CH, Tjeldink JK, Luykx JJ, Vis R. Choosing the correct benzodiazepine: mechanism of action and pharmacokinetics. *Ned Tijdschr Geneesk* 2012;155(35):A4900.
- Formiga F, Duaso E, Ruiz D, San José A, Urrutia A, López-Soto A. Use of benzodiazepines according to the admission diagnosis. *Med Clin (Barc)* 2012 Sep 27. pii: S8756-3282(12)01290-2. doi: 10.1016/j.bone.2012.09.028.
- Yamakage M, Matsuzaki T, Tsujiguchi N, Honma Y, Namiki A. Inhibitory effects of diazepam and midazolam on Ca²⁺ and K⁺ channels in canine tracheal smooth muscle cells. *Anesthesiology* 1999;90(1):197-207.
- Bolser DC, DeGennaro FC, O'Reilly S, Chapman RW, Kreutner W, Hey JA. Peripheral and central sites of action of GABA-B agonists to inhibit the cough reflex in the cat and guinea pig. *Br J Pharmacol* 1994;113:1344-1348.
- Dicpinigaitis PV, Spungen AM, Bauman WA, Absgarten A, Almenoff PL. Inhibition of bronchial hyperresponsiveness by the GABA-agonist baclofen. *Chest* 1994;106(3):758-61.
- Tamaoki J, Graf PD, Nadel JA. Effect of gamma-aminobutyric acid on neurally mediated contraction of guinea pig trachealis smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;243(1):86-90.

The effect of benzodiazepine on contractility of isolated trachea ring of the guinea pig induced by histamine

Mirjana Mirić^{1,2}, Bojan N. Joksimović¹, Biljana Mijović¹, Slavica Ristić¹, Vladimir Turuntaš¹, Vedrana R. Vidojević¹

¹Faculty of Medicine Foča, University of East Sarajevo, Foča, Bosnia and Herzegovina

²Faculty of Medicine Kosovska Mitrovica, University of Priština, Serbia

Introduction. Airways are biological structures that expand and constrict changing volume of lung and tonus of bronchi. Gamma-amino butyric acid (GABA) is major inhibitory neurotransmitter in mammalian nervous system. Benzodiazepines are agents that have a direct bronchodilator action on airway smooth muscle. They participate in an amount of dismissed acetylcholine and in modulation of muscle response to excitation. The aim of the examination was to study possible antagonized effect of benzodiazepine on smooth muscle contractility of isolated tracheal ring from guinea pig after the application of histamine.

Methods. In the study tension of tracheal smooth muscles of guinea-pig, whose contraction was induced by histamine, was measured. Ten guinea-pigs of both sexes were involved in the study with average weight of 610 g. The isolated trachea was treated with increasing concentrations of histamine 0.01, 0.1 and 1.0 mg/mL. The constriction answer was registered by physiograph of the Godart company "Ferstransducer" on multi-channelled writer "Watanable". The isolated trachea was washed out by Krebs

solution and after restabilization the procedure was repeated with the addition of increasing concentration of benzodiazepine.

Results. In trachea whose contraction was induced by concentration of histamine of 0.01 mg/mL one concentration of benzodiazepines of 0,014 mg/mL reduced the contraction ability by 82.3%. The concentrations of benzodiazepine of 0,028 mg/mL reduced the contraction ability of trachea by 85.2%. Third concentration of benzodiazepine of 0,042 mg/mL led to the highest decrease of contraction of trachea by 88.2%.

Conclusion. The higher concentrations of benzodiazepine reduced contraction ability of trachea induced by histamine.

Keywords: contractility of guinea pig trachea, GABA, benzodiazepine, histamine