

VAZODILATACIJSKI EFEKTI DIAZEPAMA NA HUMANIM UMBILIKALNIM I MEZENTERIČNIM ARTERIJAMA: IN VITRO EKSPERIMENTALNA STUDIJA

Autor: ĐORĐE PILIPOVIĆ, Jovana Škeljić, Lejla Tica

e-mail: djordje.pilipovic@student.med.unibl.org

Mentor: doc. dr Milica Gajić Bojić

Centar za biomedicinska istraživanja

Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci

Uvod: Benzodiazepini, prvenstveno poznati po centralnim efektima, sve više se povezuju i sa direktnim djelovanjem na periferni vaskularni tonus. Iako su eksperimentalna istraživanja na životinjskim modelima pokazala da diazepam može indukovati CNS-nezavisnu vazorelaksaciju, podaci o efektima na humanim krvnim sudovima su ograničeni.

Cilj: Svrha ovog istraživanja je ispitivanje uticaja diazepama na tonus humanih umbilikalnih i mezenteričnih arterija.

Materijal i metode: Osnovna metoda procjene vaskularnog odgovora bila je primjena kupatila za rad sa izolovanim tkivima. Uzorkovane su humane umbilikalne arterije (HUA) od zdravih trudnica nakon elektivnog carskog reza i humane mezenterične arterije (HMA) od pacijenata podvrgnutih elektivnim intestinalnim operacijama. Iz izolovanog tkiva pripremljeni su segmenti HUA i HMA dužine 3–4 mm i postavljeni u komore kupatila. Viabilnost preparata je potvrđena kontrakcijom izazvanom kalijum-hloridom (KCl-om) pri koncentraciji od 6×10^{-2} M. HUA su potom prekontrahovane serotoninom (10^{-10} – 10^{-4} M) a HMA fenilefrinom (10^{-8} – $10^{-4,5}$ M). Diazepam je kumulativno doziran do postizanja željenih koncentracija (10^{-8} – 10^{-4} M). Vazokonstrikcija arterija izazvana serotoninom i fenilefrinom je izražena procentualno u odnosu na maksimalnu KCl-om izazvanu kontrakciju a vazorelaksacija arterija izazvana diazepamom kao procenat u odnosu na maksimalnu prekontrakciju.

Rezultati: Serotonin je izazvao koncentraciono-zavisnu vazokonstrikciju HUA, koja je pri koncentraciji od 10^{-4} M iznosila ~225% kontrakcije izazvane KCl-om. Fenilefrin je izazvao koncentraciono-zavisnu vazokonstrikciju HMA, koja je pri koncentraciji od $10^{-4,5}$ M iznosila ~250% kontrakcije izazvane KCl-om. Diazepam je kod oba tipa arterija izazvao koncentraciono-zavisnu vazorelaksaciju: ~96% za HUA i ~89% za HMA pri koncentraciji od 10^{-4} M.

Zaključak: Rezultati pokazuju da diazepam izaziva snažnu, koncentraciono-zavisnu vazorelaksaciju na izolovanim, prekontrahovanim humanim umbilikalnim i mezenteričnim arterijama, što potvrđuje postojanje njegovog perifernog efekta.

Gljučne riječi: diazepam, vazokonstrikcija, vazorelaksacija, humana umbilikalna arterija, humana mezenterična arterija, kupatilo za izolovana tkiva.

UVOD

Benzodiazepini su lijekovi koji primarno utiču na centralni nervni sistem (CNS) odnosno spadaju u grupu sedativa-hipnotika. Ovi lijekovi se u današnje vrijeme nalaze u širokoj upotrebi a najčešće se koriste zbog svog dokazanog anksiolitičkog, sedativnog, antikonvulzivnog i mišićno-relaksantnog dejstva. Među lijekovima ove grupe, diazepam je jedan

od najduže korištenih i najviše proučavanih predstavnika. Diazepam, kao i ostali benzo-diazepini, djeluju na CNS modulacijom GABA_A receptora odnosno ovi lijekovi olakšavaju i potenciraju GABA-inhibitornu neurohumoralnu transmisiju u CNS-u. Dokazano je da se GABA sintetise u presinaptičkom nervnom završetku čijom depolarizacijom dolazi do egzocitoze iste te vezanja za postsinaptičke receptore, aktivacijom receptora dolazi do otvaranja hloridnih kanala, što omogućava ulazak hloridnih jona i hiperpolarizaciju membrane [1][2].

Iako su centralni efekti diazepama dobro poznati, sve veći broj studija ukazuje na postojanje i perifernih efekata, uključujući direktno djelovanje na vaskularni glatki mišić, koji nisu posredovani centralnim mehanizmima. Novija istraživanja na izolovanim aortama pacova i drugim modelima sugerisu da diazepam može indukovati CNS-nezavisnu relaksaciju, potencijalno posredovanu preko vaskularnih GABA_A receptora ili translokator proteina (TSPO), što upućuje na moguće direktne periferne mehanizme dejstva ovog lijeka [3].

Do danas su rađene mnoge studije, međutim efekti diazepama na ljudske periferne krvne sudove još uvijek nisu dovoljno istraženi, posebno kada je riječ o efektima izvan CNS-a odnosno direktnom djelovanju na glatki mišić arterija. U ovom eksperimentu su korištene izolovane humane umbilikalne i mezenterične arterije koje su izabrane prvenstveno zbog tehničke pogodnosti za *in vitro* ispitivanja metodom kupatila za rad sa izolovanim tkivima. Iako ovi vaskularni segmenti nemaju dokazano specifičan klinički značaj u kontekstu djelovanja diazepama, oni predstavljaju validan model pri pravilno kontrolisanim inkubacionim uslovima za ispitivanje CNS-nezavisnog vaskularnog odgovora arterija [4].

Kupatilo za rad sa izolovanim tkivima je standardna eksperimentalna metoda za mjerenje vaskularne aktivnosti. Ova metoda je od posebnog značaja i ima dugu istoriju upotrebe, posebno u poljima fiziologije i farmakologije. Prvi put je primijenjena kao eksperimentalna metoda od strane Rudolfa Magnusa 1904. godine, nakon toga intenzivnom upotrebom iste Otto Loewi 1936. dobija Nobelovu nagradu za oblast fiziologije ili medicine. Iako se ova metoda koristi više od 100 godina, zbog svoje jednostavnosti i mogućnosti reprodukcije i danas ostaje nezamjenjiva kao *in vitro* metoda ispitivanja vaskularnog odgovora arterijskih modela [5].

U ovom istraživanju ispitani su efekti diazepama na tonus izolovanih humanih umbilikalnih i mezenteričnih arterija u *in vitro* uslovima, upotrebom standardne metode kupatila za izolovana tkiva. Prije dodavanja diazepama, preparati arterija su prekontrahovani različitim agonistima: serotoninom (5-HT) za umbilikalne arterije, zbog njihove poznate osjetljivosti na serotonergičku kontrakciju, te fenilefrinom, selektivnim α_1 -adrenergičkim agonistom, za mezenterične arterije, što predstavlja tipičan model za ispitivanje vaskularne reaktivnosti korištenih tkiva [4].

Cilj istraživanja je da se procijeni efekat diazepama na izolovanim humanim arterijskim preparatima, u ovom slučaju na segmentima umbilikalne i mezenterične arterije, te da se ukaže na potencijalni direktni vazodilatatorni efekat koji ovaj benzodiazepin može imati izvan dobro poznatog dejstva na CNS. Rezultati ovog rada mogu imati značaj u razumijevanju periferne vaskularne aktivnosti diazepama, posebno u kontekstu trudnoće, hirurške anestezije ali i svih stanja sa promjenama u sistemskom ili lokalnom vaskularnom tonusu [6].

MATERIJAL I METODE

Humane umbilikalne arterije (HUA) su izolovane iz pupčane vrpce trudnica nakon elektivno izvedenog carskog reza na Univerzitetском kliničkom centru Republike Srpske

(Banja Luka, Bosna i Hercegovina). Eksperimentalni uzorci su izuzeti samo od zdravih trudnica, čiji porod se desio između 37. i 39. nedelje gestacije, i u najvećem broju slučajeva su bili dužine 10–15 cm. Segmenti pupčane vrpce su odmah nakon uzorkovanja stavljeni u tamne boce sa ohlađenim modifikovanim Krebs-bikarbonatnim rastvorom, uskladišteni na temperaturi 0–4 °C i upotrijebljeni za eksperimentalni ogled u roku 24 časa.

Humane mezenterične arterije (HMA) su izolovane od pacijenata sa Klinike za opštu i abdominalnu hirurgiju Univerzitetskog kliničkog centra Republike Srpske (Banja Luka, Bosna i Hercegovina). Uzorkovani su distalni segmenti gornje mezenterične arterije dužine 2–3 cm prilikom elektivnih operacija intestinalne resekcije ili rekonstrukcije. Arterijski segmenti su odmah nakon uzorkovanja stavljeni u tamne boce sa ohlađenim, modifikovanim Krebs-bikarbonatnim rastvorom, uskladišteni na temperaturi 0–4 °C i upotrijebljeni za eksperimentalni ogled u roku od 24 časa.

Istraživanje je sprovedeno u skladu sa etičkim principima Helsinške deklaracije Svjetske medicinske asocijacije za medicinska istraživanja na ljudima, uključujući istraživanja koja koriste prepoznatljive ljudske materijale ili podatke. Prikupljanje i rukovanje sa uzorcima je odobreno od strane Etičkog odbora Univerzitetskog kliničkog centra Republike Srpske u Banjoj Luci (broj odobrenja: 01-19-515-2/20).

Krebs-bikarbonatni rastvor je korišten u toku eksperimenta za ishranu i inkubaciju HUA i HMA preparata. Rastvor je pripremljen rastvaranjem hemijskih jedinjenja u destilovanoj vodi do postizanja finalnih koncentracija: 118,3 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4 , 1,2 mM MgSO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 2,5 mM CaCl_2 i 11 mM glukoze. pH rastvora je korigovana na vrijednost od 7,4 sa 1 M NaOH. Modifikovani Krebs-bikarbonatni rastvor je korišten za transport, skladištenje i pri resekciji i čišćenju ispitivanih tkiva. U poređenju sa standardnim Krebs-bikarbonatnim rastvorom, modifikovani rastvor sadrži nižu koncentraciju jona kalcijuma (0,16 mM), jer je prethodno utvrđeno da veće koncentracije kalcijuma mogu izazvati ćelijsko oštećenje te dovesti u pitanje viabilnost preparata.

Iz uzorka pupčanika je izdvojena arterija te očišćena od Vartonove pihitije i vezivnog tkiva a zatim isječena na segmente dužine 3–4 mm. Takođe, uzorak mezenterične arterije je očišćen od vezivnog tkiva a zatim isječen na segmente dužine 3–4 mm. Segmenti arterija su postavljeni između dvije žičane kukice, potopljene u komore kupatila za rad sa izolovanim tkivima koje su napunjene sa 10 ml Krebs-bikarbonatnog rastvora koji je kontinuirano obogaćen sa mješavinom gasova od 95% kiseonika/5% ugljen-dioksida i održavan na temperaturi od 37°C. Jedna od žičanih kukica je pri tome povezana sa transducerom (MDE, SN: 20K0910) koji je povezan sa pojačivačem (MDE, SN: 20K0912) za sistem za snimanje (*IsoSys, MDE Research, Budapest, Hungary*). Druga žičana kukica je povezana sa nepomičnom jedinicom koja omogućava nježno podešavanje pasivne tenzije preparata.

Protokol je uključivao ukupno 8 individualno nezavisnih serija za procjenu kontraktilnosti HUA serotoninom i 5 individualno nezavisnih serija za procjenu dejstva diazepama na prekontraheovane segmente HUA. Testiranje vazokonstriktornog odgovora HMA fenilefrinom je vršeno u 9 individualno nezavisnih serija a procjena dejstva diazepama na prekontraheovane segmente HMA je testirana u 3 individualno nezavisne serije.

Prije početka protokola, HUA i HMA su ostavljene 30 minuta da se prilagode uslovima u kupatilu, nakon čega su postepeno dovedene u pasivnu tenziju od 2 g u vremenskom periodu inkubacije od 60 minuta. Tokom perioda inkubacije, svakih 10 minuta je mijenjan Krebs-bikarbonatni rastvor i svaki preparat je u tom periodu proveden kroz dvije probe kontrakcije sa kalijum-hloridom (KCl-om) u koncentraciji od 6×10^{-2} M. Probe KCl-om, osim što su test vazoreaktivnosti odnosno viabilnosti preparata, služe i kao referentna vrijednost za poređenje jačine vazokonstrikcije između KCl-a i serotonina u slučaju umbilikalnih, odnosno KCl-a i fenilefrina u slučaju mezenteričnih arterija.

Vazokonstriktorni potencijal HUA je procijenjen upotrebom serotonina koncentracije 1 $\mu\text{mol/L}$ (5-HT; čistoće $\geq 98\%$) a HMA fenilefrina 1 $\mu\text{mol/L}$ (PE; čistoće $\geq 99\%$). Nakon što

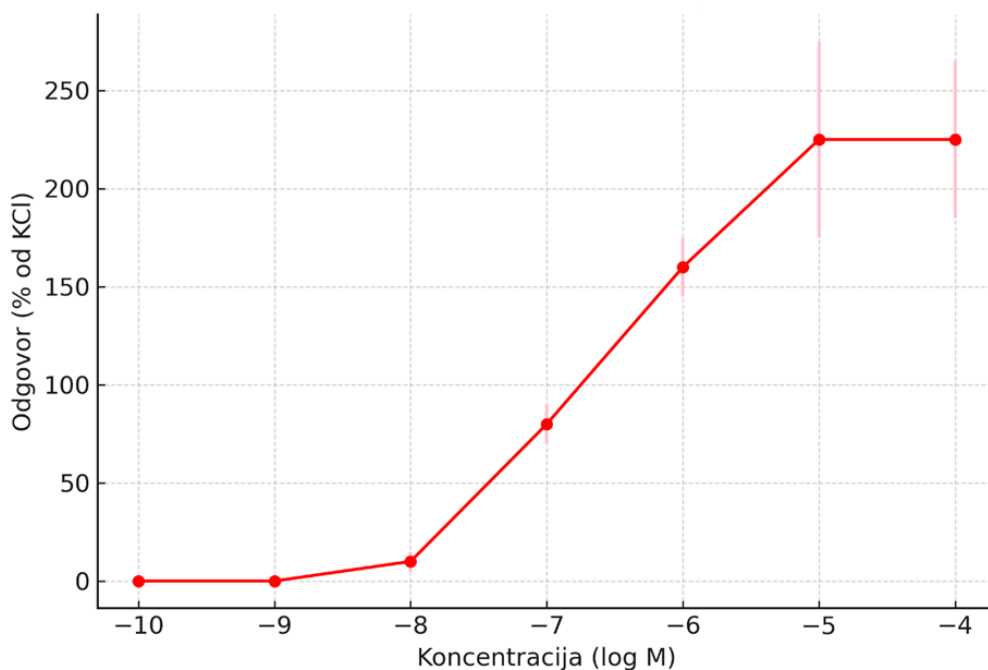
su preparati dostigli plato kontrakcije, u komoru kupatila je postepeno doziran diazepam (čistoće $\geq 99\%$) u svrhu postizanja koncentracija od 0,001 do 100 $\mu\text{mol/L}$.

Efikasnost vazokonstrikcije je izražena u procentima u odnosu na referentne KCl-om indukovane kontrakcije pri probama viabilnosti preparata, dok je efikasnost vazorelaksacije izražena kao procenat u odnosu na maksimalnu serotoninisku i fenilefrinsku prekontrakciju.

REZULTATI

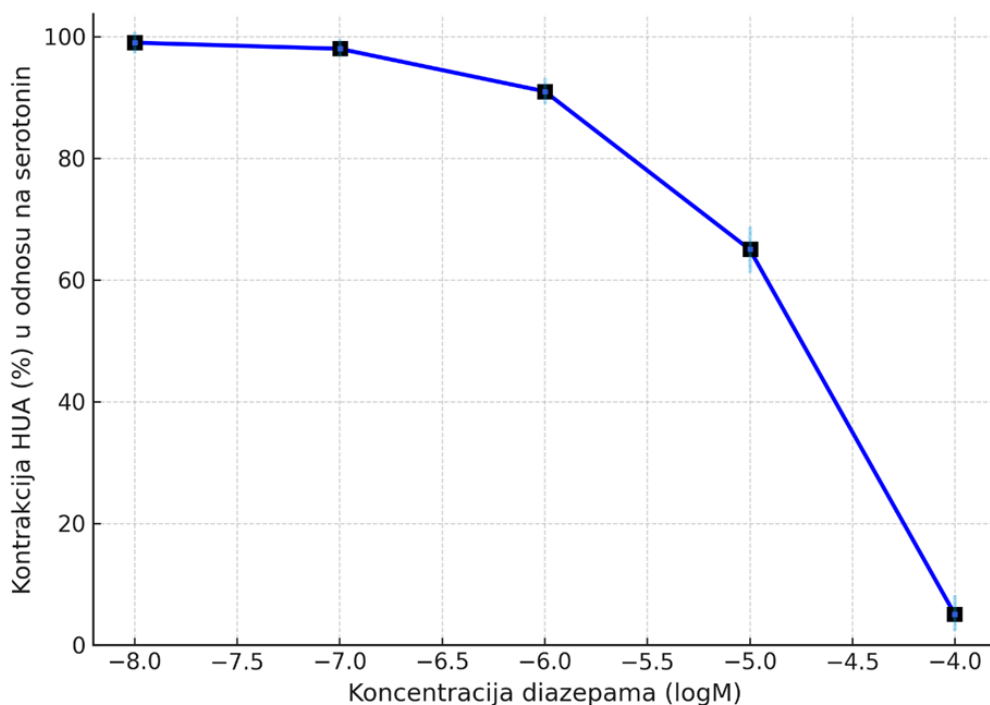
Vaskularni odgovor HUA na serotonin i diazepam

Vazokonstriktorni odgovor preparata HUA na serotonin je testiran u 8 individualno nezavisnih serija ($n = 8$) i pokazao je koncentraciono-zavisnu vazoaktivnost, što vidimo u Grafikonu 1. Dejstvo serotonina na tonus arterija je izraženo kao procenat u odnosu na maksimalno dostignutu kontrakciju pri probama viabilnosti preparata kalijum-hloridom. Serotonin je izazvao zanemarljivu ($< 1\%$) vazokonstrikciju pri koncentraciji manjoj od 10^{-8} M, ali pri dostizanju većih koncentracija serotonina u komorama kupatila, postepeno dolazi do snažnije kontrakcije čiji se vrhunac postiže ($\sim 225\%$ KCl odgovora) pri koncentraciji od 10^{-5} M, koja se održava i pri sljedećoj logaritamskoj koncentraciji od 10^{-4} M serotonina.



Grafikon 1. Kumulativna logaritamska koncentraciono-zavisna kriva dejstva serotonina na izolovane HUA metodom kupatila za izolovana tkiva. Vrijednost vaskularne reakcije (kontrakcije) arterija je predstavljena kao aritmetička sredina u procentima (%) pojedinačnih serija ($n = 8$) a izražena u odnosu na maksimalnu kontrakciju izazvanu probom viabilnosti preparata KCl-om.

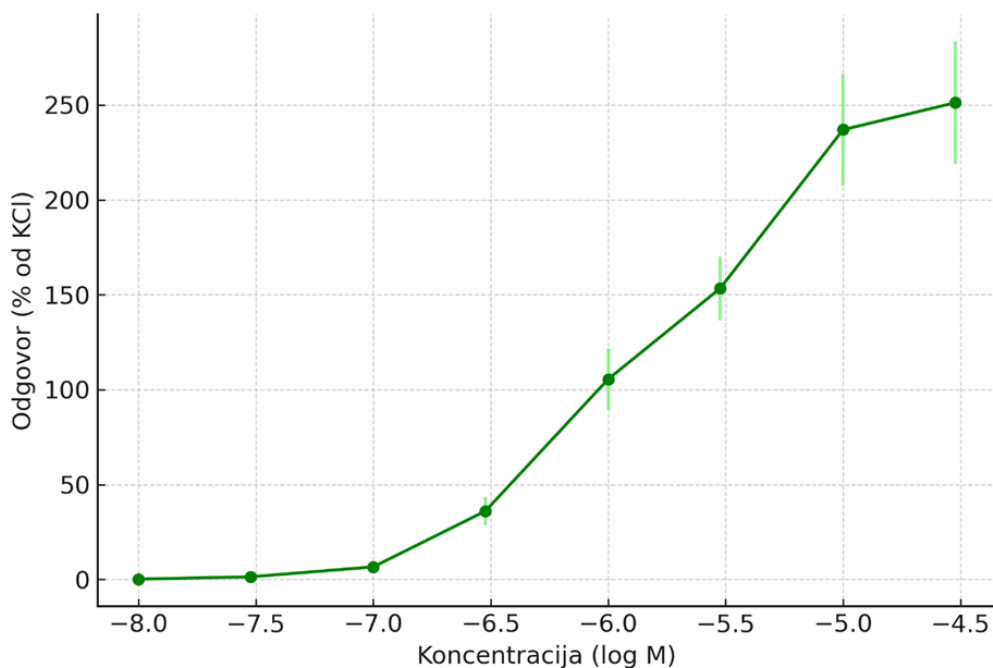
Vaskularni odgovor serotoninom prekontrahovane HUA nakon dodavanja diazepama do postizanja koncentracija od 10^{-8} M do 10^{-4} M je prikazan u Grafikonu 2. Dejstvo diazepama je ukupno ispitano u 5 individualno nezavisnih serija ($n = 5$), a izraženo je kao procenat vazoaktivnosti u odnosu na maksimalnu vrijednost kontrakcije preparata HUA serotoninom (postignutoj pri koncentraciji serotonina od $10^{-5}/10^{-4}$ M). Preparat je pri nižim koncentracijama diazepama (10^{-8} - 10^{-6} M) pokazao minimalnu reakciju. Prvu značajniju reakciju diazepam postiže pri koncentraciji od 10^{-5} M, kada izaziva umjerenu vazorelaksaciju (~34%) a pri najvećoj dostignutoj koncentraciji diazepama od 10^{-4} M dovodi do snažne vazorelaksacije (~96%) u odnosu na maksimalno izazvanu kontrakciju HUA serotoninom.



Grafikon 2. Kumulativna logaritamska koncentraciono-zavisna kriva dejstva diazepama na HUA prekontrahovane serotoninom (pri maksimalnoj koncentraciji od 10^{-4} M). Vrijednost vaskularne reakcije (relaksacije) arterija je predstavljena kao aritmetička sredina u procentima (%) pojedinačnih serija ($n = 5$) a izražena je u odnosu na maksimalnu kontrakciju preparata serotoninom.

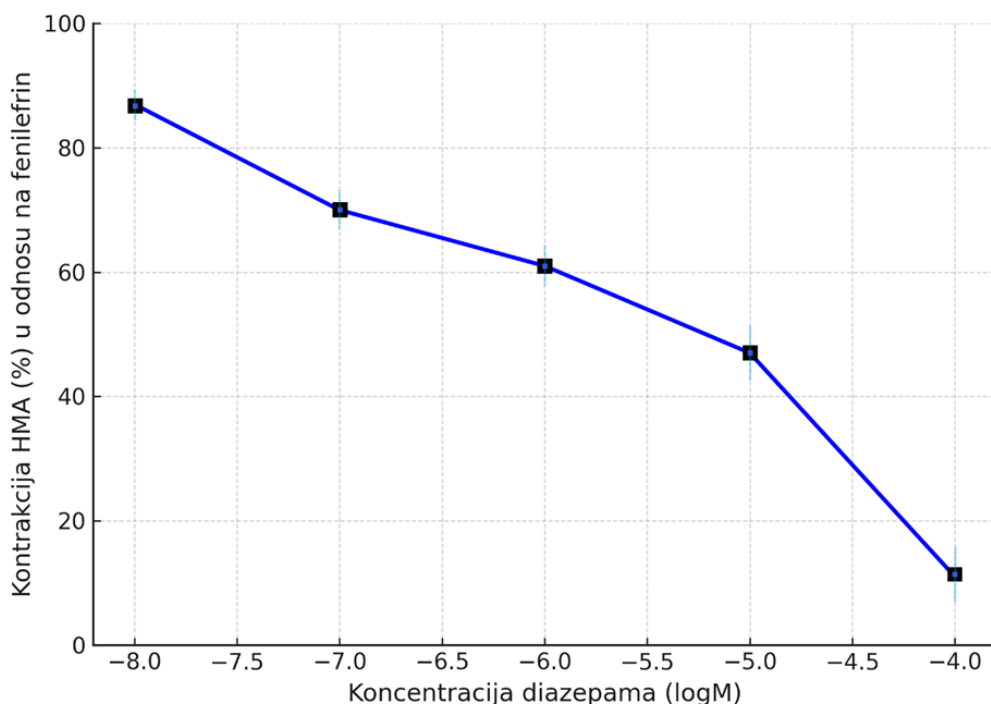
Vaskularni odgovor HMA na fenilefrin i diazepam

Vazokonstriktorni odgovor preparata HMA na fenilefrin je testiran u 9 individualno nezavisnih serija ($n = 9$) i pokazao je koncentraciono-zavisnu vazoaktivnost, što vidimo u Grafikonu 3. Dejstvo fenilefrina na tonus arterija je izraženo kao procenat u odnosu na maksimalno dostignutu kontrakciju pri probama viabilnosti preparata KCl-om. Fenilefrin je izazvao slabu ($< 1\%$) vazokonstrikciju pri koncentraciji od 10^{-8} M, dok je pri koncentraciji od 10^{-7} M zabilježena umjerena kontrakcija (~7%). Povećanjem koncentracije fenilefrina u komorama kupatila vazokonstriktorni odgovor je progresivno rastao, dostižući ~250% kontrakcije izazvane KCl-om pri koncentraciji fenilefrina od $10^{-4.5}$ M.



Grafikon 3. Kumulativna logaritamska koncentraciono-zavisna kriva dejstva fenilefrina na izolovane HMA metodom kupatila za izolovana tkiva. Vrijednost vaskularne reakcije (kontrakcije) arterija je predstavljena kao aritmetička sredina u procentima (%) pojedinačnih serija ($n = 9$) a izražena u odnosu na maksimalnu kontrakciju izazvanu probom viabilnosti preparata KCl-om.

Vaskularni odgovor fenilefrinom prekontrahovane HMA nakon dodavanja diazepama do postizanja koncentracija od 10^{-8} M do 10^{-4} M je prikazan u Grafikonu 4. Dejstvo diazepama je ukupno ispitano u 3 individualno nezavisne serije ($n = 3$) a izraženo je kao procenat vazoaktivnosti u odnosu na maksimalnu vrijednost kontrakcije preparata HMA fenilefrinom (postignutoj pri koncentraciji fenilefrina od $10^{-4.5}$ M). Diazepam je izazvao umjerenu vazorelaksaciju preparata ($\sim 12\%$) pri koncentraciji od 10^{-8} M, koja postepeno postaje snažnija a pri najvećoj dostignutoj koncentraciji diazepama od 10^{-4} M preparat pokazuje snažnu vazorelaksaciju ($\sim 89\%$) u odnosu na maksimalnu vazokonstrikciju HMA pri prekontrakciji fenilefrinom.



Grafikon 4. Kumulativna logaritamska koncentraciono-zavisna kriva dejstva diazepama na HMA prekontrahovane fenilefrinom (pri maksimalnoj koncentraciji od $10^{-4,5}$ M). Vrijednost vaskularne reakcije (relaksacije) arterija je predstavljena kao aritmetička sredina u procentima (%) pojedinačnih serija ($n = 3$) a izražena je u odnosu na maksimalnu kontrakciju preparata fenilefrinom.

DISKUSIJA

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da diazepam izaziva izraženu, koncentraciono-zavisnu vazorelaksaciju na izolovanim humanim umbilikalnim i mezenteričnim arterijama, prethodno kontrahovanim serotoninom odnosno fenilefrinom. Ovi rezultati se poklapaju sa rezultatima prethodnih eksperimentalnih studija koje dokazuju da benzodiazepini, osim centralnih, posjeduju i određene periferne efekte [3][7].

U ranijem eksperimentalnom istraživanju vazodilatatornog dejstva benzodiazepina na humanim umbilikalnim arterijama i venama, rezultati su dokazali da diazepam i klonazepam izazivaju ~70% vazorelaksacije pri koncentraciji od 10^{-4} M [6]. Slično tome, eksperimenti na arterijama pasa su dokazali da diazepam izaziva vazorelaksaciju ovih krvnih sudova ali je ona varirala od ~40% do ~60% u zavisnosti od arterijskog segmenta i vrste prekontraktorskog agonista [7]. Novija istraživanja na torakalnoj arteriji pacova dokazuju da pozitivni alosterični modulatori $GABA_A$ receptora dovode do vazorelaksacije > 50–80% pri koncentracijama od 10^{-4} M, što je u skladu sa koncentraciono-zavisnim efektom dobijenim i u ovom istraživanju [3]. Pored eksperimentalnih *in vitro* studija, nekoliko kliničkih studija je dokazalo da primjena diazepama dovodi do snižavanja arterijskog pritiska i smanjenja periferne vaskularne rezistencije, što indirektno potvrđuje postojanje perifernog vazodilatatornog efekta diazepama i *in vivo* [8][9][10].

Dosadašnje studije su dovele do zaključka da diazepam izaziva direktnu relaksaciju perifernih krvnih sudova putem nekoliko pretpostavljenih mehanizama: interakcijom

diazepama sa vaskularnim GABA_A receptorima, aktivacijom translokatornog proteina (TSPO) smještenog u mitohondrijama glatkih mišića, kao i potencijalnim endotelijum-zavisnim mehanizmima oslobađanja azot-oksida (NO) i prostaciklina [2][3][8]. Rezultati ove studije dodatno potvrđuju postojanje perifernog mehanizma djelovanja diazepama, koji nije posredovan centralnim nervnim sistemom, odnosno dejstva izrazito slabijeg ali sličnog kalcijumskim antagonistima i vazodilatatorima [9][10].

U ovom istraživanju je zabilježen snažniji vazodilatatorni odgovor na umbilikalnim arterijama (~96%) u poređenju sa mezenteričnim arterijama (~89%) pri istoj koncentraciji diazepama od 10^{-4} M. Razlika može biti posljedica specifične reaktivnosti vaskularnih segmenata na upotrijebljene supstance pri prekontrakciji preparata (serotonin/fenilefrin), različite ekspresije receptora u glatkim mišićima, kao i potencijalne varijacije u gustini endotelijumskih faktora relaksacije. Rezultati ove studije se mogu posmatrati kao izolovano dejstvo diazepama na umbilikalnu odnosno mezenteričnu cirkulaciju, ali se mogu uzeti i kao primjer za dejstvo diazepama na sistemsku vaskularnu rezistenciju zbog gotovo iste vazoaktivnosti ova dva modela na primijenjeni protokol.

Sveukupno posmatrano, dobijeni rezultati ove i prethodnih studija ukazuju na to da diazepam ima koncentraciono-zavisan periferni vazodilatatorni efekat. Step en izazvane vazodilatacije u ovoj i prethodno navedenim studijama varira između ~40% i ~95%. Varijacije u stepenu vazodilatacije raznih *in vitro* modela zavise od više metodoloških faktora, uključujući vrstu i porijeklo uzorka (humani ili životinjski model), tip krvnog suda, kao i agonistu koji je korišten za izazivanje prekontrakcije arterijskih krvnih sudova [3][6][7]. Razlike u stepenu vazodilatacije koju diazepam izaziva na HUA, HMA ali i druge arterije prethodnih studija nam sugerišu da periferni efekat diazepama nije uniforman već zavisi od specifične interakcije između farmakološkog agensa, vrste krvnog suda i njegovog receptorskog profila.

Ipak, potrebno je naglasiti određena ograničenja ovog istraživanja. Eksperimenti su izvedeni *in vitro*, što ne odražava u potpunosti složenost interakcija u ljudskom organizmu, gdje su prisutni hormonski, metabolički i neurohumoralni regulacioni mehanizmi. Takođe, broj uzoraka je relativno ograničen, pa je za potvrdu nalaza potrebna veća serija eksperimenata. U obzir treba uzeti i to da standardne doze diazepama 5–10 mg u kliničkim studijama, iako izazivaju mjerljiv pad arterijskog pritiska, svoje dejstvo vjerovatno ispoljavaju putem centralnih mehanizama [8].

Klinički značaj ovog istraživanja ogleda se u tome što ono potvrđuje da diazepam, pored centralnih, može ispoljiti i direktne periferne efekte na krvne sudove. Iako se smatra da danas standardne anksiolitičke i sedativne doze koje se koriste u praksi vjerovatno ne dostižu koncentracije dovoljne da izazovu izraženu direktnu vazodilataciju u perifernim arterijama, u određenim kliničkim situacijama mogu se primijeniti i znatno veće doze (od preko 50 mg intravenski u anesteziologiji, intenzivnoj njezi, terapiji epileptičkog statusa ili kardioverziji) koje bi potencijalno mogle izazvati periferne efekte [7].

ZAKLJUČAK

Ovom studijom je potvrđena koncentraciono-zavisna vazodilatacija na izolovanim humanim umbilikalnim i mezenteričnim arterijama prekontrahevanim serotoninom odnosno fenilefrinom. Ovaj nalaz potvrđuje da diazepam, pored dobro poznatih centralnih mehanizama, posjeduje i periferni mehanizam vazorelaksacije arterijskih krvnih sudova. Dobijeni rezultati mogu biti korisni za planiranje budućih *in vitro* studija, kako u pogledu boljeg razumijevanja farmakoloških osobina diazepama, tako i u pogledu otkrivanja mogućih terapijskih protokola koji uključuju novostečena saznanja.

LITERATURA

- [1] Varagić V. M., Milošević M. P. (2012): Farmakologija. XXIII izdanje. Elit – Medica. Beograd.
- [2] Katzung B. G., Masters S. B., Trevor A. J. (2012): Basic and Clinical Pharmacology. 12th ed. McGraw-Hill Medical. New York.
- [3] Bojić M. G., Todorović L., Santrač A., Mian M. Y., Sharmin D., Cook J. M., et al. Vasodilatory effects of a variety of positive allosteric modulators of GABAA receptors on rat thoracic aorta, *Eur J Pharmacol*, 2021, 899:174023, doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174023.
- [4] Bojić M. G., Đukanović Đ., Marinković S., Jovičić S., Stojiljković M. P., Đurić D. M., et al. Methodological challenges in using human umbilical artery as a model for in vitro studies, *Experimental Physiology*, 2023, 108, 1569-1578, doi: 10.1113/EP091374.
- [5] Upchurch J. W., Laizzo P. A. In vitro contractile studies within isolated tissue baths: Translational research from Visible Heart Laboratories, *Experimental Biology and Medicine*, 2022, 247, 584-597, doi: 10.1177/15353702211070535.
- [6] Elgoyhen A. B., Lorenzo P. S., Rothlin R. P., Spacavento D., Adler-Graschinsky E. Relaxant effects of benzodiazepines on isolated human umbilical arteries and veins, *J. Auton. Pharmacol.*, 1993, 13, 373-379, doi: 10.1111/j.1474-8673.
- [7] Ishii K., Kano T., Ando J. Pharmacological effects of flurazepam and diazepam on isolated canine arteries, *Japan J. Pharmacol*, 1983, 33, 65-71.
- [8] Kitajima T., Kanbayashi T., Saito Y., Takahashi Y., Ogawa Y., Sugiyama T., et al. Diazepam reduces both arterial blood pressure and muscle sympathetic nerve activity in human, *Neurosci Lett.*, 2004, 355, 77-80, doi: 10.1016/j.neulet.2003.10.054.
- [9] Cote P., Gueret P., Bourassa M. G. Systemic and Coronary Hemodynamic Effects of Diazepam in Patients with Normal and Diseased Coronary Arteries, *Circulation*, 1974, 50, doi: 10.1161/01.CIR.50.6.1210.
- [10] Jenkinson J. L., MacRae W. R., Scott D. B., Gould J. F. Haemodynamic effects of diazepam used as a sedative for oral surgery, *Br. J. Anaesth.*, 1974, 46, 294.

VASODILATORY EFFECTS OF DIAZEPAM ON HUMAN UMBILICAL AND MESENTERIC ARTERIES: AN IN VITRO EXPERIMENTAL STUDY

Authors: ĐORĐE PILIPOVIĆ, Jovana Škeljić, Lejla Tica

Email: djordje.pilipovic@student.med.unibl.org

Mentor: Assist. Prof. Milica Gajić Bojić

Centre for Biomedical Research

Faculty of Medicine, University of Banja Luka

Introduction: Benzodiazepines, primarily known for their central effects, are increasingly associated with direct effects on peripheral vascular tone. Although experimental studies on animal models have demonstrated that diazepam can induce CNS-independent vasorelaxation, data regarding its effects on human blood vessels remain limited.

Aim: The purpose of this study was to examine the influence of diazepam on the tone of the human umbilical and mesenteric arteries.

Materials and Methods: The primary method for assessing vascular responses was the use of an organ bath system for isolated tissue experiments. Human umbilical arteries (HUA) were obtained from healthy women undergoing elective cesarean section, while human mesenteric arteries (HMA) were collected from patients undergoing elective intestinal surgery. Arterial segments 3–4 mm in length were prepared and mounted in the organ bath chambers. Viability was confirmed using potassium chloride at a concentration of 6×10^{-2} M. HUA were precontracted with serotonin (10^{-10} – 10^{-4} M) and HMA with phenylephrine (10^{-8} – $10^{-4,5}$ M). Diazepam was added cumulatively (10^{-8} – 10^{-4} M). Arterial contraction was expressed as a percentage of the maximal KCl-induced contraction, and relaxation as a percentage of the maximal precontraction.

Results: Serotonin induced a concentration-dependent vasoconstriction in HUA, which, at a concentration of 10^{-4} M, amounted to ~225% of the KCl-induced contraction. Phenylephrine induced a concentration-dependent vasoconstriction in HMA, which, at a concentration of $10^{-4,5}$ M, amounted to ~250% of the KCl-induced contraction. Diazepam produced concentration-dependent vasorelaxation in both artery types: ~96% in HUA and ~89% in HMA at 10^{-4} M.

Conclusion: These findings demonstrate that diazepam induces strong, concentration-dependent vasorelaxation in isolated, precontracted human umbilical and mesenteric arteries, confirming the existence of its peripheral effect.

Keywords: diazepam; vasoconstriction; vasorelaxation; human umbilical artery; human mesenteric artery; organ bath