

ЕФЕКТ ВЕРАПАМИЛА НА ТРАХЕАЛНИ ОДГОВОР ИЗАЗВАН ХИСТАМИНОМ И АЦЕТИЛХОЛИНОМ

Митић Р.¹, Бишевац Б.², Станојевић З.¹, Бурсаћ М.¹, Вокић Т.³

¹Институт за фармакологију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

²Институт за физиологију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

³Институт за Патолошку физиологију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

THE EFFECT OF VERAPAMIL ON TRACHEA RESPONSE CAUSED BY HISTAMINE AND ACETYLCHOLINE

Митић Р.¹, Бишевац Б.², Станојевић З.¹, Бурсаћ М.¹, Вокић Т.³

¹Institute of Pharmacology, Medical Faculty Priština, Kosovska Mitrovica

²Institute of Physiology, Medical Faculty Priština, Kosovska Mitrovica

³Institute of Pathophysiology, Medical faculty Priština, Kosovska Mitrovica

SUMMARY

In the study with experimental animals *in vitro* conditions, the aim of the research was to examine the effect of verapamil on the even brawniness of the isolated organ of the respiratory ways (tracheas) in guinea-pigs on acetylcholine and histamine, and in that way, to examine local mechanisms of smooth muscle system but also to exclude the rest of the neurohumoral influences. The guinea-pigs of both sexes (average weight of 500-700 gr), were used for this experiment. 10 guinea-pigs were included in the experimental research; the trachea was taken from them after the immolation. The preparations of isolated organs of trachea were divided into two groups (A and B). The previous incubation of trachea isolated by verapamil (1 minute) in concentration 10^{-5} M significantly reduced the contraction caused by acetylcholine (ascent 21.49 ± 9.63 , $r=0.97$, $p<0.05$). Concentration of verapamil 10^{-4} M also caused significant fall of contraction (ascent 21.3 ± 12.63 , $r=0.95$, $p<0.05$). Verapamil in concentration 10^{-5} M significantly reduces the response of isolated trachea caused by histamine in concentrations 10^{-6} M and 10^{-5} M (slope 21.3 ± 10.6 , $r=0.96$, $p<0.05$). Concentration of verapamil 10^{-4} M significantly reduced the contraction of smooth muscles of isolated trachea caused by histamine (slope 15.46 ± 10.47 , $r=0.94$, $p<0.05$).

Keywords: Bronchospasam, Verapamil, Acetylcholine, Histamine.

САЖЕТАК

У студији на експерименталним животињама у *in vitro* условима, циљ испитивања се састојао да испита ефект верапамила на одговор глатке мускулатуре изолованог органа дисајних путева (трахеја) заморчета на ацетилхолин и хистамин и тиме испитају локални механизми глаткомишићног система и искључе остали неурохуморални утицаји. За извођење експеримента коришћени су заморчићи оба пола просечне тежине од 500-700 грама. Експерименталним истраживањима обухваћено је 10 заморчета код којих је после жртвовања узета трахеја. Препарати изолованог органа трахеје су подељени у две групе (А и Б). Претходна инкубација изолованог органа трахеје верапамилем (1 минут) у концентрацији 10^{-5} М значајно је смањила контракцију изазвану ацетилхолином (нагиб $21,49 \pm 9,63$, $r=0,97$, $p<0,05$). Концентрација верапамила 10^{-4} М проузроковала је такође сигнификантан пад контракције (нагиб $21,3 \pm 12,63$, $r=0,95$, $p<0,05$). Верапамил у концентрацији 10^{-5} М сигнификантно смањује одговор изоловане трахеје изазван хистамином у концентрацијама 10^{-6} и 10^{-5} М (нагиб $21,3 \pm 10,6$, $r=0,96$, $p<0,05$). Концентрација верапамила 10^{-4} М сигнификантно је смањила контракцију глатких мишића изоловане трахеје изазвану хистамином (нагиб $15,46 \pm 10,47$, $r=0,94$, $p<0,05$).

Кључне речи: Бронхоспазам, Верапамил, Ацетилхолин, Хистамин.

УВОД

Добар део патологије и патофизиологије респираторног система управо је везан за поремећаје бронхомоторног тонуса у смислу појачаног бронхијалног одговора за одређене специфичне или неспецифичне стимулусе. Велики је број бронхоконстрикторних агенаса који могу да изазову бронхијални одговор. И данас је отворено и још увек нерасветљено питање механизма

настанка бронхијалног сензитивитета с хиперреакбилитетом на одређене ноксе код болесника са хроничним опструктивним обољењима плућа (бронхијална астма, хронични опструктивни бронхитис). Чињеница да излагање болесника с бронхијалном астмом одређеним бронхоконстрикторним агенсима (ацетилхолин, хистамин) који у тим дозама код нормалних здравих особа не

изазивају значајан одговор, изазива изражену бронхоконстрикцију, наводи нас на један од основних, и уједно један од најтежих проблема, на питање хиперреактивности у болесника с бронхијалном астмом. Експериментално се на животињама на више начина покушава да изазове преосетљивост бронха, патофизиолошко стање које се карактерише појачаним бронхијалним одговором на бронхомоторне супстанце. Стога је проучавање механизма настанка и модификације бронхијалног одговора значајно за проналажење адекватних терапијских решења. (1-3)

Велики број истраживања указују да верапамил као и остали представници из групе антагониста калцијумских канала има своје место у терапији кардиоваскуларних обољења. С обзиром да улаз калцијумових јона у интрацелуларни простор глатких мишића дисајних путева проузрокује контракцију, то је поставило хипотезу да фармаколошке супстанце које могу блокирати улаз калцијума могу бити од користи у терапији болесника с бронхијалном астмом, хроничним опструктивним бронхитисом и болесника са повећаним бронхијалним реактивитетом на бронхоконстрикторне супстанце. Чињеница да калцијум игра битну улогу у контракцији мишића оправдава идеју да треба подробије испитати супстанце које блокирају дејство јона Ca^{2+} (верапамил), или на неки други начин модификују ефекте изазване јонима калцијума. До данас су изведене бројне студије ефекта антагониста калцијума на експериментално изазваној астми или у болесника с бронхијалном астмом, међутим, и даље постоје бројна питања везана за механизме деловања.

Постављањем овог проблема на експерименталним животињама у *in vitro* условима, на изолованом органу трахеје, олакшан је донекле проблем изучавања проблема бронхоконстрикције који у основи лежи, мање или више, у свакој од клиничких облика хроничне опструктивне болести плућа, посебно у бронхијалној астми и хроничном опструктивном бронхитису. Ефекти антагониста калцијума у *in vitro* условима зависи у првом реду од агенса и употребљене концентрације којим изазивамо контракцију (ацетилхолин, хистамин), и интрацелуларних механизма који посредују и модулирају ефекат на глатко-мишићну ћелију.

Ефекти верапамила на респираторни тракт

У концентрацијама од 1 $\mu\text{mol/l}$ верапамил је значајно инхибисао контракцију глатке мускулатуре трахеје заморчета изазване $CaCl_2$, а такође је изазвао и делимичну депресују контрактилног одговора на карбахол. (4) Постоје литературни подаци да верапамил спречава калијумом - и серотонином индуковану контракцију трахеалне мускулатуре експерименталних животиња. (5, 6)

Код несензибилисаних заморчића верапамил је изазвао концентрација-зависно смањење контракције глатких мишића трахеје изазваних $CaCl_2$, KCl , ацетилхолином или хистамином. Код сензибилисаних животиња овај ефект је такође био смањен. (7-13)

У људи верапамил није испољавао значајније ефекте на глатку мускулатуру бронха, нити је био у ста-

њу да сузбије алергијску реакцију бронха, а у већим дозама изазвао је бронхоконстрикцију код 50% пацијента. (14)

Верапамил, дат болесницима с бронхијалном астмом испољавао је заштитно дејство према бронхоконстрикцији која би била проузрокована физичким оптерећењем. *In vitro* студије указују да верапамил спречава ослобађање SRS-A, хистамин и друге медијаторе чије је ослобађање зависно од калцијума. Такође Patel и Tullet су нашли да верапамил и галопамил инхибишу бронхоконстрикцију индуковану физичким оптерећењем. (15-17)

Релаксирајући ефекат блокатора Ca^{2+} канала израженији је у бронхоконстрикцији проузрокованој хистамином него у бронхоконстрикцији индукованој метахолином. (18) Ово је у складу с налазима у *in vitro* условима, који показују да је контракција глатке мускулатуре индукована ацетилхолином мање зависна од ванћелијског Ca^{2+} него хистамином индукована контракција. (19)

Дат инхалацијом у облику аеросола у дози од 12,5 mg верапамил је само делимично инхибисао контракцију бронхалне мускулатуре изазване метахолином а био је неефикасан у терапији бронхоконстрикције изазване хистамином и алергенима. (20)

Walters и сар. (1984) су код 8 пацијента са благом атопичном астмом (у двоструко слепом испитивању) испитивали промену специфичног отпора ваздушних путева на инхалирани хистамин пре и након инхалације верапамила (15 минута). Нису установљене сигнификантне промене у специфичном отпору ваздушних путева, међутим било је значајног пада у преосетљивости према хистамину (повећање прага одговора). (21-25)

Код петнаесторо деце са астмом у двоструко слепом апликовању верапамила (5 mg) помоћу небулизатора, верапамил је показао у 80% деце сигнификантан протективни ефект у бронхоконстрикцији изазваној метахолином у односу на плацебо. (26)

Wong и сар. (1987) студирали су протективни ефект верапамила (инхалација 5 mg/2 ml у току 30 минута) у деце са хроничном астмом на бронхоконстрикцију изазвану метахолином и физичким оптерећењем. Верапамил није редуковао метахолинску реактивност, док је након физичког оптерећења показао сигнификантан пад FEV1 (форсирани експираторни волумен у 1 секунди) у односу на плацебо. (27)

ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Руководећи се чињеницом да калцијум као врло важан електролит у организму, поред осталог, има значајну улогу у контракцији мишића, сасвим је оправдано што је верапамил, као антагонист калцијумских канала узет као фармаколошки кључ у разјашњавању питања везаних за механизме контракције глатког мишића трахеобронхијалног стабла.

У студији на експерименталним животињама у *in vitro* условима, циљ испитивања се састојао да испита ефект верапамила на одговор глатке мускулатуре изоло-

ваног органа дисајних путева (трахеја) заморчета на ацетилхолин и хистамин и тиме испитају локални механизми глаткомишићног система и искључе остали неурохуморални утицаји. Да би се до ових информација дошло, испитан је и одређен:

а) одговор активне тензије изоловане трахеје на ацетилхолин (кумулативна концентрација-одговор кривуља) након краткотрајне инкубације ткива са верапамилом,

б) одговор активне тензије изоловане трахеје на хистамин (кумулативна концентрација-одговор кривуља) након краткотрајне инкубације ткива са верапамилом,

в) афинитет агониста према специфичним рецепторима (pD_2 вредност),

г) афинитет некомпетитивног антагониста према рецепторима (pD_2').

МЕТОД ИСТРАЖИВАЊА

Мерење активне тензије глатке мускулатуре трахеје

За извођење експеримента коришћени су заморчићи оба пола просечне тежине од 500-700 г. Експерименталне животиње су жртвоване механичким ударцем у главу а затим постављане на леђа на већ припремљеној плочи. Након инцизије коже врата у медијалној линији и након пресецања предње фасције врата приступало се вратном делу трахеје. Екстирпирани изоловани орган трахеје се одмах потапао у Krebs-Henseleit-ов раствор састава (изражено у M/L): NaCl - 0,118; KCl - 0,0059; CaCl₂ - 0,0025; MgSO₄ - 0,0012; NaHPO₄ - 0,0012; NaHCO₃ - 0,0255; C₆H₁₂O₆ - 0,0056, а који је био аериран кисеоником. Након чишћења и ослобађања трахеје од околног везивног ткива начињен је лонгитудинални рез на антериорној страни трахеје насупрот трахеалног мишића, а затим попречним пресецима начињени препарати који у свом саставу садрже 6-8 прстенова. Тако припремљени препарат се затим поставља у стаклено водено купатило испуњено са 44 ml Krebs-Henseleit-овим раствором чија је температура износила 37° C и кроз који је континуирано вршена аерација гас-

ном смешом 95% O₂ - 5% CO₂ што је продуковало pH од 7.4. Трахеални препарат је једним крајем, специјалним металним копчама, фиксиран за дно воденог купатила а другим крајем везиван за "Statham" форсе трансјусер. Одговори изолованог трахеалног препарата су најпре мултиплицирани HSE амплификатором а затим бележени на вишеканални писач "Watanabe". На самом почетку експерименталне процедуре, препарат трахеје је истегнут до тензије од 1 g а затим остављан у наредних 60 минута ради еквилибрације и успостављања "steady state"-а.

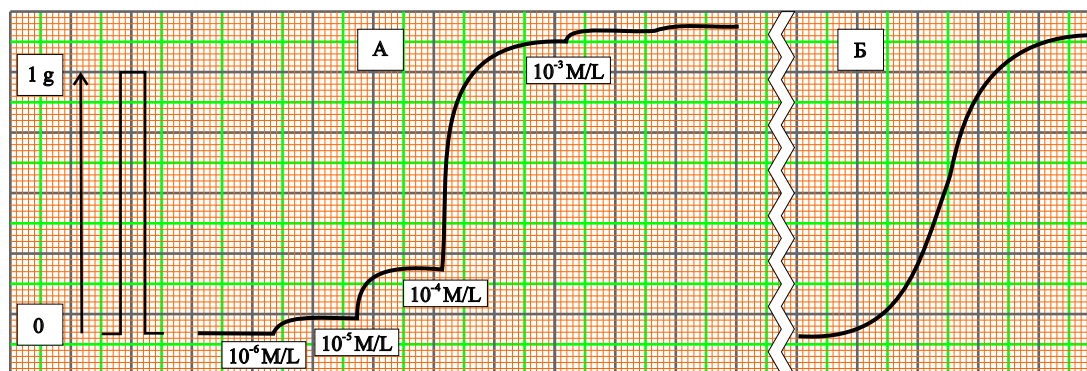
Експерименталним истраживањем обухваћено је 10 заморчета, код којих је после жртвовања узета трахеја. Препарати изолованих органа трахеје су подељени у две групе.

А. Ефект верапамила на контракцију глатких мишића изоловане трахеје заморчета изазвану ацетилхолином

Након успостављања "steady state"-а и базалних вредности изолованог препарата, одређивана је примарна кумулативна "концентрација-одговор" кривуља (*cumulative concentration-response curve*) на ацетилхолин тако што је ткиво третирано растућим концентрацијама ацетилхолина без испирања ткива, (употребљене концентрације: од 10⁻⁷M/L до 10⁻²M/L). У следећих 60 минута ткиво је испирано сваких 15 минута. Након поновног успостављања "steady state"-а и базалних вредности активне тензије глатког мишића, ткиво је инкубирано верапамилом концентрације 10⁻⁵ M/L у трајању од 1 минуте, а затим је одређивана секундарна кумулативна кривуља концентрација-одговор на растуће концентрације ацетилхолина. Кумулативна "концентрација-одговор" - кривуља и након инкубације трахеалног ткива верапамилом од 10⁻⁴ M/L (слика 1).

Б. Ефект верапамила на контракцију глатких мишића изоловане трахеје заморчета изазвану хистамином

Након што су после одређене процедуре успостављене базалне вредности и стање "steady-state" активне тензије изолованог препарата трахеје заморца од-

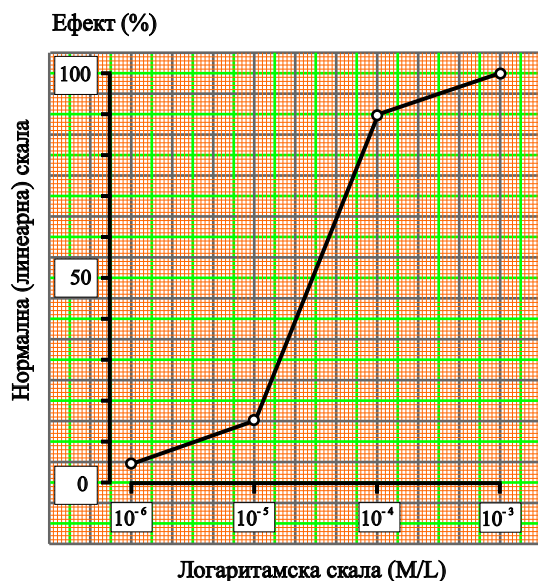


Слика 1. - Кумулативна концентрација-одговор кривуља на контракцију глатких мишића изоловане трахеје заморца на растуће концентрације ацетилхолина (А). На слици Б дат је сигмоидни приказ одговора.

ређивана је кумулативна "концентрација-одговор" кривуља на ацетилхолин тако што је ткиво третирано растућим концентрацијама ацетилхолина, (употребљене концентрације: од 10^{-7} M/L до 10^{-2} M/L). У следећих 60 минута ткиво је испирано сваких 15 минута. Након поновног успостављања "steady state" стања, одређивана је примарна кумулативна "концентрација-одговор" кривуља на хистамин. Након поновног успостављања стационарног стања активне тензије глатког мишића, ткиво је инкубирано верапамилом концентрације 10^{-5} M/L у трајању од 1 минуте, а затим је одређивана секундарна кумулативна кривуља концентрација-одговор на растуће концентрације хистамина. Кумулативна "концентрација-одговор" кривуља је урађена и након инкубирања трахеалног ткива са верапамилом од 10^{-4} M/L.

Презентација постигнутог ефекта

За одређивање постигнутог ефекта одређених супстанци на глатке мишиће изоловане трахеје експерименталних животиња, коришћен је кординатни систем, представљен ординатом и апсцисом. Ордината је представљена линеарном скалом и на њој су бележене вредности ефекта изражених у mm. Максимални ефект (100% ефекта) представљен је дужином скале од 100 mm и израчунаван је пропорцијом. Вредности примењене концентрације наносене су на апсцису која представља логаритамску скалу тако да разлика логаритма за број 10 је обухватила интервал од 30mm (слика 2)(28).



Слика 2. - Кумулативна концентрација-одговор кривуља глатких мишића изоловане трахеје експерименталних животиња на растуће концентрације ацетилхолина.

Одређивање афинитета агониста према рецепторима (pD_2 вредност)

Афинитет лека према рецепторима је повезан са негативним логаритмом концентрације која продукује 50% максималног ефекта. Ова величина се означава као pD_2 вредност.

$$pD_2 = -\log A_{50} (EC_{50})$$

где је A_{50} концентрација која продукује 50% ефекта при чему је однос максималног ефекта и дотичног ефекта неког лека раван броју 2 ($E_{Am}/E_A = 2$). Када је однос између стимулуса и ефекта линеаран тада је pD_2 директна вредност логаритма афинитета, а уколико су релације нелинеарне тада је pD_2 вредност емпиријска величина. pD_2 вредност је тада боља мера за активност него за утврђивање еквивалентне концентрације. pD_2 вредност изражена у тежинским јединицама није једнака половини у односу на вредност која изазива 100% ефект, што није случај ако се изрази у моларним вредностима.

pD_2 вредност се може израчунати и формулом

$$pD_2 = q - \log A$$

(q = логаритам моларне концентрације за максимални одговор агониста, A = растојање у mm за ефект од 50%).

EC_{50} (или ED_{50}) може да се одреди и врло сложеном статистичком техником означеном као пробит анализа. EC_{50} се одређује након трансформације сигмоидне кривуље у одговарајућу функцију праволинијске регресије процента. У овом случају ефект лека који је изражен у процентима (Y-оса) конвертује се у јединице пробита (чије се вредности налазе у публикованим таблицама), док се на X-оси уписују логаритамске вредности за концентрацију или дозу. На основу пробит вредности и вредности концентрације поступком регресионе анализе добија се регресиона права из које се може да добије вредност одговарајуће концентрације или дозе, за жељени % ефекта. (29-31)

Одређивање афинитета некомпетитивног антагониста (pD_2' вредност)

pD_2' вредност представља негативни логаритам моларне концентрације некомпетитивног антагониста који проузрокује депресију максималног ефекта агониста на 50%. Уколико је однос између стимулуса и ефекта линеаран pD_2' вредност једнака је афинитету некомпетитивног антагониста. У противном, за нелинеарне односе, корекције мора да постоје. За прорачунавање pD_2' вредности користимо се следећом формулом:

$$pD_2' = pD_2 + \log(x-1)$$

pD_2' = $p - \log B$ а добијен је из моларне концентрације антагониста ($B \times 10^{-p}$). У другом делу десне стране једначине x представља вредност добијену из односа максималног ефекта (изражен у %) агониста датог као сам (у одсуству некомпетитивног антагониста) и максималног ефекта дотичног агониста у присуству некомпетитивног антагониста ($x = E_{Am}/E_{AmB}$). Уколико је тај однос једнак броју 2 онда је депресија једнака 50% у односу на максимални ефект, и тада је добијена pD_2' вредност једнака логаритму афинитета некомпетитивног антагониста. Иначе, логаритам израчунате x вредности за одговарајући процент депресије се прочита као лог ($x-1$) из публикованих таблица. pD_2' вредност се увек изражава у односу на референтни агонист.

Употребљаване супстанце. За извођење експеримената користили смо следеће супстанце: а) *acetylcholine chloride* (SIGMA). Серија употребљаваних рас-

твору кретала се од 1.0×10^{-7} - 1.0×10^{-2} M/L; b) *histamine dihydrochloride* (SIGMA). Серија употребљаваних раствора кретала се од 1.0×10^{-8} - 1.0×10^{-2} M/L; c) *verapamil* (Isoptin, inj. 5 mg/2 ml, Lekljubljana). Верапамил је употребљен у концентрацијама 1.0×10^{-5} и 1.0×10^{-4} M/L.

Анализа и статистичка обрада добијених резултата

Нагиб линеарне регресије са стандардном погрешком прогнозе и коефицијент линеарне корелације (r) са њеном значајношћу прорачунати су из концентрација-одговор кривуља за агонист дат као сам или са различитим концентрацијама антагониста. Пробит анализом уз помоћ провизорне пробит праве утврђена је ефективна концентрација (EC_{50}) агонисте датог као сам или са различитим концентрацијама антагонисте.

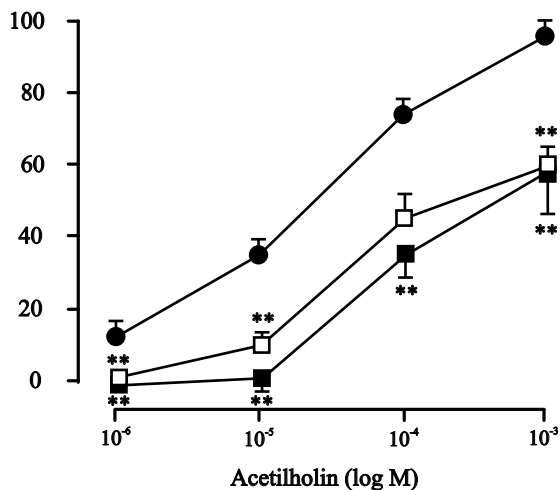
За утврђивање статистички сигнификантне разлике ефекта између агониста самог или у присуству различитих антагониста користили смо се Студентовим Т-тестом. Разлика је сигнификантна за ниво вероватноће $p < 0.05$.

РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

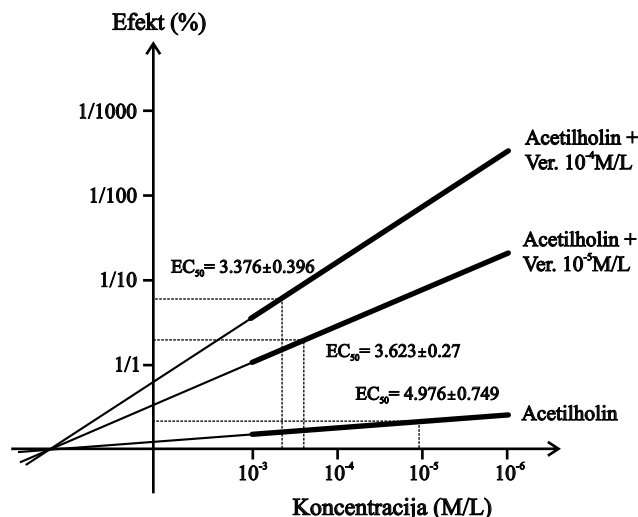
А. Ефект верапамила на одговор активне тензије изоловане трахеје изазван ацетилхолином

Ацетилхолин у концентрацијама 10^{-6} M до 10^{-3} M је проузроковао концентрација-зависну контракцију глатког мишића трахеје заморчета (нагиб 29.166 ± 6.55 ,

% Maksimalnog odgovora



Графикон 1. - Ефект верапамила на контракцију глатког мишића изоловане трахеје заморчета изазвану ацетилхолином. Свака од кривуља приказује резултате добијених у пет животиња. Претходна инкубација верапамилем (10^{-5} M, 1 минут - празни квадрати и 10^{-4} M, 1 минут - пуни квадрати) проузроковала је значајно смањење контрактилног одговора изоловане трахеје изазван ацетилхолином (** - $p < 0.01$). Подаци ($X = S.E.M.$) су изражени као проценат максималног одговора на ацетилхолин (10^{-3} M).



Графикон 1а. - Кривуље концентрација-одговор (двоструко инверзни приказ према Goldsteinu и Lineweaver-Burku) ацетилхолина без и у присуству различитих концентрација верапамила (10^{-5} M и 10^{-4} M, $n=5$). Правци се не секу у истој тачки на ординати већ на апсиси, као и то да у присуству некомпетитивног антагонисте правац агонисте постаје стрмији.

$r=0.99$, $p < 0.01$). Претходна инкубација изоловане трахеје верапамилем (1 минут) у концентрацији 10^{-5} M значајно је смањила контракцију изазвану ацетилхолином (нагиб 21.49 ± 9.63 , $r=0.97$, $p < 0.05$) (Графикон 1.). Концентрација верапамила 10^{-4} M проузроковала је такође сигнификантан пад контракције (нагиб 21.3 ± 2.63 , $r=0.95$, $p < 0.05$).

pD_2 вредност израчуната помоћу формуле $pD_2 = q - \log A$ за ацетилхолин за ову експерименталну групу износи 4.66 ($pD_2=4.66$). Пробит анализом очекивана EC_{50} за ацетилхолин износила би 4.976 ± 0.749 ($EC_{50}=4.976 \pm 0.749$)

pD_2' вредност израчуната помоћу формуле $pD_2' = pD_x + \log(x-1)$ за употребљене концентрације верапамила (10^{-5} M и 10^{-4} M) у односу на ацетилхолин износи 4.29 ($pD_2'=4.29$). Очекивана EC_{50} за ацетилхолин у присуству верапамила концентрације 10^{-5} M износи 3.623 ± 0.27 , док за употребљену концентрацију 10^{-4} M износи 3.376 ± 0.396 .

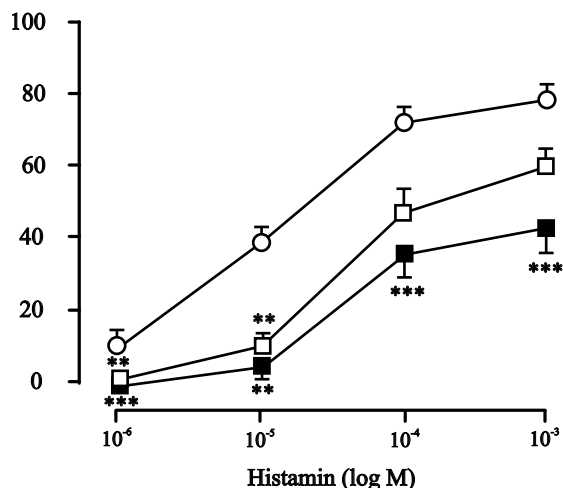
У двоструко инверзном начину приказивања (Графикон 1а) правци се секу на апсиси, што указује да је верапамил некомпетитивни антагонист ацетилхолину.

Б. Ефект верапамила на одговор активне тензије изоловане трахеје изазван хистамином

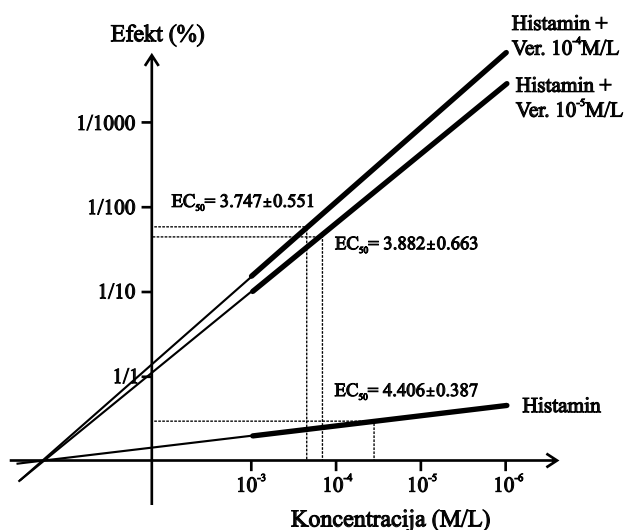
Хистамин у концентрацијама 10^{-6} M до 10^{-3} M је проузроковао концентрација-зависну контракцију глатког мишића трахеје (нагиб $21,86 \pm 7.74$, $r=0.98$, $p < 0.05$). Верапамил у концентрацији 10^{-5} M сигнификантно смањује одговор изоловане трахеје изазван хистамином у концентрацијама 10^{-6} M и 10^{-5} M (нагиб 21.3 ± 10.6 , $r=0.96$, $p < 0.05$) (Графикон 2.). Концентрација верапамила 10^{-4} M сигнификантно је смањила контракцију глатких ми-

пића изоловане трахеје изазвану хистамином (нагиб 15.46 ± 10.47 , $r=0.94$, $p<0.05$).

Aktivna tenzija
% Ach $10^{-3}M$



Графикон 2. - Ефект верапамил на контракцију глатког мишића изоловане трахеје заморчета изазвану хистамином. Свака од кривуља приказује резултате добијених у пет животиња. Претходна инкубација верапамилем ($10^{-5} M$, 1 минут - празни квадрати и $10^{-4} M$, 1 минут - пуни квадрати) проузроковала је значајно смањење контрактилног одговора изоловане трахеје изазваног хистамином (** - $p<0.01$, *** - $p<0.001$). Резултати истраживања ($X=S.E.M.$) су изражени као проценат максималног одговора на ацетилхолин ($10^{-3} M$).



Графикон 2а. - Кривуље концентрација-одговор (двоструко инверзни приказ према Goldsteinu и Lineweaver-Burku) хистамин и хистамин у присуству различитих концентрација верапамилем ($10^{-5} M$ и $10^{-4} M$, $n=5$). Правци се не секу у истој тачки на ординати већ на апсциси, као и то да у присуству некомпетитивног антагониста правац агониста постаје стрмији.

pD_2 (ацетилхолин) = 4.73; pD_2 (хистамин) = 4.66. Пробит анализом очекивана EC_{50} (хистамин) = 4.406 ± 0.387 .

pD_2' (верапамил у односу на хистамин) = 4.31. Пробит анализом очекивана EC_{50} за хистамин за концентрацију верапамилем $10^{-5} = 3.822 \pm 0.663$, док за концентрацију верапамилем $10^{-4} = 3.747 \pm 0.551$.

Према двоструко инверзном приказу (Графикон 2а) уочавамо да је верапамил некомпетитивни антагонист хистамином.

ДИСКУСИЈА

Бронхоконстрикција као комплексан проблем, још дуго времена ће бити актуелан. Многи су покушаји да се овом проблему приступи са што адекватнијег аспекта, како би терапијска решења опструктивних обољења плућа била што оптималнија и поузданија.

Експериментална испитивања у *in vitro* условима свакако да претствљају један од поступака за карактеризацију испитиваних супстанци. Глатки мишић трахеје заморчета показује сличне биолошке карактеристике са глатким мишићем трахеобронхијалног стабла човека те представља погодан модел органа за фармакологију и патофизиологију испитивања распирачног тракта.

С обзиром да су многе патофизиолошке промене у болесника с бронхијалном астмом - као што је контракција глатке мускулатуре у дисајним путевима, секреција мукуса, ослобађање медијатора из мастоцита и неуротрансмисија - калцијум-зависни процеси, то је вероватно предпоставити да калцијум може имати значајну улогу у патогенези бронхијалне астме. Многи истраживачи су сугерисали да у астматичара основни проблем највероватније лежи у поремећајима механизма функције јона калцијума.

Ефект верапамил на одговор активне тензије изоловане трахеје изазван ацетилхолином.

Резултати у овој студији указују да је одговор активне тензије изоловане трахеје изазван ацетилхолином значајно смањен у односу на контролне вредности када је ткиво инкубирано верапамилем ($10^{-5} M$ и $10^{-4} M$). Контракција глатког мишића зависна је од концентрације калцијума у саркоплазми. Порекло калцијума неопходног за контракцију је двоструко, било да је у питању Кребсов медијум (екстрацелуларни простор) или да води порекло из саркоплазматског ретикулума, митохондрија или других места депоновања (интрацелуларни простор). Агонисти као што су ацетилхолин и њему сродне супстанце (карбахол, мускарин), остварују своје контрактилне ефекте који су према неким ауторима независни од екстрацелуларног калцијума. Black и сар. су истраживали ефект верапамилем (концентрације 10^{-6} , 10^{-5} и $10^{-4} M$) на контракцију изолованог бронха човека изазван хистамином, карбахолом или калцијум хлоридом. Ефект верапамилем се испољавао у смањењу контрактилног одговора на хистамин и KCl који је био зависан од концентрације употребљеног агониста. Међутим, верапамил није показивао значајан ефект на ак-

тивну тензију узроковану карбахолом. У Кребс-Хенслеитовом раствору, коме је уместо калцијума хлорида додат EDTA (етилендиаминотетраацетат) (10^{-3} M) контракције глатког мишића трахеје заморчета изазване карбахолом скоро и да није било, док је контракција са KCl-ом значајно смањена у односу на контролне вредности. (32-35)

Постоје радови који говоре да верапамил у концентрацијама 10^{-5} M до 10^{-4} M у *in vitro* условима редукује контракцију трахеалног мишића пацова изазвану метахолином. (36)

Исти аутори су испитивали ефекте верапамила (конц. 10^{-5} - 3×10^{-5} M) на везивање радиолиганда - (3H) QNB, за мускаринске рецепторе на мембрани говеђег трахеалног мишића. Поменута концентрација верапамила није инхибирала везивање радиолиганда као ни ефекте метахолина. Верапамил у вишим концентрацијама (3×10^{-4} M и више) није утицао на величину везивања (3H)QNB, већ је испољавао ефект у смислу смањења афинитета истог за ацетилхолинске рецепторе мускаринског типа. Овај ефект верапамила иде у прилог његовог инхибиторног ефекту на контрактилне одговоре глатких мишића ваздушних путева изазване мускаринским агонистима. (37)

Ефект верапамила на одговор активне тензије изоловане трахеје изазван хистамином.

Резултати изложени у овој студији указују на значајно смањење контракције глатког мишића трахеје заморчета изазване хистамином након што је ткиво у Krebs-Henseleit-ом раствору инкубирано верапамилом (10^{-5} M, 10^{-4} M). Верапамил као антагонист волтажа-зависних калцијумских канала (L-типа) везује се за исти док је у стању мировања.

Употребом агониста волтажа-зависних канала (BAУ K8644) потенцира се ефект оних агониста који свој ефект уласка калцијума остварују преко волтажа-зависних канала. Према Marthan-у и сар. хистамин и KCl остварују улазак калцијума преко волтажно-зависних канала. (38-40)

У Krebs-Henseleit-овом раствору коме је уместо калцијума додат EDTA концентрације 10^{-3} M контракције глатког мишића трахеје заморца изазване хистамином су скоро уклоњене.

Употребом супстанце TMB8 (антагонист интрацелуларног калцијума) у концентрацији 10^{-4} M узрокује се незнатан али сигнификантан пад контракције глатког мишића трахеје заморца. Овај податак наговештава чињеницу да хистамин, осим што користи екстрацелуларни калцијум, користи и интрацелуларни калцијум.

Наши резултати су у сагласности са резултатима већине аутора који су такође добили концентрација-зависну инхибицију контракције глатког мишића трахеје заморчета након третирања ткива у *in vitro* условима са верапамилом.

Према томе, постоје многе студије истраживања ефекта антагониста калцијума (верапамил, нифедипин) на бронхоконстрикцију изазвану бронхоконстрик-

тивним супстанцама, изведена на експерименталним животињама или болесницима с бронхијалном астмом. Међутим, постоје многе разлике у добијеним резултатима које су највероватније узроковане разликама у методологијама експерименталних протокола. У току испитивања ефекта инхибиторних супстанци посебан проблем представљају употребљаване концентрације. Врло је важан податак при којим се концентрацијама добија инхибиторни ефект, и да ли је ефективна концентрација компатибилна са концентрацијама које би постизавале корисне ефекте у жељеном компартману, што је такође у спречи са фармакокинетским карактеристикама дотичне супстанце а у циљу избегавања нежељених ефеката на другим органима живог бића.

Извор калцијумових јона за контракцију различит је у зависности од типа мишићног ткива. У скелетним мишићима, контракција зависи од калцијума који је сториран у саркоплазматском ретикулуму, према томе контракција је независна од екстрацелуларног калцијума. Супротно њима, контракција глатке мускулатуре крвних судова је веома зависна од екстрацелуларног калцијума који улази у саму ћелију преко волтажно-зависних канала, и тиме је контракција веома осетљива на блокаторе калцијумових канала. Међутим, досадашња истраживања указују да је контракција глатке мускулатуре у дисајним путевима зависна како од интрацелуларног тако и од екстрацелуларног калцијума. У експериментима изведеним на псима верапамил је био веома ефикасан у инхибицији контракција узрокованим серотонином и калцијум хлоридом, међутим инхибиција је била мање ефикасна у контракцији изазваној са ацетилхолином. Инхибиција бронхоконстрикције изазвана ниским концентрацијама ацетилхолина била је снажнија у поређењу са контракцијом узрокованом високим концентрацијама. Ово нам указује да антагонисти калцијумових канала могу деловати против одређених бронхоконстрикторних стимулуса док против других слабије. У експерименталним истраживањима на изолованим органима експерименталних животиња и човека, у *in vitro* условима, антагонисти калцијума редукују ефекте више спазмогених супстанци на глатке мишиће дисајних путева. Међутим на основу експерименталних и клиничких истраживања сигурно је да су блокатори калцијума мање ефикасни на контракцију глатке мускулатуре у дисајним путевима него на глатку мускулатуру у крвним судовима и утерусу. Разлог мањој потенцији блокатора калцијума у дисајним путевима највероватније лежи у томе да се улаз калцијума у мишићне ћелије већим делом одвија преко рецептор-зависних канала а мањим делом преко волтажа-зависних канала.

Међутим у овој студији експерименталних истраживања на изолованој трахеји заморчета, верапамил је проузроковао значајну инхибицију контракције изазвану ацетилхолином и хистамином. У *in vitro* условима на експерименталним животињама ефекат блокатора калцијума је био ефикаснији у отклањању контракције изазване једном од бронхоконстрикторних супстанци (хистамин, ацетилхолин), док је ефект блокатора калцијумских канала био слабији у превенцији бронхоконстрикције. Слични резултати су нађени у студији хи-

стамин-индуковане бронхоконстрикције изведене на људима, када је инхалирани нифедипин ефективно отклонио бронхоспазам али је имао слабији ефект када је био администриран пре провокације с хистаминам. Ово нас наводи на мисао да одржавање тонуса дисајних путева углавном ангажује улаз калцијума преко волтажно-зависних канала, међутим иницијација контракције углавном започиње улазом калцијума каналима који су рецептор-зависни.

ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата истраживања на експерименталним животињама у *in vitro* условима, на изолованим трахејама заморчића, могу се извести следећи закључци:

1) Кумулативна концентрација-одговор кривуља активне тезије изоловане трахеје на ацетилхолин је значајно смањена уколико је ткиво претходно инкубирано са верапамиллом,

2) Смањење одговора трахеалних глатких мишића на ацетилхолин је у позитивној корелацији са растућим концентрацијама верапамила,

3) Концентрација-одговор кривуља активне тензије изолованог ткива трахеје на хистамин је значајно смањена уколико је ткиво претходно инкубирано са верапамиллом,

4) Смањење одговора активне тензије трахеје на хистамин је у директној корелацији са растућим концентрацијама верапамила,

5) Ацетилхолин и хистамин показују сличне вредности у афинитету (изражено моларном концентрацијом) за специфичне рецепторе на глатком мишићу трахеје заморчета.

6) Верапамил као некомпетитивни антагонист ацетилхолину и хистамину показује нешто слабији или сличан афинитет за специфичне рецепторе на глатком мишићу трахеје заморца у односу на поменуте агонисте.

ЛИТЕРАТУРА

- Djokić T.D.: The role of enkephalinase (neutral endopeptidase) in neurogenic inflammation of the respiratory tract. *Glas Srp Akad Nauka*. 1992;(42):107-21.
- Đokić T.D., Dusser D.J., Borson D.B., Nadel J.A.: Neutral endopeptidase modulates neurotensin-induced airway contraction. *J Appl Physiol*. 1989 May;66(5):2338-43.
- Đokić T.D., Nadel J.A., Dusser D.J., Sekizawa K., Graf P.D., Borson D.B.: Inhibitors of neutral endopeptidase potentiate electrically and capsaicin-induced noncholinergic contraction in guinea pig bronchi. *J Pharmacol Exp Ther*. 1989 Jan; 248(1):7-11.
- Ishii T, Shimo Y.: Cooling-induced subsensitivity to carbachol in the tracheal smooth muscle of the guinea-pig. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1986 Mar;332(3):219-23.
- Haxhiu M.A., Jakupi M., Dreshaj I.A., Đokić T.D., Ahmetaj H.: The effect of Ca²⁺ blockers on the response of respiratory tract smooth muscle to bronchoconstrictor and bronchodilator agents. *Plucne Bolesti*. 1988 Jan-Jun;40(1-2):3-8.
- Mirić M., Mandura I., Haxhiu M.A.: Comparative study of the effects of physical exertion on resistance in the lower respiratory tract and nasal resistance in patients with bronchial asthma. *Plucne Bolesti*. 1987 Jan-Jun;39(1-2):21-4.
- Perpiñá M, Cortijo J, Sanz C, Esplugues J, Morcillo EJ. Active sensitization discriminates between groups of calcium antagonists in lung parenchyma strips. *Bull Eur Physiopathol Respir*. 1987 May-Jun;23(3):255-60.
- Perpiñá M, Cortijo J, Esplugues J, Morcillo EJ.: Different ability of verapamil to inhibit agonist-induced contraction of lung parenchymal strips from control and sensitized guinea pigs. *Respiration*. 1986;50(3):174-84.
- De Diego A, Cortijo J, Villagrana V, Perpiñá M, Esplugues J, Morcillo EJ.: Effects of phorbol 12,13-diacetate and its influence on spasmogenic responses in normal and sensitized guinea-pig trachea. *J Pharm Pharmacol*. 1995 Sep; 47(9): 750-6.
- Orón JD, Cortijo J, Perpiñá M, Morcillo EJ.: Effects of alkyl-xanthenes on contractility of diaphragm fibres isolated from normal and sensitized guinea-pigs. *J Pharm Pharmacol*. 1993 Dec;45(12):1060-6.
- Cortijo J, Sarriá B, Pedrós C, Perpiñá M, Paris F, Morcillo E.: The relaxant effects of cromakalim (BRL 34915) on human isolated airway smooth muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1992 Oct;346(4):462-8.
- Ortiz JL, Cortijo J, Morcillo EJ, Sanz C, Perpiñá M, Esplugues J.: The spasmogenic effect of caffeine in trachealis isolated from control and actively sensitized guinea-pigs. *Eur J Pharmacol*. 1988 Dec 13;158(3):243-9.
- Cortijo J, Perpiñá M, Esplugues J, Morcillo EJ.: Pharmacological characterization of the effects of verapamil and nifedipine on isolated guinea-pig lung parenchymal strip. *Gen Pharmacol*. 1986;17(2):211-7.
- Patel KR, Al Shama MR, Kerr JW.: The effect of inhaled verapamil on allergen-induced bronchoconstriction. *Clin Allergy*. 1983 Mar;13(2):119-22.
- Lee VY, Hughes JM, Seale JP, Temple DM.: Verapamil inhibits mediator release from human lung in vitro. *Thorax*. 1983 May;38(5):386-7.
- Patel KR, Kerr JW.: Calcium antagonists in experimental asthma. *Clin Allergy*. 1982 Oct;12 Suppl:15-20.
- Patel KR, Tullett WM.: Comparison of two calcium antagonists, verapamil and gallopamil (D-600), in exercise-induced asthma. *Eur J Respir Dis*. 1985 Oct;67(4):269-71.
- Popa VT, Somani P, Simon V.: The effect of inhaled verapamil on resting bronchial tone and airway contractions induced by histamine and acetylcholine in normal and asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis*. 1984;130(6):1006-13.
- Ahmetaj H., Jakupi M., Daka H., Đokić T., Haxhiu M.A.: Effect of verapamil on response of airway smooth muscle to acetylcholine and leucotriene C4. *Period. Biol.*, 1986; 88, supp. 1, P 187-188.
- Fish JE, Norman PS.: Effects of the calcium channel blocker, verapamil, on asthmatic airway responses to muscarinic, histaminergic, and allergenic stimuli. *Am Rev Respir Dis*. 1986 May;133(5):730-4.
- Walters EH, Banks J, Fennerty A, Davies BH.: Effects of calcium channel blockade on histamine induced bronchoconstriction in mild asthma. *Thorax*. 1984 Aug;39(8):572-5.
- Walters EH, Walters JA, Wood-Baker R.: Why have asthma action plans failed the consumer test? *Med J Aust*. 2003 May 19;178(10):477-8.
- Walters EH, Walters JA, Gibson PW.: Regular treatment with long acting beta agonists versus daily regular treatment with short acting beta agonists in adults and children with stable asthma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002;(4):CD003901.
- Walters EH, Walters JA, Wood-Baker R.: Anti-IgE and chemotherapy: a critical appraisal of treatment options for severe asthma. *Expert Opin Pharmacother*. 2007 Apr;8(5):585-92.
- Walters EH, Walters JA, Gibson MD.: Inhaled long acting beta agonists for stable chronic asthma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003;(4):CD001385.

26. Boner A.L., Vallone G., Andreoli A., Biancotto R., Warner J.O.: Nebulised sodium cromoglycate and verapamil in methacholine induced asthma. *Arch Dis Childm* 1987; 62(3); P 264-8
27. Boner A.L., Sette L., De Stefano G.: Effects of different dosages of the calcium antagonist verapamil in exercise and methacholine induced bronchospasm in children with chronic asthma. *J Asthma*; 1987; 24(2); P 81-9
28. Van Rossum J.M.: Cumulative dose-response curves (II. Technique for the making of dose response curves in isolated organs and evaluation of drug parameters), *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1963; 143, No 3-4, 299-329.
29. Milošević B.: Probit analiza. U: Statistika u medicinskom naučnoistraživačkom radu, Institut za stručno usavršavanje i specijalizaciju zdravstvenih radnika Beograd, Beograd, 600-630, 1976.
30. Mitić R.: Efekt i interakcija verapamila i diazepama na trahealni odgovor izazvan histaminom i acetilholinom, Medicinski fakultet Priština, Magistarski rad, 1994.
31. Mitić R.: Određivanje efektivne koncentracije (EC50) ili doze (ED50). In: V. Jakovljević. Eksperimentalna farmakologija, Novi Sad, str. 15-17, 2006.
32. Black J., Armour C., Johnson P., Vincenc K.: The calcium dependence of histamine, carbachol and potassiumchloride induced contraction in human airways in vitro. *Eur J Pharmacol.* 1986; 17; 125(2); P 159-68.
33. Black L, Henderson AC, Atileh H, Israel E, Ingenito EP, Lutchen KR. Relating maximum airway dilation and subsequent reconstruction to reactivity in human lungs. *J Appl Physiol* 2004;96:1808-1814.
34. Ammit AJ, Armour CL, Black JL. Smooth-muscle myosin light-chain kinase content is increased in human sensitized airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:257-263.
35. Borger P, Tamm M, Black JL, Roth M. Asthma? Is it due to an abnormal airway smooth muscle cell. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:367-372.
36. Cheng JB, Bewtra AJ, Townley RG.: Comparison of the effects of verapamil and nifedipine on airway muscarinic reactivity and receptors. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1985 Jan; 273(1):47-61.
37. Cheng JB, Townley RG.: Decreased sensitivity and response of isolated tracheal muscle to methacholine and histamine without changing the activity of pulmonary muscarinic receptors in the egg albumin-sensitized guinea pig. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1983;72(4):303-9.
38. Marthan R, Savineau JP, Mironneau J.: Acetylcholine-induced contraction in human isolated bronchial smooth muscle: role of an intracellular calcium store. *Respir Physiol.* 1987 Feb; 067(2):127-35.
39. Marthan R, Armour CL, Johnson PR, Black JL.: The calcium channel agonist BAY K8644 enhances the responsiveness of human airway muscle to KCl and histamine but not to carbachol. *Am Rev Respir Dis.* 1987 Jan; 135(1):185-9.
40. Marthan R.: Store-operated calcium entry and intracellular calcium release channels in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004 May; 286(5):L907-8.