

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Eldina Rizvić

**IN VITRO I IN VIVO FARMAKOLOŠKA  
KARAKTERIZACIJA ATIPIČNOG  
SIMPATOMIMETIKA LERIMAZOLINA**

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Eldina Rizvić

**IN VITRO AND IN VIVO  
PHARMACOLOGICAL  
CHARACTERIZATION OF ATYPICAL  
SYMPATHOMIMETIC LERIMAZOLINE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

## **Mentor**

---

Dr Miroslav Savić, redovni profesor  
Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu

## **Članovi komisije**

---

Dr Nenad Ugrešić, redovni profesor u penziji  
Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu

---

Dr Edin Jusufović, docent  
Medicinski fakultet Univerziteta u Tuzli

U Beogradu, \_\_\_\_\_

## *Izjava zahvalnosti*

*Želim da izrazim svoju zahvalnost najprije svom mentoru, profesoru Miroslavu Saviću na smjernicama i idejama u istraživačkoj i praktičnoj postavci moje teme, pomoć u oblikovanju doktorata i precizne interpretacije dobijenih rezultata, bez čijeg nesebičnog prenošenja znanja i stalne podrške, strpljivosti i povjerenja ne bi bilo moguće finalizirati doktorsku disertaciju.*

*Prof. dr. Nenadu Ugrešiću, redovnom profesoru u penziji sa Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu zahvaljujem na članstvu u Komisiji kao i dr.sc. Edinu Jusufoviću, docentu na Katedri za internu medicinu sa Medicinskog fakulteta Univerziteta u Tuzli.*

*Kolegi Goranu Jankoviću, saradniku na Katedri za farmakologiju, želim iskazati zahvalnost za nesebično pomaganje u svakom segmentu istraživanja, timski rad proveden u laboratoriji kao i konstantnu podršku i savjete tokom sveukupnog eksperimentalnog procesa.*

*Zahvaljujem kompaniji Zdravlje a.d. Leskovac na pomoći u obezbjeđivanju supstanci korišćenih u sprovedenim ispitivanjima.*

*I na kraju, najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima na moralnoj, duhovnoj i finansijskoj podršci tokom svih godina studija kao i suprugu Dženanu koji je svo vrijeme uz mene, vjerovao i davao snagu da istrajem. Moj uspjeh je i vaš uspjeh, hvala vam što postojite.*

## SKRAĆENICE I AKRONIMI

**ANOVA** – analiza varijanse (eng. analysis of variance)

**ATP** – adenzin trifosfat

**EPM** – uzdignuti plus lavirint

**GM-CSF** – granulocyte macrofage colony stimulating factor

**HT** – hidroksitriptamin

**KBR** – Krebs bikarbonatni rastvor

**LC-MC** – liquid chromatography- mass spectrometry

**mRNA** – messenger RNA

**NANC** – non-adrenergic, non-cholinergic  
transmitter

**NK** – natural killer cells

**NO** – azot monoksid

**NPY**- neuropeptid tirozin

**PAMP** aktivacija – pathogen associated molecular pattern

**PRRs** – pattern recognition receptors

**PTZ** – pentilentetrazol

**SEM** – standardna greška

**SLA** – spontana lokomotorna aktivnost

**VIP** - vazoaktivni intestinalni peptid

## Rezime

Dekongestivi su lijekovi sa simpatomimetskim djelovanjem. Obično se izdaju bez ljekarskog recepta i široko su zastupljeni u svakodnevnoj ambulantnoj i apotekarskoj praksi. Kontrakcija krvnih sudova sluznice nosa može simptomatski pomoći pacijentima sa alergijskim rinitisom, rinosinusitisom, prehladom i drugim stanjima respiratornih puteva, kod kojih se javlja osjećaj "zapušenosti nosa". Postoje dvije klase nazalnih dekonjestiva: simpatomimetski amini (fenilefrin, pseudoefedrin, efedrin, fenilpropanolamin) i imidazolini (oksimetazolin, ksilometazolin, nafazolin, lerimazolin). Dok je sistemska primjena dekonjestivne terapije povezana sa rizicima od neželjenih efekata na srce i krvne sudove, lokalna primjena može dovesti do razvoja medikamentoznog rinitisa, što ukazuje na potrebu usavršavanja terapijskih mogućnosti u ovoj oblasti. Pored monokomponentnih, postoji nekoliko nazalnih preparata sa kombinacijom dvije aktivne supstance, od kojih samo jedna ima dekonjestivno dejstvo. Jedina kombinacija dva dekonjestiva prisutna na tržištu lijekova sadrži standardni vazokonstriktor fenilefrin i lerimazolin, dekonjestiv strukture slične ksilometazolinu i oksimetazolinu. *In vitro* ispitivanja vazokonstriktorne aktivnosti lerimazolina oskudna, a *in vivo* dejstva još uvijek nepoznata.

Ciljevi ovog istraživanja su bili ispitivanje mehanizama kontraktalnog dejstva lerimazolina, prirode interakcije sa fenilefrinom, kao i uticaja na ponašanje oglednih životinja.

Radioaktivno obilježenim visoko selektivnim ligandima za pojedine podtipove receptora mjereno je afinitet vezivanja lerimazolina na  $\alpha_1$ , 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>1A</sub> i dopaminskim D<sub>2</sub> receptorima, čime su upotpunjeni literaturni podaci o vezivanju za 5-HT<sub>1B</sub> i 5-HT<sub>1D</sub> receptore. Najveće afinitete lerimazolin ima za 5-HT<sub>1D</sub> i 5-HT<sub>1A</sub> receptore, a najmanji za  $\alpha_1$  receptor.

Ispitivanjem vazoaktivnosti lerimazolina na isječcima torakalne arterije pacova u vodenom kupatilu, uz korišćenje većeg broja supstanci u kombinaciji (antagonist  $\alpha_1$  adrenoceptora prazosin, antagonisti  $\alpha_2$  adrenoceptora RX 821002 i rauvolscin, antagonist  $\alpha_{2C}$  adrenoceptora JP 1302, neselektivni antagonist 5-HT receptora metiotepin, antagonist 5-HT<sub>1B</sub> receptora SB 224289, antagonist 5-HT<sub>1D</sub> receptora BRL 15572, antagonist 5-HT<sub>2A</sub> receptora ketanserin) utvrđeno je da se vazokonstriktorno dejstvo lerimazolina primarno ispoljava putem 5-HT<sub>2A</sub> receptora, dok je u većim koncentracijama i posljedica aktivacije  $\alpha_1$  receptora. Opravdanost kombiniranja dva nazalna dekonjestiva fenilefrina i lerimazolina se ispitala analizom uticaja

lerimazolina na kontraktilnu aktivnost  $\alpha$  adrenergičkog vazokonstriktora fenilefrina, gdje su rezultati pokazali da lerimazolin u visokim koncentracijama ( $10^{-4}$  M) poništava kontraktilnu aktivnost fenilefrina, dok niže koncentracije lerimazolina ( $10^{-6}$  i  $10^{-7}$  M) dovode do potenciranja kontraktilnog dejstva fenilefrina. Rezultati ispitivanja mogućeg supstrata ovog efekta su pokazali da oslobađanje endotelnih faktora kao što su NO i EDHF ima veliki uticaj na smanjenje kontraktilnog dejstva fenilefrina lerimazolinom, dok prostaglandini i pojedini podtipovi receptora (kao što su 5-HT<sub>7</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> i 5-HT<sub>1D</sub> receptori) nemaju uticaj na interakciju fenilefrin-lerimazolin.

Određivanjem kinetičkih profila, ukupne koncentracije i slobodne frakcije lerimazolina u mozgu i plazmi pacova pokazano je da lerimazolin prolazi krvno-moždanu barijeru i da se ne mogu isključiti njegovi centralni efekti pri terapijskoj primjeni. Ipak, na osnovu rezultata ispitivanja uticaja u četiri standardna bihevioralna testa: spontane lokomotorne aktivnosti, održavanja ravnoteže na rotirajućoj osovini, konvulzivne aktivnosti izazvane pentilentetrazolom i uzdignutog plus lavirinta, pokazano je da lerimazolin nema izražene efekte na centralni nervni sistem pri primjeni farmakološki relevantnih doza, uz ispoljavanje potencijala sedativnog dejstva pri višim dozama.

U zaključku, lerimazolin je do sada rijetko ispitivan simpatomimetik namijenjen za kombinovanu primjenu sa fenilefrinom, čiji se farmakološki profil jasno izdvaja atipičnošću, u smislu istaknute uloge 5-HT<sub>2A</sub> receptora kao supstrata vazokonstriktornog dejstva i potencijala da pojača slabu, odnosno suzbije jaku kontraktilnu aktivnost fenilefrina, što može da bude od kliničkog značaja kod medikamentoznog rinitisa, koji se karakteriše velikim fluktuacijama kontraktilne aktivnosti krvnih sudova.

**Ključne riječi:** lerimazolin, fenilefrin, pacovska torakalna arterija,  $\alpha$  receptori, 5-HT receptori, vazokonstrikcija

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmakologija

**UDK broj:** .085:[612.899:577.1(043.3)

## Abstract

Decongestants are drugs with sympathomimetic properties, commonly dispensed without a prescription and widely used in everyday out-of-hospital and community pharmacy settings. The contraction of the blood vessels of nasal mucosa can symptomatically help patients with allergic rhinitis, rhinosinusitis, colds and other respiratory tract infections in which the feeling of "nasal congestion" appears. There are two classes of nasal decongestants: sympathomimetic amines (phenylephrine, pseudoephedrine, ephedrine, phenylpropanolamine) and the imidazolines (oxymetazoline, xylometazoline, naphazoline, lerimazoline). While oral administration of decongestant therapy is associated with the risks of adverse effects on the heart and blood vessels, topical administration can lead to the development of rhinitis medicamentosa, underlying the need for improvement of therapeutic strategies in this field.

Besides the monocomponent preparations, there are several nasal preparations that combine two active compounds, only one of which exerts the decongestant action. The only combination of two decongestants available in the drug market contains the standard vasoconstrictive agent phenylephrine and lerimazoline, a decongestant structurally similar to xylometazoline and oxymetazoline. As the *in vitro* actions of lerimazoline were scarcely examined, and its *in vivo* effects are generally unknown, the current research aimed at the elucidation of mechanisms of contractile actions of lerimazoline, the nature of its interaction with phenylephrine, as well as its influence on behavior of the experimental animals.

Specific binding affinities were determined by measuring the extent of displacement of [<sup>3</sup>H] labelled specific ligands for  $\alpha_1$ , 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>1A</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors, and these data complemented the literature findings on binding of lerimazoline to 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptors. The highest affinity of lerimazoline was for 5-HT<sub>1D</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors, and the lowest for the  $\alpha_1$  receptor. Examination of lerimazoline vasoconstrictive activity in rat aortic rings mounted in an organ bath, with use of several ligands in combination ( $\alpha_1$  adrenoceptor antagonist prazosin,  $\alpha_2$  adrenoceptor antagonists RX 821002 and rauwolscine,  $\alpha_{2C}$  adrenoceptor antagonist JP 1302, non-selective 5-HT receptor antagonist methiothepin, 5-HT<sub>1B</sub> receptor antagonist SB 224289, 5-HT<sub>1D</sub> receptor antagonist BRL 15572, and 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist ketanserin) has revealed that the vasoconstrictor effect of lerimazoline was primarily mediated by 5-HT<sub>2A</sub> receptor, while in higher concentrations it is also contributed to by the  $\alpha_1$  receptor. The rationale of combining two nasal decongestants,



phenylephrine and lerimazoline, was assessed through an analysis of the influence of lerimazoline on the contractile activity of the  $\alpha$  adrenergic vasoconstrictor phenylephrine, where the results demonstrated that lerimazoline in high concentrations ( $10^{-4}$  M) abolished the contractile activity of phenylephrine, while lower concentrations of lerimazoline ( $10^{-6}$  and  $10^{-7}$  M) resulted in potentiation of the contractile effects of phenylephrine. Examination of the possible substrate of this effect also showed that releasing the endothelial factors such as NO and EDHF had a major impact on reducing the contractile effects of phenylephrine by lerimazoline, whereas the prostaglandins and certain subtypes of receptors, such as 5-HT<sub>7</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptors, had no effect on the interaction of phenylephrine and lerimazoline.

By determining the kinetic profile, the total concentration and the free fraction of lerimazoline in the brain and plasma of rats, it was shown that lerimazoline penetrated the blood-brain barrier, so that its possible central effects in the settings of therapeutic use cannot be excluded. However, based on the results of examination of the influence of lerimazoline on rat behavior in four standard behavioral tests: spontaneous locomotor activity, rotarod, pentylenetetrazole-induced convulsions and elevated plus maze, it was shown that lerimazoline does not exert distinct effects on the central nervous system when administered at pharmacologically relevant doses, with an exception of sedative actions noted at higher doses.

In conclusion, lerimazoline is a rarely studied sympathomimetic drug intended for a combined use with phenylephrine, with a specific atypical pharmacological profile, in the sense of a distinct role of 5-HT<sub>2A</sub> receptors as a substrate of its vasoconstrictive action and the potential of enhancing the weak, while ameliorating the strong contractile action of phenylephrine. Such a finding may be clinically important in the case of rhinitis medicamentosa, characterized by huge fluctuations in blood vessel tone.

**Key words:** lerimazoline, phenylephrine, rat thoracic aorta,  $\alpha$  receptor, 5-HT receptor, vasoconstriction

**Academic expertise:** Pharmacy

**Major in:** Pharmacology

**UDC N°:** 57.085:[612.899:577.1(043.3)

## Sadržaj

1.UVOD .....	1
1.1.Nazalna kongestija .....	2
1.1.1.Fiziologija nazalne kongestije .....	2
1.1.2.Patofiziologija nazalne kongestije i najčešći oblici rinitisa.....	3
1.2.Anatomija, histologija i fiziologija sluznice nosa .....	5
1.2.1.Anatomija .....	5
1.2.2.Histologija .....	6
1.2.2.1.Površinski epitel.....	6
1.2.2.2.Lamina propria.....	7
1.2.3.Fiziologija.....	8
1.2.3.1.Mukocilijarni klirens.....	9
1.2.3.1.1.Mukus.....	9
1.2.3.1.2.Mukozni slojevi.....	10
1.2.4.Nazalni ciklus i zračni otpor.....	11
1.2.5.Kondicioniranje zraka.....	11
1.2.6.Filtracija.....	11
1.2.7.Imunologija.....	12
1.2.8.Inervacija .....	13
1.3.Nazalni dekongestivi .....	14
1.3.1.Oksimetazolin i ksilometazolin kao preteče lerimazolina.....	17
1.3.2.Farmakologija simpatomimetičkih supstanci .....	17
1.3.2.1.Molekularni mehanizmi simpatomimetika .....	18
1.3.2.2.α adrenergički receptori .....	18
1.3.2.3.5-HT receptori.....	19
1.4.Lerimazolin .....	21
1.4.1.Historija lerimazolina .....	21

1.4.2.Fizičke i hemijske osobine lerimazolina .....	21
2.CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	24
3.MATERIJAL I METODE .....	25
3.1.Životinje .....	25
3.2.Supstance.....	26
3.3.Određivanje afiniteta vezivanja lerimazolina na pojedine podtipove receptora .....	27
3.4.In vitro ispitivanje .....	28
3.4.1.Eksperimentalni protokol za ispitivanje efekta i mehanizma dejstva lerimazolina.....	28
3.4.2.Eksperimentalni protokol za ispitivanje odnosa fenilefrin-lerimazolin .....	29
3.5.Određivanje koncentracije izabranih supstanci u serumu/plazmi i mozgu pacova.....	30
3.6.Bihejvioralni testovi .....	31
3.6.1.Test spontane lokomotorne aktivnosti.....	31
3.6.2.Uzdignuti plus–lavirint.....	32
3.6.3.Rotarod test.....	33
3.6.4.Pentilentetrazolski test.....	33
3.7.Statistička analiza.....	34
4.REZULTATI.....	36
4.1.Afiniteti vezivanja lerimazolina za pojedine podtipove receptora.....	36
4.2.In vitro farmakološki profil lerimazolina .....	36
4.2.1.Kontraktilni efekat lerimazolina u prisustvu i odsustvu $\alpha$ selektivnih antagonista .....	38
4.2.2.Kontraktilni efekat lerimazolina u prisustvu i odsustvu antagonista serotonina .....	40
4.2.3.Korelacija funkcionalnih parametara sa literaturnim vrijednostima .....	43
4.3.Uticaj različitih endotelnih faktora i pojedinih podtipova receptora na interakciju fenilefrina i lerimazolina .....	46
4.3.1.Vaskularni efekat fenilefrina u pretretmanu različitim koncentracijama lerimazolina .....	47
4.3.2.Efekti L-NAME i OHB <sub>12</sub> na kontraktilnu funkciju fenilefrina u pretretmanu sa lerimazolinom.....	50

4.3.3.Efekti indometacina i TEA-e na kontraktilnu funkciju fenilefrina u pretretmanu sa lerimazolinom.....	51
4.3.4.Efekti metiotepina na kontraktilnu funkciju fenilefrina u pretretmanu sa lerimazolinom.....	53
4.3.5.Efekti SB 269970 i BRL 15572 na kontraktilnu funkciju fenilefrina u pretretmanu sa lerimazolinom.....	55
4.4.Određivanje koncentracije lerimazolina i slobodna frakcija u plazmi/serumu i mozgu pacova.....	55
4.5.Bihejvioralni testovi .....	58
4.5.1.Test spontane lokomotorne aktivnosti (SLA).....	58
4.5.2.Uzdignuti plus lavirint.....	59
4.5.3.Rotarod test i pentilentetrazolski infuzioni test .....	60
5.DISKUSIJA .....	61
5.1.In vitro nalazi .....	61
5.2. In vivo nalazi.....	67
5.3. Nedostaci i perspektive istraživanja.....	68
6.ZAKLJUČCI.....	69
7. REFERENCE.....	71

## 1.UVOD

Savremena materija medica obuhvata ne samo lijekovite supstance koje su obimno ispitivane u prekliničkim i kliničkim istraživanjima sprovedenim u skladu sa visokim zahtjevima koje postavlja regulativa u oblasti razvoja lijekova, već i lijekove koji su uvedeni u klinički praksu u periodu kada su ti zahtjevi bili znatno manje rigorozni. U pojedinim farmakoterapijskim grupama interesovanje farmaceutske industrije za razvoj novih lijekova nije veliko, i uglavnom iste terapijske mogućnosti opstaju tokom više decenija. Takav primjer je klasa dekonjestiva za lokalnu primjenu. Predstavnici kao što su nafazolin, ksilometazolin, oksimetazolin, obično u režimu izdavanja bez ljekarskog recepta, koriste sa sa polaznom premisom da su u pitanju vazokonstriktori koji aktivacijom  $\alpha$ -adrenergičkih receptora na krvnim sudovima sluznice nosa dovode do dekonjestije, koja obezbjeđuje simptomatsko poboljšanje kod stanja praćenih kongestijom nosne sluznice. Alternativno, sa istim ciljem lokalnog djelovanja, nerijetko se koriste i simpatomimetici za sistemska primjenu, prije svega fenilefrin, a čija se racionalnost obično opravdava smanjenjem rizika povezanih sa prekomjernom primjenom nazalnih dekonjestiva, na prvom mjestu medikamentoznog rinitisa.

Pored uobičajeno korišćenih monokomponentnih proizvoda nazalnih dekonjestiva, na tržištu u svijetu postoji i nekoliko fiksnih kombinacija, koje uz simpatomimetik sadrže i lijekove kao što su vitamin dekspantenol ili mukolitik acetilcistein. Među njima, jedina kombinacija koja deklariše prisustvo i uporedno dejstvo dva simpatomimetika jeste ona koja sadrži fenilefrin i lerimazolin. Ova kombinacija je u prometu više od pola vijeka, ali postojeća literatura i ne postavlja pitanje razloga kombinovanja dvije lijekovite supstance nominalno istog mehanizma dejstva. U farmakoterapiji, takvo kombinovanje je rijetko, a drugih primjera fiksnih kombinacija lijekova iz iste grupe, koji zajedničko farmakološko dejstvo ostvaruju istovjetnim mehanizmom, gotovo da i nema. Međutim, mehanizam dejstva lerimazolina nije jasan, i moguće je da se vazokonstriktorni efekat ovog lijeka ostvaruje na način koji bi bio komplementaran mehanizmu fenilefrina, na način analogan sinergizmu koji se postiže pri primjeni dva diuretika koji djeluju na različitim dijelovima nefrona, ili dva antihipertenziva koji dovode do smanjenja tonusa krvnih sudova dejstvom na različite mehanizme koji dovode do kontrakcije. U tom smislu, od značaja je da se potpunije rasvijetli farmakološki profil lerimazolina, a zatim i da se utvrdi na koji način međusobno djeluju dva vazokonstriktora, fenilefrin i lerimazolin.

## **1.1.Nazalna kongestija**

Nazalna kongestija predstavlja glavni simptom rinitisa (alergijskog i nealergijskog). Rinitis se definiše kao inflamacija struktura nosa sa popratnim simptomima kao što su nazalna kongestija, rinoreja, svrbež i kihanje. Nazalna kongestija uzrokuje nazalnu opstrukciju, ali nisu sve nazalne opstrukcije uzrokovane kongestijom. Kimmelmman, koji je 1989, godine objavio praktični vodič o liječenju alergijskog, infektivnog i vazomotornog rinitisa, ustanovio je da se u SAD u to vrijeme trošilo 5 milijardi dolara godišnje na lijekove za olakšanje simptoma nazalne opstrukcije. Dodatnih 60 miliona dolara se trošilo na hirurške zahvate kao i 10 milijardi dolara na liječenje popratnih simptoma kao što su rinosinusitis, otitis media, bronhitis i astma (Hadley, 1998).

### **1.1.1.Fiziologija nazalne kongestije**

Nazalna mukoza se sastoji od krvnih sudova otpora i kapacitativnih krvnih sudova. U krvne sudove otpora spadaju male arterije, arteriole i arteriovenske anastomoze, koje se ulijevaju (spajaju) u kapacitativne krvne sudove, a u koje spadaju venski sinusoidi (Howarth, 2003). Venski sinusoidi su bogato inervirani simpatičkim vlaknima, koja oslobađaju noradrenalin kada su stimulirana. Noradrenalin se veže na presinaptičke  $\alpha_2$  i postsinaptičke  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  receptore. Ovaj mehanizam smanjuje nazalnu kongestiju smanjujući protok krvi i povećavajući pražnjenje u kapacitativnim krvnim sudovima (Howarth, 2003; Hall, 1968; Proctor, 1976). Ostali nervni završeci kao što su parasimpatički, senzorna C-vlakna i NANC nervi takođe igraju ulogu u nazalnoj kongestiji. Stimulacija NANC nerava uzrokuje rinoreju, kihanje i kongestiju. Parasimpatički nervi oslobađaju kako acetilholin koji povećava nazalnu sekreciju, tako i vazoaktivni intestinalni peptid (VIP) koji može uzrokovati vazodilataciju. Senzorna C-vlakna sadrže supstancu P, neurokinin A, kao i peptid srodan kalcitoninu, koji regulišu simpatičku vazokonstrikciju ((Howarth, 2003).

Lokalni celularni medijatori kao što su mastociti, eozinofili i bazofili utiču na kongestiju oslobađanjem histamina, triptaze, kinina, prostaglandina i leukotriena. Eksudacija plazme, koja sadrži albumine, imunoglobuline i faktore uključene u koagulaciju i fibrinolitički sistem, odvija se kroz fenestracije površnih kapilara. Vrčaste stanice koje nisu pod autonomnom kontrolom mogu uzrokovati kongestiju oslobađanjem mucina nakon stimulacije od strane proteaza, metabolita arahidonske kiseline, histamina, neurotransmitera ili citokina (Howarth, 2003).

### 1.1.2. Patofiziologija nazalne kongestije i najčešći oblici rinitisa

Patofiziologija nazalne kongestije koja se može opisati kao smanjeni protok zraka kroz nos i osjećaj „punoće“ nosa, podrazumjeva više mehanizama koji uključuju:

- a) reverzibilni faktori: inflamacija mukoze (uvećanje venskih sinusoida, povećana nazalna sekrecija i edem)
- b) ireverzibilni faktori: fizički problem koji utiče na protok zraka (anatomski deformitet)
- c) modulacija senzorne percepcije

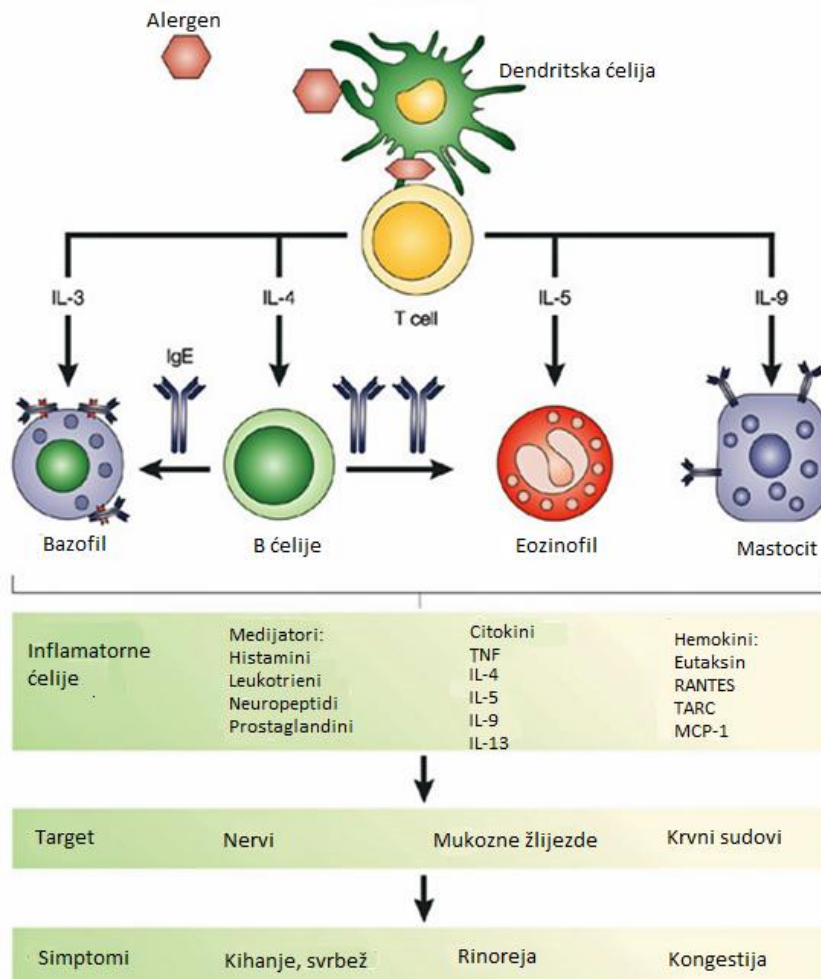
**Tabela 1. Uzroci nazalne opstrukcije**

Ireverzibilni	Reverzibilni
Septalna devijacija, hematom, perforacija Interne/eksterne vulvarne bloka Hipertrofija nazalne školjke Nazalne polipoze, strana tijela Benigni tumori: angiofibrom, obrnuti papilom Maligni tumori: karcinom skvamoznih ćelija, adenokarcinom, melanom Kraniofacijalne anomalije Druge malformacije nazalne šupljine	Alergijski/nealergijski rinitis Akutni ili hronični rinosinusitis sa ili bez polipa Lijekovima uzrokovan rinitis Atrofijski rinitis Trudnoća Wegener ili druge Granulomatoze

**\*Tabela preuzeta iz knjige Nasal Physiology and Pathophysiology (Onerci M)**

**Alergijski rinitis** je najviše izučavana bolest koja pogađa 20-40 miliona Amerikanaca, oko 26% Britanaca, 29,6% belgijske populacije i približno 10-25% svjetske populacije (Storms, 2008). Približno 50% pacijenata sa alergijskim rinitisom osjećaju simptome više od 4 mjeseca tokom jedne godine a nazalna kongestija predstavlja glavni simptom. Popratni simptomi su svrbež, rinoreja, kihanje, crvenilo i suzenje očiju (Nathan, 2003). Prvobitno izlaganje alergenu dovodi do proizvodnje imunoglobulina E (IgE) u B-limfocitima. Fc komponenta stvorenog IgE se veže za upalne stanice, kao što su mastociti. Ponovno izlaganje istom alergenu dovodi do njegovog vezanja za IgE i njihovog križnog vezanja na površini mastocita. Reakcija počinje 2 do 5 minuta nakon vezivanja antigena sa protutijelom, a vrhunac doseže nakon 15 minuta. Tada dolazi do degranulacije i otpuštanja različitih upalnih medijatora, od kojih su neki prethodno stvoreni i pohranjeni u granulama, a drugi se stvaraju

*de novo*. Neki od tih faktora su histamin, prostaglandini, leukotrieni, faktor tumorske nekroze (TNF  $\alpha$ ) i, interleukin (IL)-4 i IL-5. Oslobođanje inflamatornih medijatora dovodi do edema i curenja, rezultirajući kongestijom i drugim simptomima (Slika 1). Ovi učinci, koji su uzrokovani upalnim medijatorima, poznati su kao rana alergo-reakcija i događaju se unutar prvog sata nakon izlaganja antigenu (Pearlma, 1999; Gelfand, 2004).



**Slika 1. Prikaz alergijske reakcije, preuzeto iz Holgate ST i Broide D. (2003).**

Kao rezultat oslobođanja citokina i drugih medijatora, nazalna mukoza postaje infiltrirana inflamatornim ćelijama uključujući eozinofile, bazofile, mastocite i limfocite koji održavaju i pogoršavaju inflamatornu reakciju u nazalnoj mukozu. Kasna faza odgovora se događa 2-8 sati nakon početnog odgovora. Eozinofili predstavljaju glavne ćelije u hroničnom inflamatornom procesu kasne faze koji oslobađaju proinflamatorne medijatore, uključujući cisteinil leukotriene, eozinofil peroksidaze i bazni protein. Ove ćelije takođe služe kao glavni izvor interleukina 3, interleukina 5, GM-CSF (eng. *granulocyte-macrophage colony*



*stimulating factor*, faktor stimulacije kolonije granulocita-makrofaga) i interleukina 13 (Gelfand, 2004).

Medikamentozni rinitis predstavlja tipično stanje nazalne opstrukcije uzrokovano prekomjernom upotrebom nazalnih dekongestiva gdje dolazi do povećanja upotrebe sa vremenom. Akutni i hronični rinosinusitis sa ili bez polipa je udružen sa nazalnom opstrukcijom, gdje simptomi akutnog rinosinusitisa traju maksimalno 6 sedmica dok za hronični rinosinusitis simptomi se produžuju na 12 sedmica i duže. Može biti ograničen na nos i sinuse ili udružen sa astmom i aspirinskom intolerancijom (Fokkens i sar., 2012).

## **1.2. Anatomija, histologija i fiziologija sluznice nosa**

### **1.2.1. Anatomija**

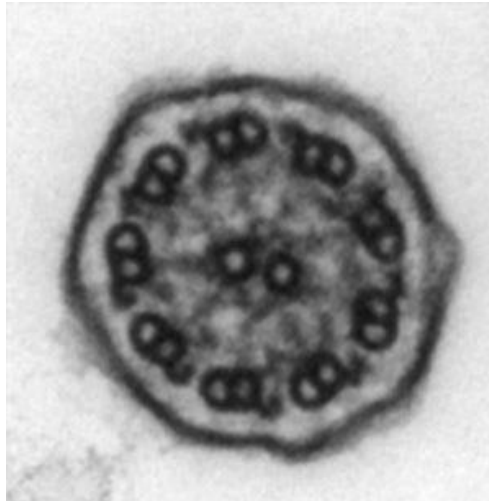
Nos ima glavnu ulogu u čišćenju i vlaženju inhaliranog zraka. Ovaj proces je pod fiziološkom kontrolom koja ovisi o lokalnoj mukoznoj povratnoj sprezi, senzornim i autonomnim refleksima. Ispod kožnog omotača nalazi se koštano-hrskavični skelet i oni zajedno čine spoljni nos. Spoljni nos okružuje nosnice i jednu trećinu nosne šupljine koja se sastoji od 5 cm visoke i 10 cm duge dvojne komore. Ukupna površina obje nazalne komore je oko 150 cm<sup>2</sup> i ukupni volumen je oko 15 ml (Baroody, 2007). U izgradnji koštanog dijela nosne piramide učestvuju nosne kosti i čeonni nastavak gornje vilice, a pokretni dio spoljnog nosa čini hrskavični skelet. Koštana površina prednje strane nosnih komora je neophodna za očuvanje osjetljive mukoze unutar nosa, ali glavna funkcija spoljnog dijela nosa je ipak estetske prirode. Prednja strana nosne šupljine je okrenuta prema nosnicama dok sa suprotne strane komunicira sa rinofarinksom. Nazalna šupljina je termin koji se koristi za opis ulaznog dijela nosa koji se sastoji od skvamoznog epitela sa vibrisama i seboroičnim žlijezdama. Pola centimetra unazad skvamozni epitel prelazi u mukozu. Septum razdvaja nazalnu šupljinu na dva dijela, koje sadrže prednje, srednje i zadnje otvore. Otvori su važni kod procesa vlaženja kao i regulacije temperature udahnutog zraka. Iza prednjih otvora nalazi se predvorje (vestibulum) prekriveno kožom. Otuda je patologija ovog dijela dermatološka. Koštani dio nosne pregrade se sastoji od etmoidne kosti i vomera dok hrskavični dio se sastoji od kvadrilateralne hrskavice. Često svojim oblikom i položajem doprinosi razvoju sindroma nosne opstrukcije. Na spoljašnjem zidu nalaze se nosne školjke (conchae). Ima ih tri: donja, srednja i gornja. Ispod svake školjke je odgovarajući nosni hodnik. Anatomske abnormalnosti

ili promjene na mukozi u donjoj i srednjoj školjki su odgovorne za pojavu akutnog i hroničnog sinusitisa (Watelet i Van Cauwenberge, 1999).

## **1.2.2.Histologija**

### **1.2.2.1.Površinski epitel**

Epitel predstavlja fizičku barijeru prilikom udisaja stranih čestica, gdje ih zadržavaju i čiste kroz koordinirane pokrete cilija i sekrecije mukoze. Druga svrha epitela predstavlja kondicioniranje inhaliranog vazduha za održavanje optimalnih fizioloških uslova kao i uloga u imunom odgovoru na inhalirane antigene (Breeze, 1977; Rasp, 1993; Swift, 1977). Nosna sluznica građena je iz respiratornog i olfaktivnog epitela. Sastoji se od četiri vrste ćelija: bazalnih, cilijarnih, necilijarnih i vrčastih. Bazalne ćelije su progenitorske koje leže na bazalnoj membrani, dok 80% ćelija u epitelu nosa su cilijarne ćelije. Proučavanjem kolumnarnih ćelija pomoću elektronskog mikroskopa, utvrđeno je da se sa njihove slobodne površine pružaju veoma tanke i nježne cilije, čiji je slobodni kraj minimalno savijen u pravcu cilijarnih pokreta. Svaka cilija sastavljena je od devet perifernih parova filamenata, koji okružuju centralni par filamenata. Svaka cilijarna ćelija sadrži oko 100 cilija, 0,3  $\mu\text{M}$  široke i 5  $\mu\text{M}$  duge, gdje je gustina cilijarnih ćelija obrnuto proporcionalna brzini udahnutog zraka (Cole, 1993). Distribucija vrčastih ćelija u zadnjem dijelu nosne šupljine se kreće oko 4000-7000 ćelija po  $\text{mm}^2$ , gdje produkcijom odgovarajuće količine i viskoziteta mukusa doprinose održavanju mukocilijarnog klirensa. Bazalna membrana se definiše kao semipermeabilna zbog toga što je propustljiva kako za tečnosti tako i za sitne čestice. Kroz nju se provlače kapilari kroz koju se direktno na mukoznu površinu izlučuju tečnosti bez prolaska direktno kroz membranu (Cole, 1993).



**Slika 2. Shematski prikaz normalne transverzalne strukture aksoneme (preuzeto iz Nasal Physiology and Pathophysiology, Onerci M).**

### **1.2.2.2.Lamina propria**

Lamina propria podrazumjeva vaskularne, nervne i žlijezdane strukture. U epitelu nosa se nalaze mastociti i eozinofili sa vrlo malo zastupljenih limfocita T, dok u submukozi veća je rasprostranjenost mastocita i limfocita, gdje je odnos T i B ćelija 3:1, a odnos CD4+ i CD8+ je 2-3:1 (Winther, 1987).

Kapilari se nalaze ispod same površine epitela okružujući žlijezde. Važna funkcija kapilara koja dozvoljava proticanje tečnosti na površini lumena kroz vaskularni zid i posljedično isparavanje udahnutog zraka, ukazuje na činjenicu da subepitelijalni kapilari imaju fenestracije na epitelijalnoj strani krvnog suda. Adaptirani su na zahtjeve nosne šupljine u svojstvu zagrijavanja i vlaženja zraka. Kada se šire napunjeni krvlju mukoza otiče i blokira lumen zračnog prostora djelimično u normalnim stanjima ili u potpunosti pri patološkim stanjima (Laitinen, 1992).

Upravo kroz zidove postkapilarnih venula se odigrava curenje plazme tokom inflamacije mukoze, otvaranjem prostora među endotelnim ćelijama. Posljedično dolazi do povećanja volumena i pritiska, sa prodiranjem tečnosti na površini sluznice u vidu eksudata. Medijatori koji uzrokuju curenje plazme su histamin, bradikinin, prostaglandini i supstanca P (Cayna, 1970).

Arteriovenske anastomoze spajaju arteriole za venule, a inervisane su nervima koji sadrže neuropeptid Y i noradrenalin (Baraniuk, 1991; Baraniuk, 1990). Slijevaju se direktno u sinuse i njihovim otvaranjem dolazi do uvećanja sinusa (Eccles, 1987). Međutim, krv može zaobići kapilare i sinusoide putem arteriovenskih anastomoza. Tako, 50% protoka krvi u nazalnoj

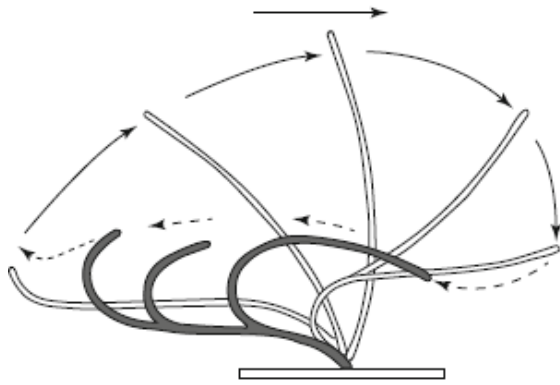
sluznici je preusmjereno putem arteriovenskih anastomoza i ukupan krvni protok po  $\text{cm}^3$  je veći u sluznici nosa nego u mišićima, mozgu i jetri (Drettner i sar., 1974).

Lamina propria sadrži serozne i seromukozne žlijezde povezane sa epitelom ekskretornim kanalom. Broj žlijezda po površini nosa je mnogo veći nego u traheji (8:1 po  $\text{mm}^2$ ) ali pošto su nosne žlijezde manje od trahealnih, njihova veća površinska rasprostranjenost nije direktno povezana sa sekretornim kapacitetom (Tos, 1982). Dnevna sekrecija tečnosti je oko 0,3 ml/kg/dan. Nazalna sekrecija ne predstavlja samo seromukozni eksudat nego i mješavinu eksudata i mukusa koji potiče od vrčastih ćelija. Povećana sekrecija u nosu može biti i zbog reduciranog mukocilijarnog klirensa.

### **1.2.3.Fiziologija**

Sluznica je prekrivena sa 10-15  $\mu\text{m}$  debelog sloja mukusa koji se sastoji od gel sloja i pericilijarne tečnosti (sol sloja). Nos i paranasalni sinusi produkuju 1-2 litar mukusa dnevno koji se sastoji od 2,5-3% glikoproteina, 1-2% soli i 95% vode. Pericilijarna tečnost formira niskoviskozni sol sloj koji omogućava slobodne pokrete cilija i prekriva polisaharidima bogati gel sloj. Sol sloj ima pH 5,5-6,5 i sadrži mnoge antimikrobne proteine lučene iz submukoznih žlijezda.

Nos igra veoma važnu ulogu u pripremanju vazduha da u kondicioniranom stanju dospije u donje disajne puteve i pluća. Od parametara kvaliteta vazduha, bitni su njegova temperatura, stanje vlažnosti i stanje pročišćenosti. Stalno održavanje vlažnosti vazduha postiže se isparavanjem sekreta koji dopijeva na površinu epitela iz sluznih žlijezda i peharastih ćelija (sol sloja). Ovaj proces u kombinaciji sa autoregulacijom površinskog krvnog toka održava temperaturu vazduha u nosu na oko 30 °C, da bi njegova temperatura pri ulazu u ždrijelo bila 36 °C. Međutim, površinski protok krvi je nedovoljan da u kontinuitetu grije inspiriran hladni zrak, tako da ekspiriran zrak zasićen vodenom parom na tjelesnoj temperaturi prolazi kroz relativno hladniju nazalnu površinu stvarajući kondenzaciju i zagrijavajući mukus. Na taj način stvaraju se pogodni uvjeti za alveolarnu izmjenu plinova. Gornji vazdušni put ponaša se u skladu sa temperaturnim stanjem, kao i stanjem vlage u vanjskoj okolini. Rashlađenje pak nastaje isparavanjem sekreta sa površine sluznice (Watelet i Van Cauwenberge, 1999).



**Slika 3. Cilijarni pokreti. (Od Satir 1974)**

Za normalan rad cilija (Slika 3) potrebna je izotonična sredina, da je pH slabo alkalna kao i prisustvo stalne određene vlažnosti. Poremećaji ovih odnosa u nosu u raznim patološkim stanjima ugrožavaju funkciju cilija sa svim pratećim posljedicama. Stoga se u inflamatornim procesima i drugim stanjima kada treba smanjiti kongestiju sluznice nosa smiju upotrebljavati samo lijekovi u izotoničnim rastvorima slabo alkalnog karaktera, jer jedino takvi ne štete funkciji cilija. Masti kao podloga lijekovima ne smiju se upotrebljavati jer onesposobljavaju cilije i njihov ljepljiv "prekrivač" u obavljanju vrlo značajnih zaštitnih funkcija (Watelet i Van Cauwenberge, 1999).

Nosna šupljina je obložena sluznicom, koja je podložna cikličkim izmjenama debljine, a time i otpora zračnoj struji, koja kroz nju prolazi. Ciklus obično traje između 50 minuta i 6 sati u oko 80% populacije (Hasegawa i Kern, 1977), i očituje se u naizmjeničnoj kongestiji jedne, a zatim druge strane nosa (Kennedy i sar., 1988). Ovaj ciklus je pod utjecajem simpatičkih niti, koje uvjetuju vazokonstrikciju i niti parasimpatikusa, koje su odgovorne za vazodilataciju. Ukupni nosni otpor ostaje konstantan bez obzira na lokalizirane promjenjive kongestije obje strane nosa.

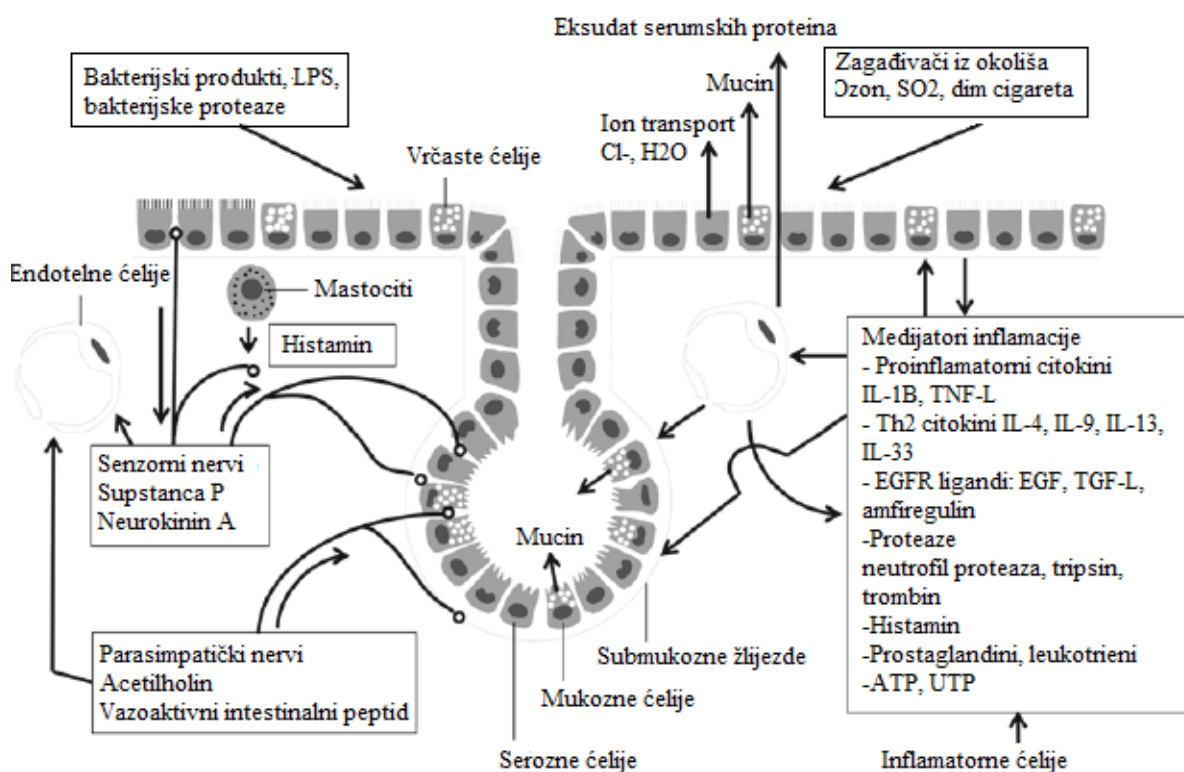
### **1.2.3.1. Mukocilijarni klirens**

#### **1.2.3.1.1. Mukus**

Mukusni prekrivač predstavlja fizičko-hemijsku barijeru, štiteći epitel od bakterija, virusa i inhaliranih čestica. Ima sljedeće funkcije: održava hidraciju, igra važnu ulogu u imunom sistemu zadržavajući na svojoj površini strane čestice, ima antioksidantnu i antimikrobnu funkciju. Ako bi se mukus zamjenio fiziološkom otopinom, čestice se ne bi pomjerale iako se cilije uveliko pomjeraju ka nazofarinksu (Sadé i sar., 1970). Mukocilijarni klirens predstavlja

fundamentalni mehanizam neophodan za održavanje zdravlja nosa. Mukus se sastoji od vode (95%), glikoproteina mucina (2%) te drugih proteina uključujući albumin, imunoglobuline, lizozim i laktoferin (1%), neorganske soli (1%) i lipide (<1%) (Mygind i Dahl, 1997).

Submukozne žlijezde i vrčaste ćelije su glavni izvor mukoznih glikoproteina. Proizvedeni mucin se deponuje u sekretorne granule smještene u citoplazmi, a oslobađa se egzocitozom koja je stimulirana inflamatornim medijatorima kao što su neuropeptidi, prostaglandini, leukotrieni, bakterijski produkti, neutrofil elastaze, inhalirani polutanti i nukleozidi. Ekstracelularno oslobođen nukleozid ATP aktivira P2Y2 purinergičke receptore na površini epitelijalnih ćelija što dovodi do oslobađanja kalcija i egzocitoze (Davis i Dickey, 2008).



**Slika 4. Različiti stimulusi, inflamatorni medijatori, faktori rasta, parasimpatički i senzorni nervi su uključeni u produkciju mukusa i sekreciju u nazalnoj sluznici (preuzeto iz Nasal Physiology and Pathophysiology, Onerci M).**

#### 1.2.3.1.2. Mukozni slojevi

Mukoza se sastoji iz dva sloja: vodene pericilijarne sol faze u sklopu čega se nalaze cilije koje se pokreću i površinskog gel sloja koji se pomjera unazad u skladu sa površinom cilija. Debljina oba sloja od oko 5 μm kao i njihov sastav važni su za mukocilijarni transport. Ako je sol sloj pretanak, cilijarno kretanje se prekida zbog viskoznog

površinskog sloja. Ako je predebeo, gel sloj gubi kontakt sa cilijama pa se narušava mehanizam mukocilijarnog klirensa. Oko 20-40 ml mukusa se luči u nosu sa 160cm<sup>2</sup> površine nazalne mukoze (Quraishi i sar., 1998), a 80% čestica većih od 12,5µm se filtrira prije nego dođu do ždrijela. Smjer pokretanja cilija je prema nazad ka nazofarinksu gdje nose mukus sa inhaliranim česticama koje mogu biti progutane ili iskašljane. Osim mukocilijarnog klirensa čestice se izbacuju puhanjem nosa i kihanjem. Studije su pokazale da je brzina klirensa 3-25 mm/min (oko 6 mm/min) kod zdravih osoba (Mygind N, Dahl R., 1997).

#### **1.2.4.Nazalni ciklus i zračni otpor**

Opis nazalnih cikličnih promjena je objasnio Kayser 1895. godine objašnjavajući je kao naizmjeničnu kongestiju i dekongestiju svakih 3-7 h. Guillerm je 1967. uz pomoć rinomanometrije otkrio da ukupni nazalni otpor ostaje isti uprkos kontinuiranim promjenama u dijametru lijeve i desne nosne šupljine (Guillerm i sar., 1971).

#### **1.2.5.Kondicioniranje zraka**

Za kondicioniranje (zagrijavanje) udahnutog zraka jako važnu funkciju ima nos zbog svojih sljedećih karakteristika:

- a) Oblik nazalnih šupljina osigurava bliski kontakt između udahnutog zraka i mukozne membrane
- b) Lumen šupljina se lako adaptira u skladu sa kontrakcijama krvnih sudova, prvenstveno venskih sinusoida
- c) Zagrijavanje je omogućeno proticanjem krvi kroz arteriovenske anastomoze (Mygind N, Dahl R., 1997).

#### **1.2.6.Filtracija**

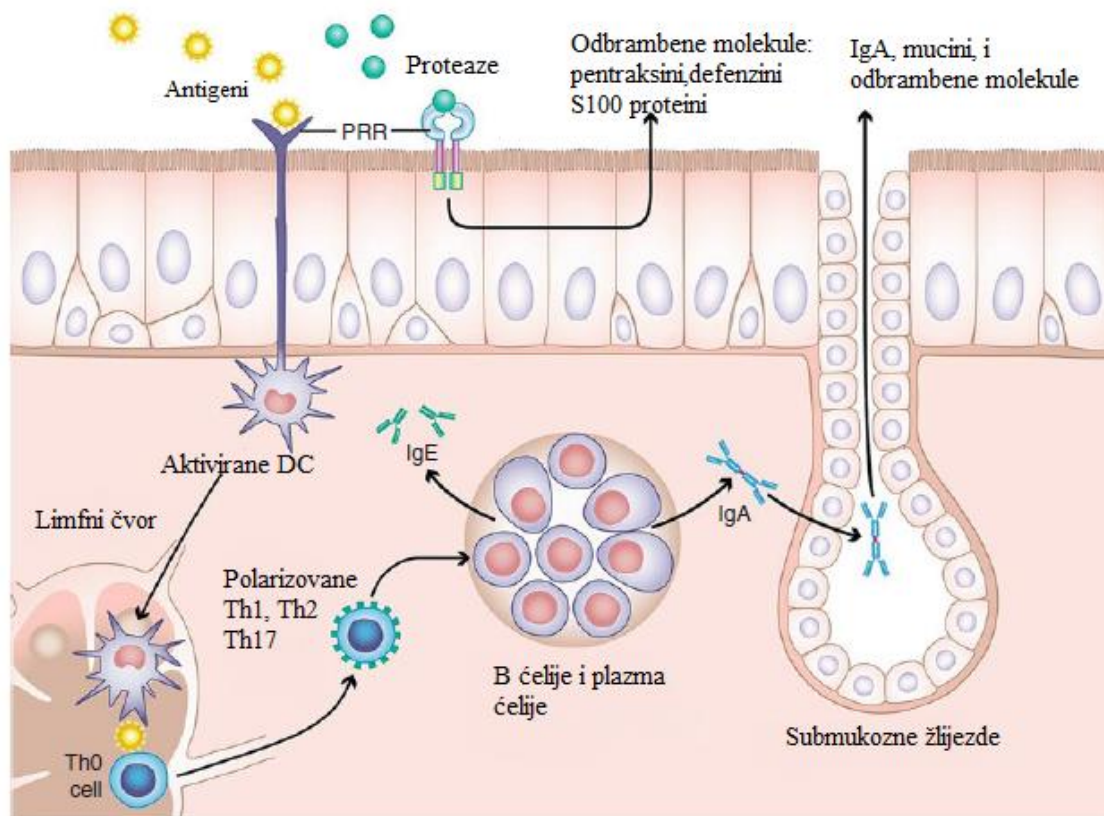
Da bi se izbjeglo prodiranje krupnih čestica u donje respiratorne puteve, čestice bivaju zarobljene u pericilijarni gel sloj mukusa na površini epitela i transportovane do ždrijela gdje bivaju progutane ili iskašljane. Gotove sve čestice veće od 10 µm se zadržavaju na površini sluznice nosa i bivaju odstranjene u roku od 30 minuta mukocilijarnim klirensom, dok čestice manje od 2 µm dolaze do donjeg respiratornog trakta (Mygind i Dahl, 1997).

### 1.2.7. Imunologija

Osim navedenih funkcija, nos služi i kao imunološka prepreka vanjskim antigenima. Veliki broj stranih čestica prvo ulazi u organizam kroz nos, te je stoga imunološki sistem nosa vrlo razvijen. Primarna komponenta imunološkog sistema je barijera napravljena od epitela koji prevenira infekciju uzrokovanu patogenima. Kada patogeni uspiju probiti barijeru, ćelije imunog sistema kao što su dendrične, NK, makrofagi i granulociti uništavaju ih. Unutar samog epitela nosne sluznice nalazi se veća količina sekretornog imunoglobulina (IgA), koji reaguje na specifične antigene, ali i lizozim, interferon  $\gamma$ , komponente komplementa i ostali nosioci nespecifične imunosti. Ispod epitela se nalazi lamina propria, gdje su koncentrovani elementi ćelijske imunosti: uglavnom granulociti, makrofagi, limfociti, plazma stanice, T- i B-limfociti, koji čine poseban sistem limfatičkog tkiva, koji je odgovoran za zaštitu sluznice gornjih disajnih puteva. To potvrđuje veliki relativan odnos limfocita prema monocitima/makrofagima (L:MO/MF) u zdravoj sluznici nosa i sinusa koji iznosi 10:1.

Kao što mukus ima odbrambenu ulogu kao barijera za hvatanje antigena i neželjenih čestica da ne dospiju u donji respiratorni trakt, tako i tečnost koja se luči iz nosa ima sastav sa imunološkim osobinama koji uključuje prisustvo imunoglobulina IgA, IgG, IgM, IgE, zaštitnih proteina tipa komplemenata, enzime kao što su laktoferin i lizozim, kao i prisustvo mastocita i limfocita u epitelu i limfocita i makrofaga u lamini proprii (Watelet i Van Cauwenberge, 1999).



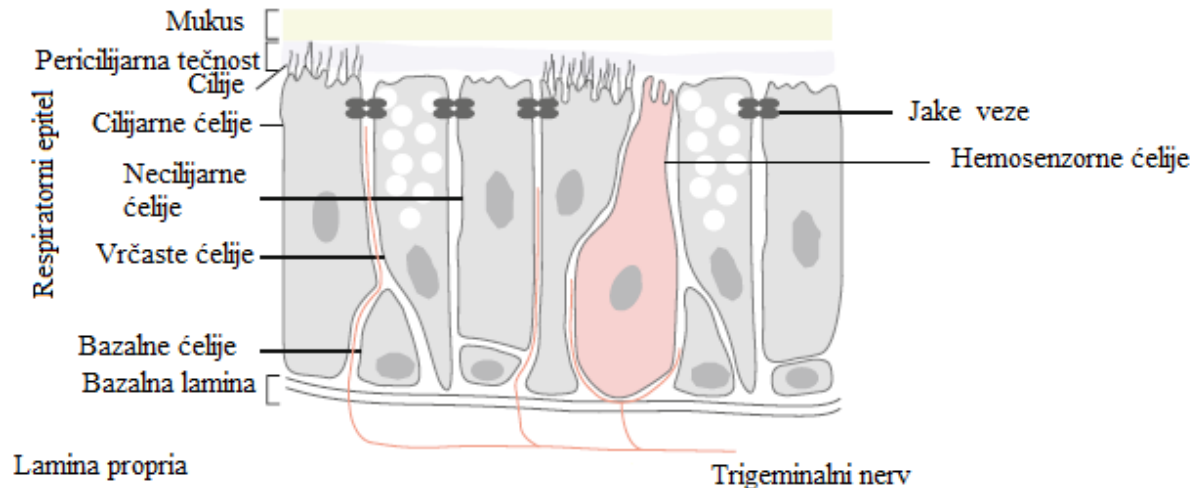


**Slika 5. Urođeni imunitet na površini epitela uključuje PAMP aktivaciju epitelijalnih PRR što dovodi do oslobađanja odbrambenih molekula. Egzogene proteaze mogu aktivirati PAR receptore ili pokidati vezane protein. Izlučeni IgA, mucini, antiproteaze i odbrambene molekule se oslobađaju na nazalnoj sluznici kako bi formirali drugu liniju urođenog imuniteta. Dovoljna PRR stimulacija aktivira dendritske ćelije uzrokujući migraciju do limfnih žlijezda kako bi otkrili antigene Th0 limfocitima. B ćelije se stimulišu na proliferaciju i diferencijaciju dovodeći do produkcije IgE, IgA i drugih imunoglobulina kao i stimulaciju ćelija stečenog imunog sistema (Meylan E i sar., 2006).**

### 1.2.8. Inervacija

Protok krvi kroz krvne sudove je kontrolisan autonomnim nervnim sistemom. Krvni sudovi koji imaju i simpatičku i parasimpatičku inervaciju su kontrolirani većinom simpatičkim vlaknima koji oslobađa noradrenalin i neuropeptid Y (NPY). Svi podtipovi  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  adrenergičkih receptora su zastupljeni na ovim krvnim sudovima, iako  $\alpha_{2c}$  receptor igra najvažniju funkciju u vazokonstrikciji (Stafford-Smith i sar., 2007). NPY receptori su lokalizovani na anastomozama (Baraniuk i sar., 1990). Kontinuirano oslobađanje noradrenalina održava sinusoidne djelimično u kontraktilnom stanju i uzrokuje redukciju u protoku krvi. Žlijezde su inervirane parasimpatičkim vlaknima. Nervna stimulacija holinoceptora na žlijezdama uzrokuje hipersekreciju. Vaskularizacija nosa i paranasalnih

šupljina potiče iz a. karotis interne i a. karotis eksterne. Sluznica nosa inervisana je senzitivnim nervima I i II grane trigeminusa (Cauna, 1970).



**Slika 6. Trigeminalna vlakna u bliskom kontaktu sa hemosenzornim ćelijama i trigeminalnim slobodnim nervnim završecima u nazalnom epitelu, odgovorna za hemosenzornu i somatosenzornu percepciju (preuzeto iz Nasal Physiology and Pathophysiology, Onerci M).**

### 1.3. Nazalni dekongestivi

Za kontrolu simptoma alergijskog i nealergijskog rinitisa kao i svih popratnih patoloških stanja veliku primjenu našli su nazalni dekongestivi. Oni izazivaju konstrikciju malih krvnih sudova i smanjuju sekreciju u nosu. Posljedično se smanjuje otok i čisti kongestivno područje. Postoje dvije klase nazalnih dekongestiva: simpatomimetski amini i imidazolini.

U simpatomimetske amine spadaju: pseudoefedrin, fenilefrin, efedrin, fenilpropanolamin (više se ne koristi u SAD), meskalin, amfetamin i benzedrin. U imidazoline spadaju: oksimetazolin, nafazolin, ksilometazolin, klonidin i lerimazolin (Hall, 2005; Graf i sar., 1968).

Simpatomimetski amini, dijelom, oponašaju simpatički nervni sistem kroz presinaptičko oslobađanje noradrenalina u sinaptičkim vlaknima. Noradrenalin se zatim veže postsinaptički na  $\alpha$  receptore uzrokujući vazokonstrikciju. Imidazolini se prema nekim izvorima navode kao primarno  $\alpha_2$  agonisti koji djeluju postsinaptički na simpatička vlakna uzrokujući

vazokonstrikciju. Takođe smanjuju produkciju endogenog noradrenalina putem negativne povratne sprege smanjujući protok krvi i vršeći dekongestij (Graf, 2005).

Mnoge simpatomimetičke supstance se koriste kao topikalni nazalni preparati sa ciljem ostvarivanja dekongestije. Topikalni dekongestivi imaju kratkodjelujući efekat u otklanjanju kongestije kao glavnog simptoma kod prehlade, alergijskog rinitisa, sinusitisa i otitis medie (Johnson i Hricik, 1993). Međutim, njihova nekontrolisana upotreba donosi rizik od razvoja *rebound* kongestije ili medikamentoznog rinitisa (Mortuaire i sar., 2013). Teorijski, rizik tako ozbiljnih neželjenih efekata bi se mogao spriječiti ili makar odgoditi polifarmakološkim pristupom što podrazumjeva modulaciju različitim ljekovitim supstancama u cilju postizanja optimalnog terapijskog ishoda u odnosu na monotargetni pristup (Besnard i sar., 2012; Peters, 2013).

Fenilefrin je široko korišten  $\alpha_1$  adrenergički agonist, koji vrši vazokonstrikciju na nazalnoj mukozi. Istraživanja su pokazala da je kontrakcija prouzrokovana fenilefrinom na corpus cavernosum kunića posredovana  $\alpha_{1B}$  podtipom receptora (Furukawa i sar., 1996). Druga studija sa selektivnim antagonistima za pojedine podtipove  $\alpha_1$  receptora je pokazala da se kontrakcija prouzrokovana fenilefrinom na pacovskoj aorti, mezenteričnoj arteriji i plućnoj arteriji odvija putem  $\alpha_{1D}$  podtipa receptora (Hussain i sar., 1997). Treća vrsta studija rađena na kavernozi arteriji kunića pokazala je da se aktivnost fenilefrina može antagonizirati samo sa  $\alpha_{1A}$  antagonistom, što bi značilo da su  $\alpha_{1A}$  receptori predominantno odgovorni za vazokonstrikciju penilne arterije (Morton i sar., 2007). Moglo bi se zaključiti na osnovu svih ovih podataka da su sve tri podvrste  $\alpha_1$  receptora uključene u vaskularne efekte fenilefrina.

Istraživanja su pokazala da imidazolinski dekongestivi djeluju ne samo preko  $\alpha$ -receptora nego i 5-HT receptora (Christ i Jean-Jacques, 1991; Law i sar., 1998; Schoeffter i Hoyer, 1991). Poznato je da je u sluznici nosa najveća zastupljenost  $\alpha$  receptora, čija je uloga vazokonstrikcija, i to preko  $\alpha_1$  se vrši vazokonstrikcija malih arterija i arteriola, dok je zastupljenost  $\alpha_2$  receptora najveća na venama, venulama i arteriovenskim anastomozama. Također, 5-HT<sub>1B</sub> receptori se nalaze u humanoju nazalnoj mukozi i igraju ulogu u regulaciji zračnog otpora i sekrecije (Uddman i sar., 2009). U venama, oksimetazolin i ksilometazolin su prepoznati kao visoko afinitetni agonisti 5-HT<sub>2B</sub> receptora (Huang i sar., 2009). Teorijski, aktivacija ovih receptora dekongestivima, u slučaju velike sistemske raspoloživosti, može uzrokovati rizik od nastanka valvularne srčane bolesti (Huang i sar., 2009; Hutcheson i sar., 2011).

Lerimazolin je internacionalni nezaštićeni naziv lijeka usvojen 2014. godine za 2-[(2,4,6-trimetilfenil) metil]-4,5-dihidro-1H-imidazol (INN, 2014), i predstavlja supstancu hemijski srodnu oksimetazolinu i ksilometazolinu. U kombinaciji sa fenilefrinom ovaj simpatomimetski imidazolin, patentiran 1963. godine (Zeile i sar., 1963), koristio se decenijama u nekoliko zemalja kao nazalni dekongestiv (Brayfield, 2014). Međutim, istraživanja na ovoj supstanci pod prijašnjim kodnim nazivom St-71, ili trivijalnim nazivima trimizolin ili trimazolin, malog su obima (Malta i sar., 1980; 1981; Nathanson, 1985; Boudier i sar., 1975), te je stoga farmakološki profil lerimazolina još uvijek nejasan. Zna se da lerimazolin ima afinitet za 5-HT<sub>1D</sub>, i manje za 5-HT<sub>1B</sub> receptore (Ki vrijednosti 72 prema 3480 nM) (Law i sar., 1998), dok je aktivnost na drugim serotoninskim i  $\alpha$  receptorima nedovoljno istražena. Važno za naglasiti je istraživanje kontraktilne aktivnosti lerimazolina na veni safeni kunića, koje su sproveli Law i saradnici (1998), otkrivši da se kontrakcija javlja na prostaglandin i  $\alpha$ -receptor nezavisan način.

Dekongestivna sredstva mogu biti tečne, polučvrste i čvrste konzistencije. Primjenjuju se peroralno ili lokalno u vidu kapi ili aerosola. Kao nazalni preparati, aplikuju se u nosnu šupljinu, sa ciljem postizanja prevashodno lokalnog djelovanja. Vodeni nazalni preparati su najčešće izotonični i sadrže pomoćne materije kojima se reguliše viskozitet i pH preparata, povećava solubilizacija aktivnih supstanci, kao i pogodne konzervanse kada preparat nema adekvatna antimikrobna svojstva. U praktičnoj primjeni, danas je komercijalno prisutan veći broj nazalnih preparata koji kao adrenergičke vazokonstriktore najčešće sadrže efedrin i fenilefrin. Kao farmaceutski aktivne supstance zastupljene su same, ili ponekad u kombinaciji sa drugim supstancama, radi povećanja efikasnosti preparata. Primjer takve kombinacije su Adrianol kapi (Zdravlje Actavis, Leskovac, Srbija), koje pored fenilefrin hidrohlorida sadrže i lerimazolin hidrohlorid kao adrenergički vazokonstriktor.

U ovoj doktorskoj disertaciji biće objašnjen profil vezivanja lerimazolina na pojedine podtipove receptora (afiniteti za  $\alpha_1$ , 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> i D2 receptore) i kompleksna vazoaktivnost koja se javlja na široko primjenjivanom modelu pacovske aorte (Rameshrad i sar., 2016), u prisustvu i odsustvu osam različitih selektivnih antagonista koji se vežu na  $\alpha$ -adrenergičke ili 5-HT receptore. Biće objašnjena i interakcija između lerimazolina i fenilefrina, s obzirom da se ova fiksna kombinacija nalazi godinama na tržištu pod komercijalnim nazivom Adrianol kapi, kao i uticaj različitih endotelnih faktora na odnos fenilefrina i lerimazolina. Konačno, biće sagledan i farmakokinetički profil lerimazolina, kao i *in vivo* profil uz korišćenje standardnih bihevioralnih testova.

### **1.3.1. Oksimetazolin i ksilometazolin kao preteče lerimazolina**

Tkivo nosne sluznice se kontrahuje kada se izloži standardnim topikalnim dekonjestivima kao što su oksimetazolin i ksilometazolin. Za glatke mišiće nazalne mukoze se smatra da su jedine ćelije koje posjeduju kontraktilnost u ovom tkivu (Fuder i sar., 1986).

Oksimetazolin i ksilometazolin spadaju u skupinu imidazolinskih nazalnih dekonjestiva, i ispoljavaju efekat preko  $\alpha_2$  adrenoceptora (Bylund i sar., 1994). Prethodne studije su pokazale da su  $\alpha_2$  receptori zastupljeni na psećoj (Berridge i sar., 1986), svinjskoj (Corboz i sar., 2003) i humanoj nazalnoj mukozi (Anderson i sar., 1984; Corboz i sar., 2005) i da se putem  $\alpha_2$  receptora ispoljava vazokonstrikcija na svinjskoj (Corboz i sar., 2005) i humanoj nazalnoj mukozi (Van Megen i sar., 1991). Haenisch i saradnici (2009) su dokazali da humana nazalna mukoza ispoljava svih šest podvrsta  $\alpha$  receptora, ali da su najviše zastupljeni  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{2A}$ - i  $\alpha_{2B}$ -adrenoceptori. Ksilometazolin ispoljava efekat samo na  $\alpha_{2B}$  receptoru dok je oksimetazolin potentniji na  $\alpha_{2B}$  receptoru nego na  $\alpha_{1A}$  receptoru na kome ima slab parcijalni agonistički efekat (Fuder i sar., 1985).

Međutim, imidazolini takođe prepoznaju i druge, "ne- $\alpha$ " receptore koji kontrolišu krvni pritisak (Eglen i sar., 1998) i simpatičku neurotransmisiju u vaskulaturi (Gothert i sar., 1995). "Ne- $\alpha$ " receptori podrazumjevaju serotoninske receptore i to 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> i 5-HT<sub>1D</sub> receptore na kojima oksimetazolin ispoljava agonistički efekat istog intenziteta kao i na  $\alpha_2$  receptorima (Fuder i sar., 1985).

Postoji više ispitivanja dejstva oksimetazolina u kombinaciji sa različitim supstancama na izolovanim organima, najčešće ljudskoj nazalnoj sluznici, kao što su: oksimetazolin i tetrakain na nazalnoj sluznici zdravih dobrovoljaca (Cacek i sar., 2016), oksimetazolin i mometazon furoat na sluznici nosa (Meltzer i sar., 2013), oksimetazolin i ipratropijum-bromid u eksperimentalnoj rinovirusnoj infekciji (Pitkaranta i sar., 1998). Međutim, izostaju ispitivanja na drugim supstancama koje bi imale kao primarnu farmakološku aktivnosti promjenu stanja vaskularnog tonusa.

### **1.3.2. Farmakologija simpatomimetičkih supstanci**

Simpatički nervni sistem ima važnu ulogu u radu organa kao što su srce i periferna vaskulatura, pogotovo u odgovoru na stres. Efekti stimulacije simpatičkog nervnog sistema se odvijaju putem oslobađanja noradrenalina iz nervnih završetaka koji aktiviraju receptore na postsinaptičkim vlaknima. Takođe u odgovoru na različite stimuluse kao što je stres,

oslobađa se adrenalin koji se transportuje putem krvi do ciljnih organa. Supstance koje oponašaju djelovanje adrenalina i noradrenalina se nazivaju simpatomimetičke supstance. Neke od njih djeluju direktno na aktivne adrenoreceptore (adrenalin i noradrenalin) dok druge djeluju indirektno: ili istiskivanjem deponovanih kateholamina iz vezikula (amfetamin i tiramin), ili inhibicijom preuzimanja kateholamina u nervne završetke (kokain i triciklični antidepresivi).

### **1.3.2.1. Molekularni mehanizmi simpatomimetika**

Efekti kateholamina se ispoljavaju putem površinskih receptora, tj. receptora vezanih za G-proteine (GPCR). To su transmembranski receptori koji su povezani sa intracelularnim efektornim sistemima preko G-proteina. Ovi proteini su posrednici (eng. *go between*), ali im slovo G u nazivu potiče od toga što stupaju u interakciju sa gvaninskim nukleotidima u sastavu GTP i GDP. G-proteini se sastoje iz tri subjediniice,  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . Gvaninski nukleotidi vezani su za  $\alpha$  subjedinicu, koja je enzimski aktivna i katalizuje konverziju GTP u GDP.  $\beta$  i  $\gamma$  subjediniice ostaju zajedno i formiraju  $\beta\gamma$  kompleks. Postoje tri glavne grupe G-proteina: Gs izaziva stimulaciju adenilat ciklaze, Gi dovodi do inhibicije adenilat ciklaze i Gq koji povezuje  $\alpha$  receptor sa fosfolipazom C. Kada se molekul  $\alpha$  agoniste veže za GPCR, dolazi do konformacionih promjena uz sticanje visokog afiniteta za  $\alpha\beta\gamma$  trimer. Udruživanje ovog  $\alpha\beta\gamma$  trimera sa receptorom izaziva disocijaciju GDP i on biva zamjenjen sa GTP što za uzvrat dovodi do disocijacije G-protein trimera, oslobađajući  $\alpha$ -GTP i  $\beta\gamma$  subjediniice. Ova aktivna forma G-proteina difunduje u membranu i reguliše aktivnost efektor adrenoceptora u koje spada adenilat ciklaza, fosfolipaza C i jonski kanali (Gudermman i sar., 1996; Milligan, 1995).

### **1.3.2.2. $\alpha$ adrenergički receptori**

Nastojanje da se razumiju molekularni mehanizmi kojim kateholamini djeluju ima dugu historiju. Ahlquist je 1948. godine otkrio da kateholamini djeluju preko dvije vrste receptora:  $\alpha$  i  $\beta$ . Kasnije studije sa agonistima i antagonistima dokazale su postojanje dva glavna tipa  $\alpha$ -adrenergičkih receptora ( $\alpha_1$  i  $\alpha_2$ ) i tri podtipa  $\beta$ -adrenergičkih receptora. Koncept podtipova  $\alpha_1$  grupe proizašao je iz farmakoloških eksperimenata koji su pokazali kompleksne oblike dozno zavisnih krivih glatko mišićne kontrakcije kao i razlike u afinitetima antagonista u inhibiranju kontrakcije u različitim tkivima. Označeni su kao  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  i  $\alpha_{1D}$  receptori.

Receptori  $\alpha_2$  grupe se dijele na  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  i  $\alpha_{2C}$  podtipove koji su otkriveni farmakološkim tehnikama i molekularnim kloniranjem (Proctor i sar., 1976).

Gq proteini vezuju  $\alpha_1$  receptor za enzim fosfolipazu C i dovode do formacije inozitol-1,4,5-trifosfata ( $IP_3$ ) i diacilglicerola (DAG). Inozitol trifosfat je medijator rastvorljiv u vodi, oslobađa se u citoplazmi i djeluje na  $IP_3$  receptor koji predstavlja ligand zavisni kalcijumski kanal na membrani endoplazmatskog retikuluma. Glavna uloga  $IP_3$  je kontrola oslobađanja  $Ca^{2+}$  iz intracelularnih depoa, što povećava koncentraciju  $Ca^{2+}$  u citoplazmi i aktivaciju različitih kalcij-zavisnih protein kinaza.  $IP_3$  se konvertuje u ćeliji do 1,3,4,5-tetrafosfata ( $IP_4$ ) putem specifične kinaze. Glavni efekat diacilglicerola je aktivacija protein kinaze C (PKC), koja katalizuje fosforilaciju različitih intracelularnih proteina (Gudermman i sar., 1996).

Adrenergički  $\alpha_2$  receptori inhibiraju adenilat ciklazu preko Gi proteina i posljedično smanjuju nivo cAMP. cAMP je nukleotid sintetisan unutar ćelije iz ATP, pod uticajem enzima vezanog za membranu, tj adenilat ciklaze, a inaktivise se fosfodiesterazom (Gudermman i sar., 1996).

### 1.3.2.3.5-HT receptori

Uzimajući u obzir afinitete selektivnih liganada (agonista i antagonista), homologiju sekvenci i intracelularni transdukcijski sistem, serotoniniski receptori su klasifikovani na 7 glavnih tipova receptora, 5-HT<sub>1-7</sub>, od kojih se tipovi 1 i 2 dalje dijele u podtipove. Sa ukupno 14 podtipova: 13 receptora vezanih za G-proteine (GPCR) i još jednim jonotropnim receptorom (5-HT<sub>3</sub>), 5-HT receptori drže rekord po raznolikosti (Hoyer i sar., 1994). Serotoniniski GPCR vezuju se za sva tri signalna puta, kroz  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_{q/11}$ , i  $G\alpha_s$ . 5-HT<sub>1</sub> podvrsta koja se sastoji od 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub> i 5-HT<sub>1F</sub> se veže za  $G\alpha_i$  dovodeći do inhibicije adenilat ciklaze i smanjenja intracelularnog cAMP (Bockaert i sar., 1987; Lin i sar., 2002).

I danas se polemise oko postojanja humanog ortologa 5-HT<sub>1B</sub> receptora, budući da ovaj receptor ostvaruje pojedine efekte kod glodara (Hoyer i sar., 1992) koji nisu slični sa humanim (Peroutka, 1994). Uzimajući u obzir tu činjenicu, 5-HT<sub>1D $\alpha$</sub>  i 5-HT<sub>1D $\beta$</sub>  podklasa receptora su klasifikovani kao humani ortologi (Hoyer i Middlemiss, 1989). Kloniranjem pacovskog/mišjeg 5-HT<sub>1B</sub> receptora i humanog 5-HT<sub>1D $\beta$</sub>  receptora pokazalo je da ove podvrste ispoljavaju visoku strukturnu homologiju (97%) (Adham i sar., 1992) sa razlikom u jednoj aminokiselini koja mutacijom rezultira u prebacivanju farmakoloških efekata sa 5-HT<sub>1D</sub> na 5-HT<sub>1B</sub> receptor (Oksenberg i sar., 1992). Nasuprot tome, kada je pacovski/mišji 5-HT<sub>1D $\alpha$</sub>  receptor kloniran, pokazalo se da ova podvrsta ne pokazuje varijacije u svojim

karakteristikama. Distribucija mRNA pokazuje da je 5-HT<sub>1D $\alpha$</sub>  različit od h5-HT<sub>1B</sub> receptora iako postoji visoka homologija između njih. 5-HT<sub>1D $\alpha$</sub>  receptor je homologan sa pacovskim 5-HT<sub>1D</sub> receptorom (Herrick-Davis i Titeler, 1988). Naučno utvrđena činjenica je da su 5-HT<sub>1B</sub>/5-HT<sub>1D $\beta$</sub>  receptori dominantni (Hoyer D i sar., 1994). U studijama gdje se postavljalo pitanje da li su efekti izazvani vezivanjem na 5-HT<sub>1D</sub> receptorima usljed aktivacije 5-HT<sub>1D $\alpha$</sub>  ili 5-HT<sub>1D $\beta$</sub>  receptora kod kontrakcije koronarne arterije (Kaumann i sar., 1994) ili kranijalnih krvnih sudova (Hamel i sar., 1993) zaključeno je da su 5-HT<sub>1D $\beta$</sub>  receptori dominantni. Bez obzira na to koja vrsta receptora je uključena, 5-HT<sub>1B</sub> ili 5-HT<sub>1D $\beta$</sub>  receptori igraju glavnu ulogu u kontrakciji (Hoyer D i sar., 1994). Međutim, ostaje da se istraži kontraktilna uloga 5-HT<sub>1D $\alpha$</sub>  na krvnim sudovima. 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptori dovode do inhibicije adenilat ciklaze smanjujući intracelularni cAMP, demonstrirano je in vivo u substantia nigra (Bouhelal i sar., 1988; Schoeffter i sar., 1988) i mezenteričnoj arteriji kunića (Hinton i sar., 1999). Ekspresija 5-HT<sub>1B</sub> receptora je najveća u humanim cerebralnim arterijama (Nilsson i sar., 1999).

G $\alpha_{q/11}$  - vezani receptori podrazumjevaju 5-HT<sub>2</sub> tip, odnosno 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> i 5-HT<sub>2C</sub> receptore. Oni aktivirajući fosfolipazu C dovode do stvaranja inozitol trifosfata (IP3) i diacilglicerola (DAG) i posljedičnog povećanja intracelularnog kalcija (Roth i sar., 1984; Roth i sar., 1998). Diacilglicerol aktivira protein kinaze vezane za membranu, prevashodno protein kinazu C, koja katalizira fosforilaciju različitih intracelularnih proteina i koja je odgovorna za otvaranje voltažno zavisnih Ca<sup>2+</sup> kanala. 5-HT<sub>2A</sub> receptor je široko ispitivan zbog rasprostranjenosti u korteksu (Willins i sar., 1997), uloge u razvoju halucinacija i efektivnosti kao ciljnog receptora za mentalne bolesti kao što je shizofrenija, depresija i Tourett-ov sindrom (Meltzer i Roth, 2013). Kod pacovske aorte, 5-HT<sub>2A</sub> receptor aktivira voltažno zavisni Ca<sup>2+</sup>-kanal neovisno od fosfolipazom C prouzrokovane hidrolizom fosfoinozitola.

G $\alpha_s$  receptori podrazumjevaju 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> i 5-HT<sub>7</sub> (Roth i sar., 1998).



## 1.4.Lerimazolin

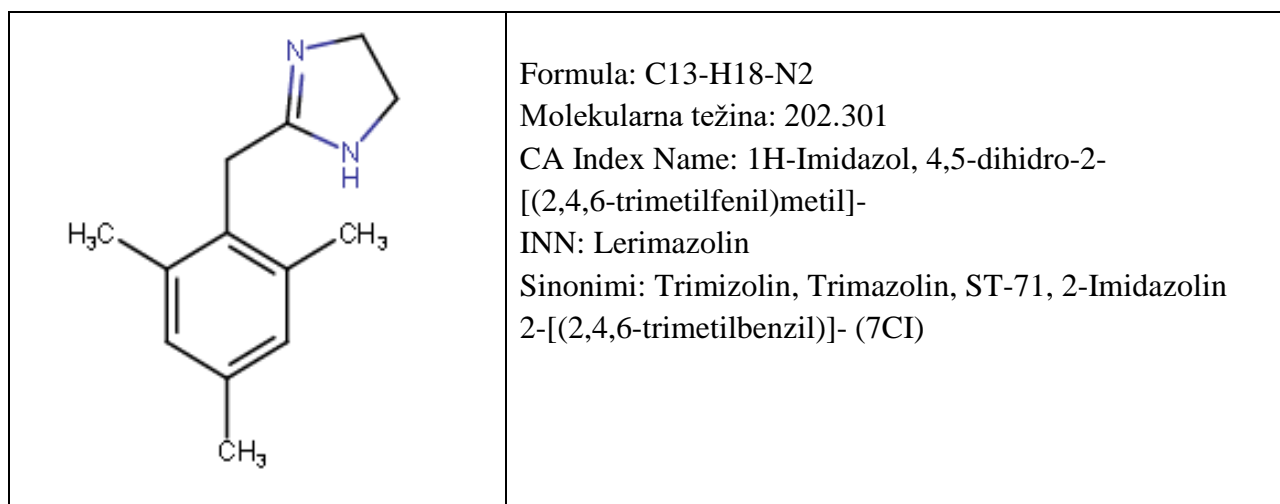
### 1.4.1.Historija lerimazolina

Lerimazolin je internacionalni nezaštićeni naziv (INN) za supstancu koju je farmaceutska kompanija Boehringer Ingelheim G.m.b.H iz Njemačke patentirala 1961. godine. Od 1965. godine dolazi na tržište u kombinaciji sa fenilefrin hidrohloridom i koristi kao nazalni dekongestiv. Nakon isteka patenta, sredinom 1970-ih lerimazolin se javlja u tadašnjoj SFRJ pod zaštićenim nazivom Adrianol i Adrianol T kapi (Zdravlje, Leskovac) i od tada do danas se nalazi registrovan u više zemalja, uključujući i Srbiju i Bosnu i Hercegovinu. Sve do 2014. godine, lerimazolin se u naučnoj literaturi nalazio pod trivijalnim nazivima trimazolin, trimizolin i kodnim nazivom ST-71, a 2014. godine po prvi put dobija INN – lerimazolin od strane Svjetske zdravstvene organizacije. Veći istraživački interes za lerimazolin se javlja početkom 1980-ih godina kada Nathanson pokazuje da supstanca ispoljava parcijalni agonistički efekat na signalni transdukcioni sistem koji koristi jedan od amina u tragovima, oktopamin. Law i saradnici (1998) su dokazali da lerimazolin ispoljava nanomolarni afinitet za 5-HT<sub>1D</sub> receptore ( $K_i = 72 \pm 12$  nM) i mikromolarni afinitet za 5-HT<sub>1B</sub> receptore ( $K_i = 3480 \pm 1690$  nM) i da snažno kontrahuje venu safenu kunića putem prostaglandin- i  $\alpha$  adrenergički-nezavisnog mehanizma. Bhattacharya i saradnici (2003) su dokazali da se kontrakcija istog krvnog suda ispoljava samo putem 5-HT<sub>1B</sub> receptora. Ova informacija je značajna uzimajući u obzir da su ovi receptori jako zastupljeni na humanoj nazalnoj mukozi (Uddman i sar., 2001) i da serotonin igra važnu ulogu u regulaciji vaskularnog tonusa, sekrecije žlijezda i funkciji epitela. Zbog odsustva *in vitro* podataka afiniteta i efikasnosti, a na osnovu drugih eksperimenata sa lerimazolinom (Malta i sar., 1980. i 1981), može se hipotetisati da lerimazolin ispoljava parcijalni agonizam na  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  receptorima; eventualna uporedna aktivnost na 5-HT<sub>1B/1D</sub> i  $\alpha$  adrenergičkim receptorima može da rezultira u složenim međusobnim interakcijama (Molderings i Gothert, 1990).

### 1.4.2.Fizičke i hemijske osobine lerimazolina

Na tržištu je prisutan veći broj nazalnih preparata koji kao adrenergičke vazokonstriktore sadrže efedrin i fenilefrin. Zastupljeni su kao monokomponentni proizvodi ili u kombinaciji sa drugim supstancama različitog dejstva, u cilju povećanja efikasnosti lijeka. Jedan od takvih je i dekongestivni preparat Adrianol kapi (Zdravlje-Actavis, Leskovac, Srbija) koji sadrži kombinaciju fenilefrin hidrohlorida i lerimazolin hidrohlorida. Mnoge metode su

objavljene u literaturi za analizu fenilefrin hidrohlorida, međutim u farmakopejama i stručnoj literaturi nema podataka o lerimazolinu i metodama za njegovo istraživanje. Patentna literatura je sadržavala samo podatke o sintezi lerimazolina bez fizičko-hemijske, spektroskopske i ostalih metoda istraživanja sve do 2008. i 2009. godine kada su publikovani sistemski analiza i kvantitativno određivanje lerimazolina RP-HPLC metodom (Nikolić i sar., 2008; Savić i sar., 2009). Parametri ispitivanja fizičkih osobina lerimazolina prikazani su u Tabeli 2.



**Slika 7. Strukturna formula i nazivi lerimazolin hidrohlorida**

Lerimazolin hidrohlorid je kristalna supstanca bijele boje i gorkog okusa, rastvor je bistar i bezbojan. Ispitivanjem ponašanja pri žarenju, obzirom na to da se ugljeniše i izgara bez ostatka, može se zaključiti da je supstanca organskog porijekla. Elementarnom analizom ispitivanog uzorka lerimazolin hidrohlorida utvrđen je sljedeći sadržaj elemenata: 65,39% C, 11,73% N i 14,84% Cl. Na osnovu elementarne analize potvrđena je empirijska formula C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>Cl ispitivane supstance koja se koristi za izradu preparata Adrianol. Ispitivanjem rastvorljivosti uzorka utvrđeno je da se 1 g lerimazolina rastvara u 1 cm<sup>3</sup> vode što bi značilo dobru rastvorljivost u vodi, dok je umjereno rastvoran u etanolu i nerastvoran u etru i acetonu jer je 1g lerimazolina netopiv u 10 dm<sup>3</sup> etra i acetona (Nikolić i sar., 2008).

**Tabela 2. Parametri fizičkog ispitivanja lerimazolin hidrohlorida**

Parametri ispitivanja	Koncentracija	Vrijednosti
Temperatura topljenja (°C)	-	279-280
pH vrijednost	0,5 mg cm <sup>-3</sup>	5,56
Relativna gustina	0,5 mg cm <sup>-3</sup>	1,0115
Indeks refrakcije, <i>n</i>	0,5 mg cm <sup>-3</sup>	1,3323
Viskozitet, $\eta$ (mPs)	0,5 mg cm <sup>-3</sup>	91,364
Provodljivost, $\kappa$ ( $\mu$ S)	0,5 mg cm <sup>-3</sup>	229

**\*Preuzeto iz Savić i sar., 2009.**

## 2.CILJEVI ISTRAŽIVANJA

S obzirom da su *in vitro* ispitivanja vazokonstriktorne aktivnosti lerimazolina nepotpuna, a mehanizam dejstva još uvijek u potpunosti nepoznat, naše istraživanje imalo je za cilj omogućiti ispitivanje mehanizma kontraktilnog dejstva lerimazolina, kao i uticaja lerimazolina na kontraktilno dejstvo fenilefrina na segmentima torakalne arterije Wistar pacova. Dodatno, cilj je bio *in vivo* utvrditi profil aktivnosti lerimazolina u oblasti bihevioralne farmakologije

Shodno navedenom, postavljeni su slijedeći ciljevi istraživanja, koje se odvijalo u četiri faze:

1. Određivanje afiniteta vezivanja lerimazolina za pojedine podtipove receptora.
2. a) Ispitivanje efekta i mehanizma dejstva lerimazolina: dodavanje kumulativno rastućih koncentracija fenilefrina u cilju formiranja kontrolne krive; ispitivanje efekta lerimazolina, primjenom kumulativno-rastućih koncentracija lerimazolina, na bazalni tonus segmenata torakalne arterije pacova; ispitivanje mehanizma potencijalnog kontraktilnog efekta lerimazolina primjenom selektivnih  $\alpha$  adrenergičkih i serotoninskih antagonista prije druge koncentracijski-zavisne krive lerimazolina;  
b) Ispitivanje odnosa fenilefrin-lerimazolin: ispitivanje dejstva lerimazolina na kontraktilnu funkciju fenilefrina primjenom različitih koncentracija lerimazolina prije koncentracijski-zavisne krive fenilefrina; ispitivanje uticaja endotel-oslobađajućih faktora i pojedinih podtipova receptora na krvnom sudu na odnos lerimazolin-fenilefrin u prisustvu i odsustvu lerimazolina.
3. Određivanje farmakokinetičkog profila lerimazolina, ukupne koncentracije i slobodne frakcije lerimazolina u mozgu i plazmi pacova
4. Primjenom široko upotrebljivanih testova u oblasti bihevioralne farmakologije, kao i povezivanjem bihevioralnih efekata sa dostupnim *in vitro* profilima, utvrđeni su efekti lerimazolina u standardnim bihevioralnim testovima: test spontane lokomotorne aktivnosti (SLA), uzdignuti plus lavirint (EPM), rotarod test i test pentilentetrazolom izazvane konvulzivne aktivnosti.

## 3. MATERIJAL I METODE

### 3.1. Životinje

Sva *in vitro* i *in vivo* bihejvioralna ispitivanja, kao i određivanje koncentracije izabраниh supstanci u serumu/plazmi i moždanom tkivu, sprovedena su na zdravim albino pacovima *Wistar* soja, starosti 8–10 nedjelja, tjelesne mase 200–250 g, odgajanim na farmi Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Etičku dozvolu za sprovođenje oglеda izdalo je Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije – Uprava za veterinu, pod brojem 323-07-09231/2016-05/4. Pacovi su držani u standardnim kavezima od pleksiglasа (42 cm × 26,5 cm × 18 cm), u grupi po četiri do šest životinja u kavezu, smještenim u vivariјumu Farmaceutskog fakulteta, pod standardnim uslovima čuvanja (temperatura vazduha  $22 \pm 1$  °C, relativna vlažnost vazduha 40-70%, i dnevno/noćnom ciklusu od 12 h – osvjetljenje od 6 h do 18 h), sa obezbjeđenim slobodnim pristupom peletiranoј hrani (Veterinarski institut, Zemun) i pijaćој vodi. Period adaptacije na laboratorijske uslove traje najmanje pet dana i sve planirane procedure se obavljaju između 9 i 16 časova.

U istraživanju je korišten „međugrupni” dizajn (eng. between-subject design), odnosno, različiti tretmani su primjenjivani na različitim, nezavisnim grupama životinja. Odabrani broj životinja u grupi u bihejvioralnim testovima (6–8 po pojedinačnom tretmanu) bio je prilagođen j povećanoј varijabilnosti rezultata svojstvenoj ovom dizajnu (Kelley, 1993) i predstavlja minimalan broj životinja neophodnih za detektovanje biološki relevantnih efekata i postizanje cilja istraživanja, što smanjuje potrebu za ponavljanjem rezultata eksperimenata (Festing i Altman, 2002). Za farmakokinetička mjerenja i određivanje koncentracija u biološkom materijalu u grupi se nalazilo 3 pacova.

### 3.2. Supstance

U eksperimentima su korištene sljedeće supstance:

Supstanca	Hemijski naziv (na engleskom) i in vitro profil	Izvor
<b>Lerimazolin</b>	1H-Imidazole,4,5-dihydro-2-[(2,4,6-trimethylphenyl)methyl]-	Zdravlje Actavis (Leskovac)
<b>Fenilefrin</b>	3-[(1R)-1-hydroxy-2-methylaminoethyl]phenol, $\alpha_1$ agonist	Zdravlje Actavis (Leskovac)
<b>SB 224289</b>	[4-[2-methyl-4-(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenyl]phenyl]-(1'-methylspiro[6,7-dihydro-2H-furo[2,3-f]indole-3,4'-piperidine]-5-yl)methanone; 5-HT <sub>1B</sub> antagonist	Tocris (Bristol, UK)
<b>BRL 15572</b>	3-[4-(3-chlorophenyl)piperazin-1-yl]-1,1-di(phenyl)propan-2-ol; 5-HT <sub>1D</sub> antagonist	Tocris (Bristol, UK)
<b>JP 1302</b>	N-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]acridin-9-amine; $\alpha_2c$ antagonist	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
<b>Ketanserin</b>	3-[2-[4-(4-fluorobenzoyl)piperidin-1-yl]ethyl]-1H-quinazoline-2,4-dione; 5-HT <sub>2A</sub> antagonist	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
<b>Metiotepin</b>	1-methyl-4-(8-methylsulfanyl-5,6-dihydrobenzo[b][1]benzothiepin-6-yl)piperazine; neselektivni 5-HT antagonist	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
<b>RX 821002</b>	2-(2-methoxy-3H-1,4-benzodioxin-2-yl)-4,5-dihydro-1H-imidazole; $\alpha_2$ antagonist	Tocris (Bristol, UK)
<b>Rauvolscin</b>	methyl (1S,15S,18S,19S,20S)-18-hydroxy-1,3,11,12,14,15,16,17,18,19,20,21-dodecahydroyohimban-19-carboxylate; $\alpha_2$ antagonist	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
<b>Prazosin</b>	[4-(4-amino-6,7-dimethoxyquinazolin-2-yl)piperazin-1-yl]-furan-2-ylmethanone; $\alpha_1$ antagonist	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
<b>SB 266970</b>	3-[(2R)-2-[2-(4-methylpiperidin-1-yl)ethyl]pyrrolidine-1-sulfonyl]phenol; 5-HT <sub>7</sub> antagonist	Tocris (Bristol, UK)
<b>OHB12</b>	NO hvatač	Tocris (Bristol, UK)
<b>L-NAME</b>	methyl (2S)-2-amino-5-(1-nitrocarbamidamido)pentanoate; NOS inhibitor	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
<b>Indometacin</b>	2-[1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methylindol-3-yl]acetic acid; inhibitor ciklooksigenaze	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
<b>Tetraetilamonijum (TEA)</b>	Tetraethylammonium;neselektivni blokator K <sup>+</sup> kanala	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
<b>Pentilentetrazol (PTZ)</b>	6,7,8,9-tetrahidro-5H-tetrazolo[1,5-a]azepin (prokonvulzivni agens)	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
<b>Vehikulum</b>	85% destilovana voda,14% propilen glikol i 1% Tween 80	Savić i sar., 2004

Sve supstance korištene za *in vitro* ispitivanja, rastvarane su u destilovanoj vodi, osim SB 224289, BRL 15572, JP 1302 i indometacin koji su rastvoreni u 1% DMSO. Za *in vivo* ispitivanja korišten je lerimazolin u različitim koncentracijama, RX 821002 kao i pentilentetrazol. Sve ostale supstance nabrojane u tabeli su korištene za *in vitro* ispitivanja. Osnovni rastvori su pripremani svakog dana.

Sve supstance korištene za *in vivo* ispitivanja rastvarane su u fiziološkom rastvoru. Aktivne supstance, kao i rastvarači u kontrolnim grupama (fiziološki rastvor), primjenjivane su intraperitonealno (i.p.), u dozi od 2 ml/kg tjelesne mase eksperimentalne životinje, 20 min prije bihevioralnog testiranja, odnosno u odgovarajućem trenutku prije žrtvovanja za određivanje koncentracije u uzorcima seruma/plazme i moždanog tkiva. Ukoliko su eksperimenti podrazumjevali primjenu dvije supstance, one su aplikovane na dva različita mjesta ubrizgavanja, a svaka životinja je primala ukupnu dozu od 2 ml/kg ispitivanih supstanci ili odgovarajućih rastvarača.

### **3.3. Određivanje afiniteta vezivanja lerimazolina na pojedine podtipove receptora**

#### **Pripremanje membrane, radioligand-vezujući esej i analiza**

Specifični afiniteti vezivanja su određivani mjereći obim istiskivanja tricijumom [<sup>3</sup>H] označenog specifičnog liganda proizvođača Perkin Elmer LAS GmbH, Rodgau, Njemačka. [<sup>3</sup>H] Spiperon (spec. akt. 73,36 Ci mmol<sup>-1</sup>), 8-Hidroksi-[<sup>3</sup>H] DPAT (spec. akt. 142 Ci mmol<sup>-1</sup>), [<sup>3</sup>H] Ketanserin (spec. akt. 47.3 Ci mmol<sup>-1</sup>) i [<sup>3</sup>H] Prazosin (spec. akt. 81.7 Ci mmol<sup>-1</sup>) su korišteni, redom, za označavanje dopaminskih D<sub>2</sub> receptora, serotoninских 5-HT<sub>1A</sub> receptora, serotoninских 5-HT<sub>2A</sub> receptora i α<sub>1</sub> receptora na pacovskim strijatalnim i kortikalnim sinaptozama u koncentracijama 10<sup>-4</sup> – 10<sup>-10</sup> M.

Nespecifično vezivanje je izmjereno u prisustvu 10 μM spiperona (D<sub>2</sub>), 10 μM buspirona (5-HT<sub>1A</sub>), 10 μM ketanserina (5-HT<sub>2A</sub>) i 10 μM prazosina (α<sub>1</sub>). Tube za analizu (0,4 ml ukupne zapremine mješavine za inkubaciju dopaminskih D<sub>2</sub> receptora i 0,2 ml ukupne zapremine mješavine za inkubaciju serotoninских 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> i adrenergičkog α<sub>1</sub> receptora) su inkubirane 10 minuta na 37 °C i reakcija se završila vakumskom filtracijom kroz Whatman GF/C filtere. Filteri su ispirani dva puta sa 5 ml ledenog pufera za inkubaciju. Zadržana radioaktivnost se mjerila uvođenjem osušenih filtera u 4 ml na toluenu zasnovane scintilacijske tečnosti i brojanjem u scintilacijskom brojaču 1219 Rackbeta Wallac (EG&G

Wallac, Turku, Finland). Kompeticijske krive vezivanja su konstruisane i analizirane programom GraphPad Prism (v.4.0).

### **3.4. In vitro ispitivanje**

Pacov je standardna eksperimentalna životinja preporučena kod ispitivanja kontraktilnog dejstva supstanci kada se od rezultata studije očekuje ekstrapolacija dobivenih rezultata na čovjeka. Pacovi su eutanizirani karbon dioksidom, nakon čega je torakalna arterija izolovana, očišćena od adhezivnog tkiva u Krebsovom rastvoru u Petrijevoj šolji, isječena na segmente od 3 mm i postavljena u vodeno kupatilo za ispitivanje kontraktilnog dejstva lerimazolina. Postavljanje se odvijalo na sljedeći način: kroz lumen krvnog suda su provučena dva držača od nerđajućeg čelika koji se uranjaju u kupatilo za izolovane organe sa četiti kanala volumena 25 ml, koje je bilo ispunjeno Krebs bikarbonatnim rastvorom (118,3 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub> X 7H<sub>2</sub>O, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i 11 mM glukoze), i oksigenisano mješavinom 95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub>, dok se temperatura održava na 37°C, pH=7,4. Donji držač je bio fiksiran za kanilu, a gornji je vezan za transdjuser (MLT0201, Panlab, Španija) kojim se podešavalo opterećenje preparata pomjeranjem držača mikrometarskim zavrtnjem. Segmenti arterija su postepeno istezani do optimalne tačke zatezanja (2 g). Dok se izometrijska tenzija preparata registruje preko transdjusera, promjene u izometrijskoj tenziji su se detekovale preko LabChart 6 Pro softvera a signal je digitaliziran preko PowerLab/4SP sistema (ADIInstruments, Castle Hill, Australia).

#### **3.4.1. Eksperimentalni protokol za ispitivanje efekta i mehanizma dejstva lerimazolina**

U početnom dijelu eksperimenta integritet endotela se ispitivao tako što je na prekontrakciju pacovske aorte sa 10<sup>-4</sup> M fenilefrina dodavan acetilholin u koncentraciji od 10<sup>-5</sup> M. Preparat se smatrao intaktnim kada je relaksacija acetilholinom bila veća od 70%. Ispiranjem preparata i vraćanjem na bazalni nivo, dodavan je lerimazolin u dozno zavisnim rastućim koncentracijama (10<sup>-7</sup> – 3x10<sup>-4</sup> M) tako da je svaka sljedeća koncentracija dodavana tek nakon stabilizacije kontrakcija sa prethodnom koncentracijom (Flavahan i sar., 1984; Chotani i sar., 2000). Poslije 30 minuta ispiranja preparata, repliciran je cijeli postupak kako bi se pokazalo slično kontraktilno dejstvo i u ponavljanoj primjeni lerimazolina. U drugoj seriji eksperimenta, nakon konstrukcije kontraktilne krive lerimazolina kao kontrolne krive, te 30 minutnog ispiranja preparata Krebs-bikarbonatnim rastvorom svakih 10 minuta, dodavani su selektivni antagonisti α i serotoninских podtipova receptora: SB 224289 (10<sup>-6</sup> M), BRL 15572 (10<sup>-6</sup> M), ketanserin tartarat (10<sup>-8</sup> i 10<sup>-6</sup> M), metiotepin hidrohlorid (3x10<sup>-7</sup> M), prazosin



hidrohlorid ( $3 \times 10^{-7}$  M), RX 821002 ( $3 \times 10^{-9}$  M), rauvolscin hidrohlorid ( $10^{-7}$  M) i JP 1302 ( $10^{-5}$  M) 20 minuta prije konstrukcije ponovne kumulativne koncentracijski zavisne krive lerimazolina. Dosezanjem maksimuma sa zadnjom koncentracijom lerimazolina, preparat se ispirao 30 minuta Krebs bikarbonatnim rastvorom do vraćanja na bazalni nivo, nakon čega je dodavan fenilefrin u jednokratnoj koncentraciji od  $10^{-4}$  M. Jačina kontrakcije se izražavala kao procenat maksimalne kontrakcije indukovane lerimazolinom u odnosu na kontrakciju indukovanu sa  $10^{-4}$  M fenilefrinom. Svaki pojedinačni segment pacovske aorte se koristio samo za jedan eksperimentalni protokol.

### **3.4.2. Eksperimentalni protokol za ispitivanje odnosa fenilefrin-lerimazolin**

Prvi set eksperimenta je dizajniran tako da se uporedi jačina kontrakcije dva agonista na različitim uzorcima pacovske aorte. Prvo je konstruisana kontrolna koncentracijski zavisna kriva fenilefrina dodavanjem kumulativnih doza fenilefrina od  $10^{-8}$  do  $10^{-5}$  M, zatim je konstruisana koncentracijski zavisna kriva lerimazolina dodavanjem kumulativnih doza lerimazolina ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-4}$  M) i poslije ispiranja jačina koncentracije je izražena u odnosu na  $10^{-4}$  M kontrakcije fenilefrina.

Drugi set eksperimenta je dizajniran u cilju otkrivanja uticaja lerimazolina na kontraktilnu aktivnost fenilefrina na pacovskoj aorti. Dvadeset minuta nakon konstrukcije kumulativne krive fenilefrina i ispiranja, dodavan je lerimazolin u četiri različite koncentracije. Procjenjivan je efekat lerimazolina ( $2,1 \times 10^{-3}$  M,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  i  $10^{-7}$  M) na kontraktilnu funkciju fenilefrina ( $10^{-8}$  do  $10^{-5}$  M, sa izuzetkom najviše doze lerimazolina, gdje je fenilefrin korišten u širem rasponu doza, od  $10^{-8}$  do  $10^{-2}$  M) komparacijom kontrakcije u prisustvu i odsustvu lerimazolina.

U cilju otkrivanja mehanizma odgovornog za  $10^{-4}$  M lerimazolinom inducirano smanjenje kontraktilne koncentracijski-zavisne krive fenilefrina, u prvoj fazi se konstruisala kontrolna kriva fenilefrina ( $10^{-8}$  –  $10^{-4}$  M). Mogući uticaji 5-HT antagoniste metiopipina ( $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  M i  $3 \times 10^{-7}$  M), selektivnog 5-HT<sub>7</sub> antagoniste SB 269970 ( $10^{-6}$  M), selektivnog 5-HT<sub>1D</sub> antagoniste BRL 15572 ( $10^{-6}$  M), inhibitora ciklooksigenaze indometacina ( $10^{-5}$  M), neselektivnog blokera K<sup>+</sup> kanala tetraetilamonijuma ( $10^{-3}$  M), nespecifičnog NOS inhibitora N<sup>w</sup>-nitro-L-arginine methyl ester L-NAME ( $10^{-4}$  M) ili NO hvatača OHB<sub>12</sub> ( $10^{-3}$  M) na koncentracijski zavisnu krivu fenilefrina su istraživani mjerenjem kontraktilnog odgovora u odsustvu i prisustvu  $10^{-4}$  M lerimazolina. Jačina kontraktilnog efekta se određivala

komparacijom nivoa kontrakcije u prisustvu i odsustvu lerimazolina i izražavana kao procenat maksimalnog efekta prouzrokovan najvećom koncentracijom fenilefrina.

### **3.5. Određivanje koncentracije izabranih supstanci u serumu/plazmi i mozgu pacova**

U svrhu određivanja količine prolaska liganda kroz krvno–moždanu barijeru, u serumu/plazmi i moždanom tkivu određivana je koncentraciju lerimazolina u dozi od 5 mg/kg. Pacovi su primali lerimazolin intraperitonealno u dozi od 5 mg/kg i 5 minuta prije uzimanja uzoraka životinje su anestetizirane primjenom ketamina. U predodređenim intervalima od 5, 10, 20, 40, 60 i 180 minuta poslije i.p (intraperitonealne) injekcije, uzorci krvi su skupljani iz karotidne arterije, zatim centrifugirani na  $5000 \times g$  15 min, a supernatant (serum/plazma) je zatim analiziran HPLC metodom. Mozgovi su takođe odmah vađeni, odmjeravani u epruveti, i homogenizovani rotor–stator blenderom u 2 ml metanola (*T 25 digital Ultra–Turrax*, IKA, Njemačka) tokom 2 min na 16000 rpm. Zatim je homogenat dopunjen do 5 ml metanolom, centrifugiran ( $9000 \times g$ , 15 min) i na kraju analiziran LC–MS analitičkom metodom. Koncentracije odabranih supstanci u serumu i moždanom tkivu određivane su pomoću Waters Alliance 2695, Mass Lynx, Waters ZQ 2000 kvadrupolnog analizatora koji koristi jonizaciju u elektrospreju (eng. *the electrospray ionization interface*, ESI–MS; Waters, Milford, MA, USA), a podaci su dobijeni praćenjem izabranog jona (eng. *selected ion monitoring—SIM*) jonske mase  $m/z$  237 i skeniranjem opsega jonskih masa  $m/z$  100–400 (eng. *full–scan ESI+ mode*). Limiti kvantifikacije u oba eksperimenta bili su 1  $\mu\text{g/l}$  (uzorci seruma/plazme) i 10  $\mu\text{g/l}$  (uzorci moždanog tkiva). Za predpripremu uzoraka korišćena je tečno–čvrsta ekstrakcija (eng. *solid–phase extraction - SPE*) uz pomoć Oasis<sup>®</sup> HLB kertridža (Waters, Milford, MA, USA), prethodno kondicioniranih metanolom i destilovanom vodom. Kao uzorci su nanošeni zakišljeni serum/plazma ili razblaženi zakišljeni supernatant homogenata mozga, a kertridži su ispirani sa 1 ml 5% metanola. Kertridži su zatim sušeni pod vakuumom, a supstanca od interesa eluirana sa 1 ml metanola. Nakon evaporacije ostaci su rekonstituisani u 1 ml mobilne faze, koja se sastojala od smješe: 5 mM amonijum formijat (pH 3,5): acetonitril sa 0,1% mravlje kiseline = 45% : 55% izokratski uslovi; i onda injektovani u LC sistem. Za separaciju jedinjenja korišćena je kolona XTerra RP18 (Waters, Milford, MA, USA). Za određivanje slobodne frakcije u plazmi i moždanom tkivu, pripremljen je vodeni rastvor lerimazolina.

### 3.6. Bihevioralni testovi

Korišteni su različiti bihevioralni testovi:

1. test spontane lokomotorne aktivnosti,
2. uzdignuti plus–lavirint,
3. rotarod test i
4. pentilentetrazolski test.

Korištena je digitalna kamera povezana sa *ANY–maze* softverom (Stoelting Co., Wood Dale, IL, SAD) koja omogućava izračunavanje odabranih parametara (varijabli) (Savić i sar., 2008; 2009) za promatranje ponašanja životinje u *in vivo* testovima, osim za rotarod i pentilentetrazolski test. Svi *in vivo* eksperimenti sprovedeni su u namjenskim prostorijama vivarijuma Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, 2015. godine.

#### 3.6.1. Test spontane lokomotorne aktivnosti

Termin „spontana lokomotorna aktivnost” podrazumjeva ispitivanje motorne i lokomotorne aktivnosti glodara gdje se rutinski prate parametri kretanja, propinjanje, timarenje, grickanje i dr. Eventualno smanjenje aktivnosti može se povezati sa sedativnim efektom koji se javlja nakon primjene pojedinih supstanci, dok je povećanje aktivnosti mjera stimulantnog dejstva pojedinih psihoaktivnih supstanci.

U sobu sa prigušenim crvenim svjetlom (20 lx) postavljani su pacovi u centar polu–prozirnog kaveza od Pleksiglasa veličine 40 cm × 25 cm × 35 cm nakon 20 minuta od apliciranja ispitivane supstance. Tokom perioda od 30 ili 45 min, bez prethodne habituacije, praćena je njihova aktivnost uz pomoć *ANY–maze* softvera, koji je povezan sa kamerom postavljenom direktno iznad kaveza. Za praćenje sedativnog efekta u ovom testu korišteni su sljedeći parametri: ukupni pređeni put i vrijeme provedeno u imobilnosti (tokom čitavog praćenja testa i tokom petominutnih intervala).

U cilju poboljšanja analize procjenom eventualnog uticaja supstanci na nivo anksioznosti, definisana je virtuelna centralna zona koja predstavlja 20% čitave površine (200 cm<sup>2</sup>). Ulazak u zonu se registrovao softverom kada bi najmanje 70% površine životinje moralo biti u zoni, dok je 50% moralo da ostane u zoni da se ne bi registrovao izlazak.

U testu spontane lokomotorne aktivnosti sprovedena su dva eksperimenata:

- **Eksperiment 1:** Procjena efekata rastućih doza lerimazolina (1 i 10 mg/kg);
- **Eksperiment 2:** Procjena efekata lerimazolina (1 i 10 mg/kg), RX 821002 (1 i 3 mg/kg) i njihovih kombinacija;

### 3.6.2. Uzdignuti plus–lavirint

Uzdignuti plus–lavirint (eng. *elevated plus–maze*) koristi se kao bihevioralni test procjene anksioznosti (Hogg, 1996; Rodgers i Dalvi, 1997; Wall i Messier, 2001) koji je u naučno istraživačke eksperimente uveden 1984. godine (Hiley i Mithani, 1984).

Uzdignuti plus lavirint predstavlja model zasnovan na ispitivanju neuslovljenog, ili spontanog ponašanja životinje (Rodgers i Dalvi, 1997). Lavirint se sastoji od dva kraka zatvorena bočnim zidovima, a naspramno su postavljena dva otvorena kraka. Usljed fenomena tigmotaksije („lokomotorni odgovor na kontakt ili dodir”), odnosno urođenog odabira oivičenog prostora, glodari češće ulaze i duže borave u zatvorenim kracima lavirinta (Belzung, 1999). Izlazak pacova u otvorene krake bi značio odgovarajuće bihevioralne promjene kao što je povećani nivo anksioznosti: povećanje koncentracije kortikosterona u plazmi, učestaliji prekidi motorne aktivnosti (eng. *freezing*) i defeciranja (Pellow i sar., 1985).

Lavirint ima oblik znaka plus sa po dva otvorena (50 cm dužine × 10 cm širine) i dva zatvorena kraka (50 cm dužine × 10 cm širine × 40 cm visine) i povezana centralnim prostorom (10 cm × 10 cm). Napravljen je od lima a pod je obložen crnom gumom. Nosači podižu lavirint na visinu od 50 cm. Osvjetljenje eksperimentalne sobe se sastojalo od jedne crvene neonske cijevi, koja je na površini krakova davala intenzitet svjetla od 10 lx.

Pacov se postavljao u centralni prostor, okrenut prema jednom od zatvorenih krakova. Ponašanje životinje se pratilo ANY–maze softverom tokom 5 min. Najmanje 80% životinje je moralo biti u zoni kako bi softver registrovao ulazak u zonu, dok je 20% moralo da ostane u zoni da se ne bi registrovao izlazak. Nakon svake životinje, lavirint je čišćen vlažnom i suhom papirnom vatom.

U eksperimentu su praćeni standardni prostorno–vremenski parametri: ukupni pređeni put, ukupan broj ulazaka, broj ulazaka u zatvorene krake, pređeni put na otvorenim kracima, procenat ulazaka u otvorene krake i procenat vremena provedenog na otvorenim kracima lavirinta. Podaci o ponašanju na otvorenim kracima su izražavani kao procenat ukupne aktivnosti (npr. vrijeme u otvorenim kracima/(vrijeme u otvorenim + zatvorenim kracima)), da bi se izbjegao uticaj eksplorativne aktivnosti životinje u centralnoj zoni plus–lavirinta. Bihevioralni parametri praćeni u ovom modelu daju mjeru dvije nezavisne dimenzije („faktora”) ponašanja, jedne koja odražava anksioznost, i druge koja se može povezati sa motornom aktivnošću. Procenat ulazaka u otvorene krake i vremena provedenog na otvorenim kracima su parametri zavisni od faktora koji se može povezati sa nivoom

anksioznosti eksperimentalne životinje, dok se broj ulazaka u zatvorene krake može smatrati relativno čistim indeksom lokomotorne aktivnosti. Ukupan broj ulazaka u krake je povezan sa faktorom lokomotorne aktivnosti, ali takođe, manje izraženo, i sa faktorom koji odražava anksioznost (Cruz i sar., 1994; Rodgers i Johnson, 1995; Fernandes i File, 1996).

U uzdignutom plus–lavirintu sprovedena su dva eksperimenata:

- **Eksperiment 1:** Procjena efekata rastućih doza lerimazolina (2, 5 i 10 mg/kg);
- **Eksperiment 2:** Procena efekata lerimazolina (1 i 10 mg/kg), RX 821002 (1 i 3mg/kg) i njihovih kombinacija.

### 3.6.3. Rotarod test

Za procjenu motorne koordinacije koristi se rotarod test kod miševa i pacova gdje se životinje postavljaju na horizontalni valjak koji rotira oko svoje ose; životinja se mora kretati naprijed kako ne bi pala. Ovaj test se prvenstveno koristi za procjenu uticaja lijekova na motornu funkciju jer se ataksija tj. gubitak motorne koordinacije može smatrati dobrim prediktorom sedativnog efekta, a može značajno da utiče i na ispitivanje učenja i pamćenja, eksploracije i drugih fenomena (Rustay i sar., 2003). Rutinsko korištenje ovog testa daje konzistentne i pouzdane rezultate, validacije je jednostavna i omogućava lako rukovanje.

Za ispitivanje ataksije korišten je rotarod aparat prilagođen pacovima (model 47700; Ugo Basile, Comerio, Italija). Prije testiranja, pacovi su trenirani tri dana da ostanu na rotirajućoj osovini 120 sekundi sa ubrzanjem 15-25 rpm (eng. *rounds per minute*). Prije samog eksperimenta četvrtog dana, napravljen je konačan izbor: samo oni pacovi koji su mogli da ostanu 120 s na valjku, bez padanja, izabrani su za dalja testiranja.

U rotarod testu sproveden je jedan eksperiment:

- **Eksperiment 1:** Procjena efekata lerimazolina (5 i 10 mg/kg).

### 3.6.4. Pentilentetrazolski test

Pentilentetrazol (PTZ) je nekompetitivni antagonist GABA<sub>A</sub> receptora koji ispoljava prokonvulzivne osobine (Bialer i White, 2010). Generalizovane miokloničke napade kod ljudi najbolje oponaša PTZ (Löscher i Schmidt, 1988; Löscher, 2009) a u zavisnosti od primjenjene doze i puta primjene, dovodi do epileptičnih konvulzija u glodara i to: miokloničnih, kloničnih, toničnih, tonično–kloničnih grčeva, a u pojedinim slučajevima i do smrtnog ishoda. Doza od 70 mg/kg PTZ primjenjena 20 min nakon odgovarajućeg tretmana

dovodi do karakterističnih epileptičnih napada u najmanje 80% pacova. Leptir kanila (debljina igle 25 G,  $\frac{3}{4}$  in.) spojena je sa špicom od 20 ml napunjenom pentilentetrazolom (PTZ). Šprica je postavljena u podesivu infuzionu pumpu (Stoelting Co., Wood Dale IL, USA). Prije aplikacije PTZ-a, pacovska repna vena se stavlja u toplu vodu zbog dilatacije. Pacovi su potom smješteni u kavez za obuzdavanje. Igla se uvodi u repnu venu i PTZ se infuziono aplicira konstantnom brzinom od 0,5 ml/minuti. Doze PTZ-a (mg/kg) neophodne za izazivanje kloničkih i toničkih napada su računane prema sljedećoj formuli: volumen PTZ-a (ml) x koncentracija PTZ-a (mg/ml)/ težina pacova (kg).

U PTZ–skom testu sproveden je jedan eksperiment:

- **Eksperiment 1:** Procjena efekata lerimazolina (1, 5 i 10 mg/kg).

### 3.7. Statistička analiza

**In vitro:** Vrijednosti srednje efektivne koncentracije ( $EC_{50}$ ) računane su za svaki eksperiment LabChart 7 softverom.  $pK_b$  vrijednosti računane su korištenjem formule:  $pK_b = \log(DR-1) - \log[B]$ , gdje se DR (eng. *dose ratio*) dobije kao količnik  $EC_{50}$  u prisustvu i odsustvu antagoniste (Chopin i O'Conner, 1995). B je molarna koncentracija antagoniste. Statistička komparacija  $EC_{50}$  u prisustvu i odsustvu antagoniste se radila Student t-testom. Za poređenje dvije ili više grupa koristila se parametarska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc testom za određivanje izvora varijacije (Wallenstein i sar., 1980). Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM (standardna greška).

**Farmakokinetika lerimazolina:** Rezultati ispitivanja su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna greška. Farmakokinetički parametri (koncentracija i slobodna frakcija lerimazolina u plazmi/serumu i mozgu pacova) su izračunati korištenjem PK funkcija sa Microsoft Excel softverom (Joel Usansky, Atul Desai i Diane Tang-Liuwere).

**In vivo:** U svim bihejvioralnim testovima rezultati ispitivanja su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna greška. Prije obrade analizom varijanse, podaci su testirani na homogenost i normalnu raspodjelu. Parametri praćeni u testu spontane lokomotorne aktivnosti, uzdignutom plus–lavirintu, rotarodu i pentilentetrazolskom testu analizirani su jednofaktorskom ANOVA–om, sa tretmanom kao faktorom. Jedini izuzetak su bili eksperimenti sa lerimazolinom i RX 821002 gdje je korištena dvofaktorska ANOVA, sa doznim nivoima ova dva liganda kao faktorima. Dvofaktorska ANOVA je izabrana u ovom

slučaju, jer je omogućavala praćenje značajnosti uticaja svakog od faktora posebno, kao i njihove interakcije.

U svim testovima, razlike na nivou  $p < 0,05$  uzimane su kao statistički značajne, dok su razlike  $0,1 > p > 0,05$  smatrane trendom. Ukoliko su uticaji faktora bili statistički značajni, *post hoc* poređenja vršili smo Student–Newman–Keuls (SNK) ili Dunnett–ovim testom (u slučaju poređenja sa kontrolnom grupom). Statistička analiza je sprovedena komercijalnim statističkim softverima PASW Statistics 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), Sigma Plot 11 (Systat Software Inc., Richmond, CA, USA) i ANY-maze softverom (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA).

## 4.REZULTATI

### 4.1.Afiniteti vezivanja lerimazolina za pojedine podtipove receptora

Afiniteti vezivanja lerimazolina za pojedine podtipove receptora su prikazani u Tabeli 3. Rezultati pokazuju da lerimazolin pokazuje umjeren afinitet vezivanja za 5-HT<sub>1A</sub>, komparabilan afinitetu za 5-HT<sub>1D</sub> receptor koji je publikovan u Law i sar., 1998. Na drugim ispitanim receptorima,  $\alpha_1$ , 5-HT<sub>2A</sub> i D<sub>2</sub>, afinitet vezivanja je bio znatno manji, mikromolarnog nivoa, i komparabilan poznatom afinitetu za 5-HT<sub>1B</sub> receptore (Law i sar., 1998).

**Tabela 3. Afiniteti vezivanja lerimazolina.**

Receptor	Ki $\pm$ S.E.M (nM)
D <sub>2</sub>	3437.5 $\pm$ 138.9
5-HT <sub>1A</sub>	162.5 $\pm$ 4.5
5-HT <sub>2A</sub>	4202 $\pm$ 78
$\alpha_1$	6656 $\pm$ 149
5-HT <sub>1D</sub> *	72 $\pm$ 12
5-HT <sub>1B</sub> *	3480 $\pm$ 1690

\*Publicirano u Law i sar., 1998.

### 4.2.In vitro farmakološki profil lerimazolina

U rasponu koncentracija  $3 \times 10^{-6} - 3 \times 10^{-4}$  M, lerimazolin je prouzrokovao koncentracijski-zavisnu kontrakciju na 70% testiranih preparata pacovske aorte, dok je kod preostalih testiranih krvnih sudova odgovor bio slab (manji od 15% maksimalnog efekta prouzrokovanog fenilefrinom) ili totalno odsutan. U Tabeli 4 se nalazi prikaz kontraktilne vrijednosti lerimazolina u odnosu na fenilefrin kod svih 75 uzoraka, neovisno o endotelu. Eksperimenti su pokazali da lerimazolin uzrokuje 40-55% maksimalne kontrakcije u odnosu na  $10^{-4}$  M kontrakciju fenilefrina (Emax:  $45,08 \pm 1,18\%$  od  $10^{-4}$  M maksimalne kontrakcije fenilefrina; pEC<sub>50</sub>: 4,30,  $n = 75$ ), zbog čega se zaključuje da je lerimazolin manje potentan i efektivan kontraktilni agens u odnosu na fenilefrin.

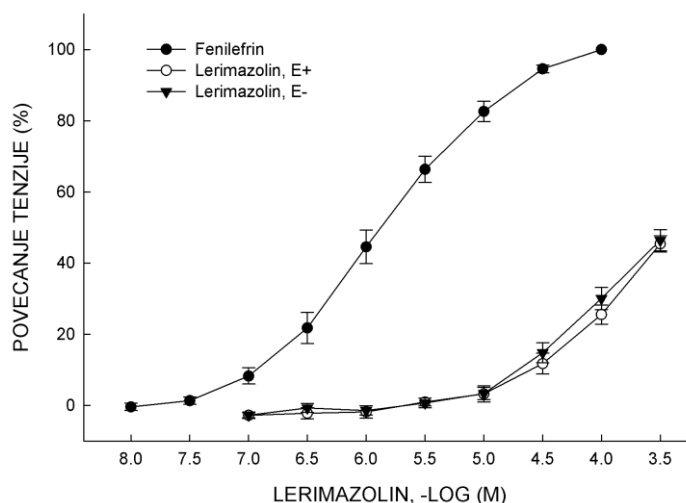


**Tabela 4. Kontraktilni efekat lerimazolina na pacovskoj torakalnoj arteriji**

Lerimazolin (M)	Kontrakcija (%)
$1 \times 10^{-7}$	$-3,07 \pm 0,38$
$3 \times 10^{-7}$	$-1,70 \pm 0,49$
$1 \times 10^{-6}$	$-0,86 \pm 0,56$
$3 \times 10^{-6}$	$1,68 \pm 0,73$
$1 \times 10^{-5}$	$5,69 \pm 0,93$
$3 \times 10^{-5}$	$16,42 \pm 1,25$
$1 \times 10^{-4}$	$29,80 \pm 1,34$
$3 \times 10^{-4}$	$45,08 \pm 1,18$

**Jačina kontrakcije je izražena kao procenat maksimalne kontrakcije inducirane lerimazolinom u odnosu na kontrakciju indukovanu sa  $10^{-4}$  M fenilefrinom. Vrijednosti su izražene kao srednje aritmetičke vrijednosti  $\pm$  standardna greška ( $n = 75$ ).**

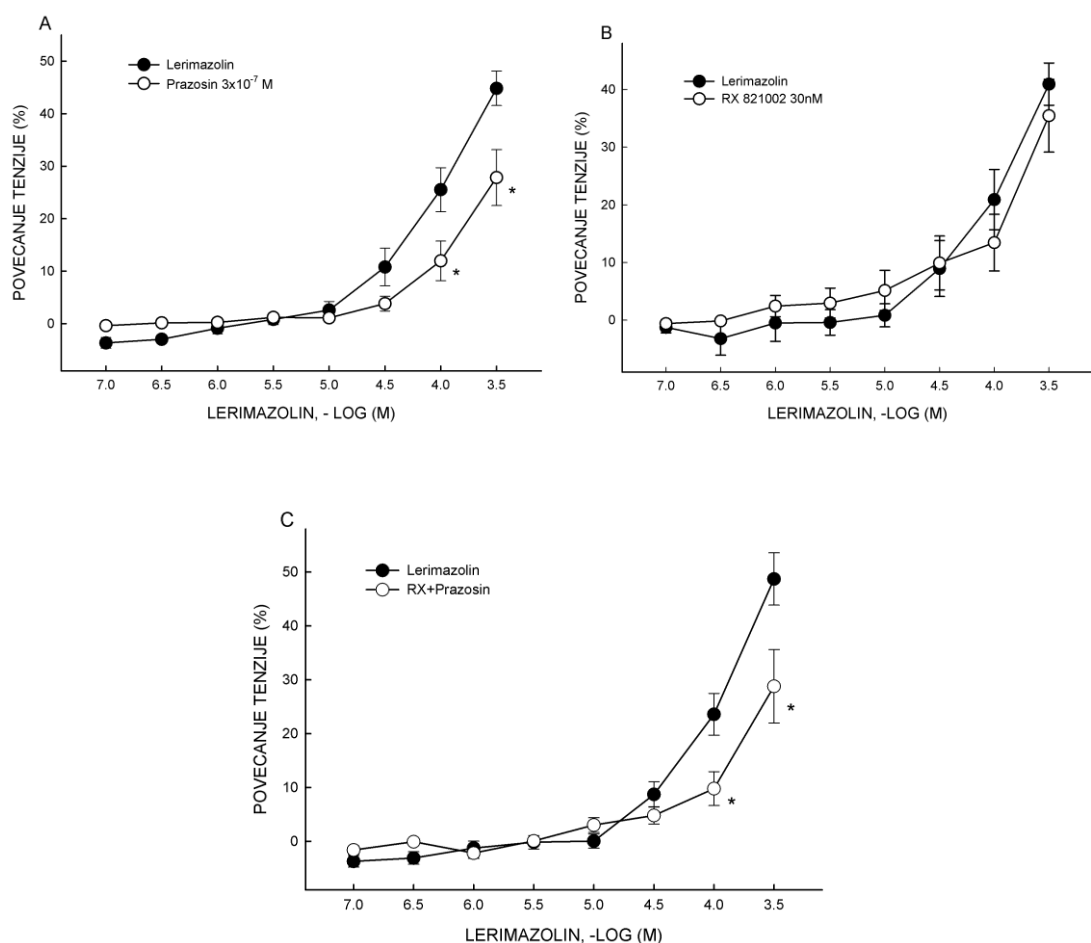
Pojedinačan efekat lerimazolina je neovisan o prisustvu/odsustvu endotela, s obzirom na to da se pokazalo da ne postoji statistička značajnost razlike kontrakcije u prisustvu i odsustvu endotela (Slika 8). Primjetno je da su krive lerimazolina nesaturirane (izostanak plato vrijednosti kontrakcije) na  $3 \times 10^{-4}$  M. Međutim, provedeni su eksperimenti sa dodatnim koncentracijama od  $1 \times 10^{-3}$  i  $3 \times 10^{-3}$  M koji su pokazali da koncentracijski zavisne krive lerimazolina ne mogu održati plato zbog tendencije smanjenja maksimalnog kontraktilnog odgovora pa smo prikazali maksimalnu kontrakciju koja završava sa koncentracijom  $3 \times 10^{-4}$  M.



**Slika 8. Koncentracijski zavisne krive fenilefrina ( $n = 12$ ) i lerimazolina dobivene na preparatima pacovske aorte u prisustvu i odsustvu endotela ( $n = 38$  ukupno). Svaka tačka predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SEM. Efekti su izraženi kao procenat maksimalne kontrakcije u odnosu na  $10^{-4}$  M kontraktilne vrijednosti fenilefrina. Odsustvo endotela nije imalo uticaj na kontrakciju lerimazolina.**

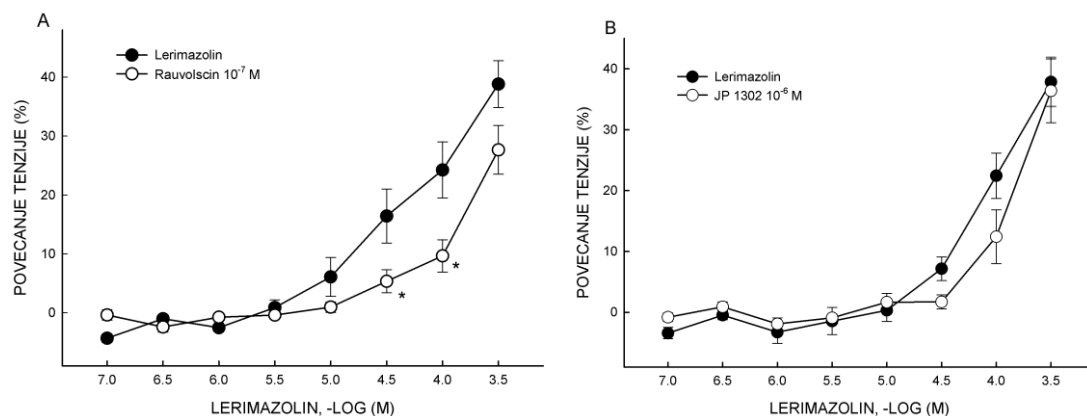
#### 4.2.1. Kontraktilni efekat lerimazolina u prisustvu i odsustvu $\alpha$ selektivnih antagonista

U prvom eksperimentalnom setu, ispitivana je uloga i sposobnost  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  receptora da inhibiraju lerimazolinom indukovanu kontrakciju na pacovskoj aorti. Pretretmanom sa  $\alpha_1$  antagonistom prazosinom ( $0,3 \mu\text{M}$ ) došlo je do signifikantnog suzbijanja maksimalne kontrakcije lerimazolina ( $E_{\text{max}}: 44,83 \pm 3,28\%$  u odsustvu *prema*  $27,83 \pm 5,32\%$  u prisustvu prazosina,  $p < 0,05$ , Slika 9A;  $n = 15$ ), dok se  $pK_b$  nije mogao izračunati jer je DR bio manji od jedan (iako postoji blago pomjeranje u desno koncentracijski zavisne krive lerimazolina). Dok je prazosin uspio da antagonizira kontraktilni efekat lerimazolina, visoko selektivni  $\alpha_2$  antagonist RX 821002 ( $30 \text{ nM}$ ,  $pK_b = 8,19$ ) nije imao značajnog efekta na krivu lerimazolina ( $E_{\text{max}}: 40,92 \pm 3,65\%$  u odsustvu *prema*  $35,45 \pm 6,31\%$  u prisustvu RX 821002,  $p > 0,05$ , Slika 9B;  $n = 12$ ). Blokiranjem  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  receptora kombinacijom prazosina i RX 821002 pokazan je skoro identičan nivo inhibicije maksimalnog kontraktilnog efekta lerimazolina kao i kod pretretmana samo prazosinom ( $E_{\text{max}}: 48,72 \pm 4,86\%$  u odsustvu *prema*  $28,81 \pm 6,80\%$  u prisustvu prazosina i RX 821002,  $p < 0,05$ ; Slika 9C;  $n = 8$ ). Ponovo nije bilo moguće izračunati  $pK_b$  vrijednost jer je DR bio manji od jedan ( $pEC_{50}$  kontrolne krive lerimazolina je  $3,45 \pm 0,16$ , dok je u prisustvu prazosina i RX 821002  $3,51 \pm 0,37$ ;  $p > 0,05$ ).



**Slika 9. (A) Efekt antagonista  $\alpha_1$ -receptora prazosina ( $0.3 \mu\text{M}$ ), (B) antagonista  $\alpha_2$ -receptora RX 821002 ( $30 \text{ nM}$ ) i (C) kombinacije prazosina i RX 821002 na kontraktilni efekat lerimazolina dobiven na pacovskoj aorti. Svaka tačka predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SEM. Efekti su izraženi kao procenat maksimalne kontrakcije u odnosu na  $10^{-4} \text{ M}$  kontraktilne vrijednosti fenilefrina. Efekti antagonista na kontrakciju lerimazolina su poređeni sa kontrolnom krivom (\* $p < 0,05$ , Studentov  $t$ -test).**

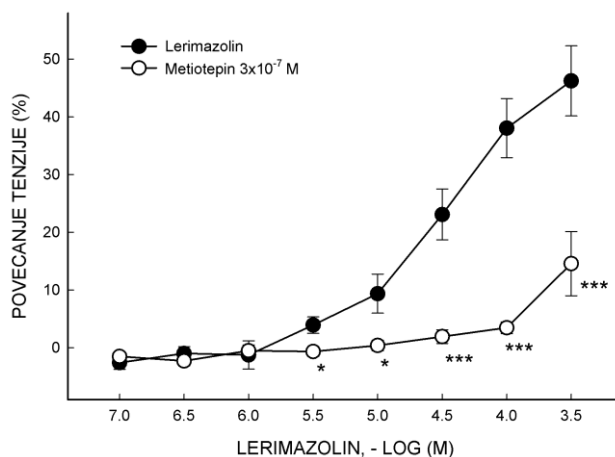
Dodatni set ispitivanja uloge  $\alpha_2$  receptora u kontrakciji lerimazolina je rađen neselektivnim  $\alpha_2$  antagonistom rauvolscinom i  $\alpha_{2C}$  selektivnim antagonistom JP 1302. Dok JP 1302 ( $1 \mu\text{M}$ ;  $pK_b = 5,4$ ) nije imao značajnog uticaja na koncentracijski zavisnu krivu lerimazolina ( $E_{\text{max}}$ :  $37,85 \pm 4,03\%$  u odsustvu prema  $36,39 \pm 5,23\%$  u prisustvu JP 1302; Slika 10B;  $n = 9$ ), rauvolscin ( $0,1 \mu\text{M}$ ;  $pK_b = 7,23$ ) je uzrokovao pomjeranje krive udesno sa siginifikantnim smanjenjem maksimalnog efekta lerimazolina ( $38,82 \pm 3,98$  u odsustvu prema  $27,66 \pm 4,14\%$  u prisustvu rauvolscina,  $P = 0,067$ , Slika. 10A;  $n = 10$ ).



**Slika 10. (A) Efekti neselektivnog antagonista  $\alpha_2$ -receptora rauvolscina ( $0,1 \mu\text{M}$ ) i (B) antagonista  $\alpha_{2C}$ -receptora JP 1302 ( $1 \mu\text{M}$ ) na kontraktilni efekat lerimazolina dobiven na pacovskoj aorti. Svaka tačka predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SEM. Efekti su izraženi kao procenat maksimalne kontrakcije u odnosu na  $10^{-4}$  M kontraktilne vrijednosti fenilefrina. Efekti antagonista na kontrakciju lerimazolina su poređeni sa kontrolnom krivom (\* $p < 0,05$ , Studentov  $t$ -test).**

#### 4.2.2. Kontraktilni efekat lerimazolina u prisustvu i odsustvu antagonista serotonina

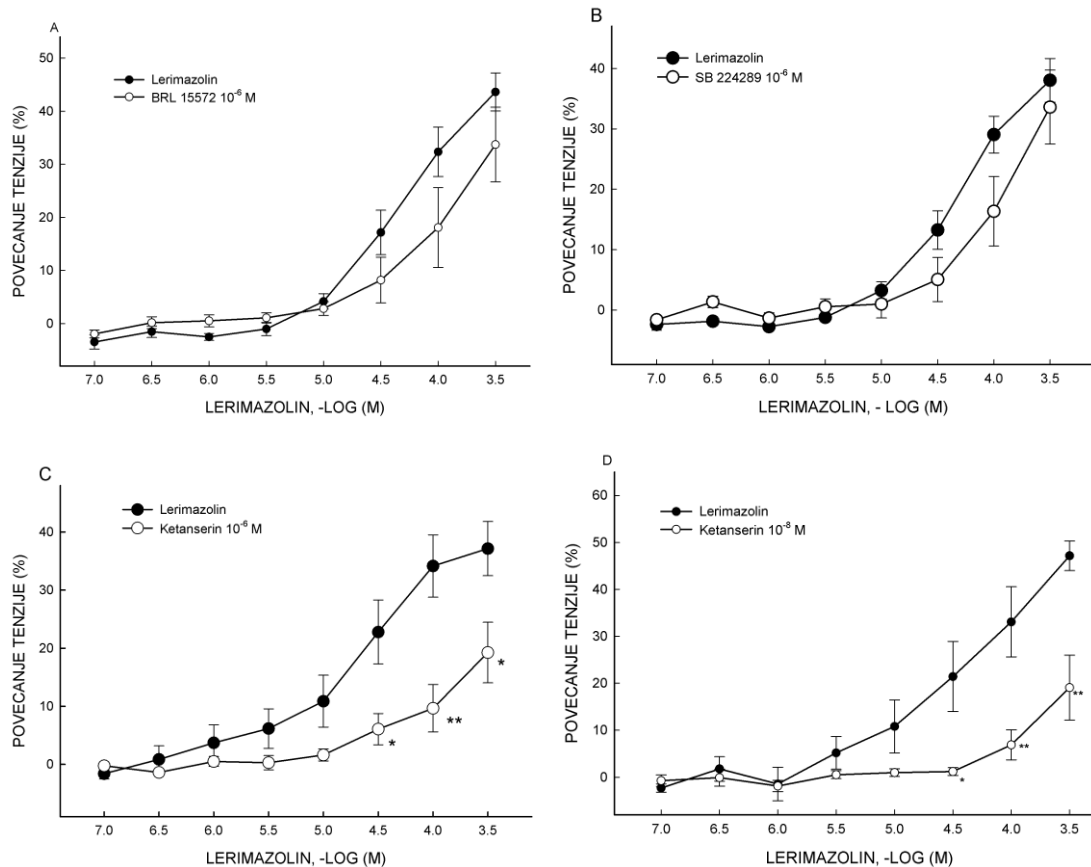
U drugom setu eksperimenata, upotrebljena su četiri antagonista serotoninskih receptora. Neselektivni serotoninski antagonista metiotepin je snažno inhibirao maksimalnu kontrakciju lerimazolina na nekompetitivni način ( $E_{\text{max}}$ :  $46,26 \pm 6,06\%$  u odsustvu prema  $14,58 \pm 5,57\%$  u prisustvu metiotepina,  $p < 0,01$ ,  $n = 9$ ; Slika 11).



**Slika 11. Efekt neselektivnog 5-HT-receptor antagonista metiotepina pri koncentraciji od  $0,3 \mu\text{M}$  na kontraktilni efekat lerimazolina dobivenog na pacovskoj aorti. Svaka tačka predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SEM. Efekti su izraženi kao procenat maksimalne kontrakcije u odnosu na  $10^{-4}$  M kontraktilne vrijednosti fenilefrina. Efekti antagonista na kontrakciju lerimazolina su poređeni sa kontrolnom krivom (\* $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , Studentov  $t$ -test).**

Upotrebom selektivnih serotoninskih antagonista na pojedinim podtipovima receptora, ispitana je uloga 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> i 5-HT<sub>2A</sub> receptora u kontraktilnoj funkciji lerimazolina (Slika 12). Pretretman sa 5-HT<sub>1D</sub> antagonistom BRL 15572 (1 μM) i 5-HT<sub>1B</sub> antagonistom SB 224289 (1 μM) nije imao nikakav uticaj na koncentracijski zavisnu krivu lerimazolina (pK<sub>b</sub> = 5,28; E<sub>max</sub>: 43,63 ± 3,58% u odsusutvu prema 33,73 ± 7,02% u prisusutvu BRL 15572, *p* > 0,05, *n* = 12; Slika 12A) dok su vrijednosti za SB 224289 bile: pK<sub>b</sub> = 5,92; E<sub>max</sub>: 38,04 ± 3,61% u odsusutvu prema 33,61 ± 6,12% u prisustvu SB 224289, *p* > 0,05, *n* = 10; Slika 12B).

Pošto torakalna arterija pacova važi za utemeljen model kontrakcije uzrokovane 5-HT<sub>2A</sub> receptorima (Martin, 1994), od posebnog značaja je bilo testiranje potencijalne uloge 5-HT<sub>2A</sub> receptora u kontraktilnoj aktivnosti lerimazolina. Korištene su dvije koncentracije 5-HT<sub>2A</sub>-selektivnog antagoniste ketanserina: 10 nM (pK<sub>b</sub> = 7,53) i 1 μM (pK<sub>b</sub> = 6,51). Ketanserin u dozi od 1 μM je značajno inhibirao lerimazolinom indukovanu kontrakciju od tačke 10 μM ka višim koncentracijama (E<sub>max</sub>=37,15 ± 4,66% u odsustvu prema 19,25 ± 5,22% u prisustvu ketanserina, *p* < 0,05, *n* = 9; Slika 12C). Sličan rezultat je dobiven i sa koncentracijom od 10 μM ketanserina (E<sub>max</sub> =47,15 ± 3,14% u odsustvu prema 19,07 ± 6,90% u prisustvu ketanserina koncentracije 10 nM, *p* < 0,01, *n* = 7; Slika 12D).



**Slika 12. (A) Efekti selektivnih serotoninskih liganada, i to: 5-HT<sub>1D</sub> antagoniste BRL 17752 (1 μM), (B) 5-HT<sub>1B</sub> antagoniste SB 224289 (1 μM), (C) 5HT<sub>2A</sub> antagoniste ketanserina (1 μM) i (D) ketanserina (10 nM) na kontraktilni efekat lerimazolina dobiven na pacovskoj aorti. Svaka tačka predstavlja srednju vrijednost ± SEM. Efekti su izraženi kao procenat maksimalne kontrakcije u odnosu na 10<sup>-4</sup> M kontraktilne vrijednosti fenilefrina. Efekti antagonista na kontrakciju lerimazolina su poređeni sa kontrolnom krivom (\**p* < 0,05, \*\*\**p* < 0,001, Studentov *t*-test).**

Zbirno, uticaji ispitivanih antagonista selektivnih za pojedine podtipove α-adrenergičkih ili 5-HT receptora na pEC<sub>50</sub> vrijednosti izračunate u odsustvu antagoniste prikazani su u Tabeli 5.

**Tabela 5. Efekti prazosina, RX 821002, rauvolscina, JP 1302, ketanserina, metiotepina, SB 224289 i BRL 15572 na pEC<sub>50</sub> dobivene kontrakcijom lerimazolina na pacovskoj torakalnoj arteriji**

	pEC <sub>50</sub>	<i>n</i>	Konc. (μM)
<b>PRAZOSIN</b>			
Netretirani	3,93 ± 0,09	15	0,3
Tretirani	4,01 ± 0,24		
<b>RX 821002</b>			
Netretirani	3,91 ± 0,26	12	0,03
Tretirani	3,15 ± 0,27		
<b>JP 1302</b>			
Netretirani	4,07 ± 0,11	9	1
Tretirani	3,98 ± 0,35		
<b>RAUVOLSCIN</b>			
Netretirani	4,13 ± 0,13	10	0,1
Tretirani	3,69 ± 0,11		
<b>METIOTEPIN</b>			
Netretirani	4,30 ± 0,13	9	0,3
Tretirani	3,99 ± 0,34		
<b>SB 269970</b>			
Netretirani	4,54 ± 0,28	12	1
Tretirani	3,78 ± 0,47		
<b>BRL 15572</b>			
Netretirani	3,85 ± 0,14	12	1
Tretirani	3,77 ± 0,21		
<b>SB 224289</b>			
Netretirani	4,24 ± 0,08	10	1
Tretirani	3,98 ± 0,08		
<b>KETANSERIN</b>			
Netretirani	4,42 ± 0,24	9	1
Tretirani	3,80 ± 0,27		
<b>KETANSERIN</b>			
Netretirani	4,02 ± 0,31	7	0,01
Tretirani	3,89 ± 0,38		

**Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna greška; pEC<sub>50</sub> koncentracije lerimazolina koji prouzrokuje 50% maksimalne kontrakcije.**

#### **4.2.3. Korelacija funkcionalnih parametara sa literaturnim vrijednostima**

Tri ili više podataka neophodnih za preračunavanje linearne korelacije između Ki (literaturne vrijednosti date u Tabeli 6) i dobivenih pK<sub>b</sub> vrijednosti je dobiveno za četiri podtipa receptora. Analiza za 5-HT<sub>1D</sub> i 5-HT<sub>2A</sub> receptor je rađena dva puta i uključivala je odvojeno pK<sub>b</sub> vrijednosti dobivene za ketanserin pri dozama od 10 nM i 1 μM. Od šest dobivenih

korelacija, vezivanje za 5-HT<sub>2A</sub> receptor se pokazalo značajnom ( $r = 0,997$ ,  $n = 3$ ,  $p=0,049$ ). Nedostatak značajne korelacije je utvrđen za  $\alpha_{2C}$  receptor ( $r = 0,796$ ,  $n = 3$ ,  $p=0,414$ ), 5-HT<sub>1A</sub> receptor ( $r = 0,906$ ,  $n = 3$ ,  $p=0,278$ ), kao i 5-HT<sub>1D</sub>, kada je analiza uključivala pK<sub>b</sub> vrijednosti za obje doze ketanserina: 1  $\mu$ M ( $r = 0,281$ ,  $n = 5$ ,  $p=0,646$ ) i 10 nM ( $r = 0,257$ ,  $n = 5$ ,  $p=0,676$ ).



**Tabela 6. Literaturne vrijednosti afiniteta antagonista za pojedine podtipove receptora (preuzeto sa referentnog internet izvora razvijenog u kolaboraciji između *The British Pharmacological Society* (BPS) i *the International Union of Basic and Clinical Pharmacology* (IUPHAR): <http://www.guidetopharmacology.org>)**

	PRAZOSIN	RX 821002	JP 1302	RAUVOLSCIN	SB 224289	BRL 15572	KETANSERIN	METIOTEPIN
$\alpha_1$	9,6	8,2	-	-	-	-	8,2	-
$\alpha_2$	-	9,2-9,5	-	8,4	-	-	-	-
$\alpha_{2C}$	6,7-8,0	8,7	7,8	9,1	-	-	-	-
5-HT <sub>1A</sub>	-	7,6	-	-	-	7,7*	-	7,8-8,1
5-HT <sub>1B</sub>	-	-	-	-	8,6*	-	-	7,1-8,5
5-HT <sub>1D</sub>	-	-	-	7,8	6,7	7,9	7,4-7,5	7,3-8,2
5-HT <sub>2A</sub>	-	-	-	-	5,3	6,6*	8,6-9,0	8,5
5-HT <sub>2B</sub>	-	-	-	7,8-8,4	-	-	-	8,7-9,2
5-HT <sub>2C</sub>	-	-	-	-	-	-	6,8-7,5	8,4*
5-HT <sub>7</sub>	-	-	-	-	-	-	-	9,0-9,4

### **4.3.Uticaj različitih endotelnih faktora i pojedinih podtipova receptora na interakciju fenilefrina i lerimazolina**

Za kontrolu simptoma alergijskog rinitisa, najveću primjenu imaju dekonjestivna sredstva. Ona izazivaju konstrikciju malih krvnih sudova stimulirajući najčešće  $\alpha$  adrenergičke receptore (najviše fenilefrin i efedrin), što dovodi do posljedičnog smanjenja sekrecije u nosu uz istovremenu inhibiciju parasimpatičkih vlakana. Radi poboljšanja efikasnosti preparata, ponekad se kombinuju dva nazalna dekonjestiva, što je slučaj u Adrianol kapima. U spisku regulatornih mjera iz bezbjedonosnih razloga koje je 2009. donijela Agencija za lijekove i medicinska sredstva Srbije uvrštene su Adrianol kapi (Savić i sar., 2009), gdje se kao razlog potrebe za procjenu neželjenih reakcija i bezbjedonosnog profila lijeka naglašava nedostatak bilo kakvih *in vitro* i *in vivo* podataka o lerimazolinu. S obzirom da se kombinacija fenilefrina i lerimazolina u Adrianol kapima koristi kao nazalni dekonjestiv i egzistira na tržištu bivše SFRJ i kasnije Srbije preko 40 godina, istraživački validan cilj je da se ispita priroda odnosa fenilefrina i lerimazolina.

U prethodnim studijama prilikom analize različitih agonistom induciranih promjena na različitim krvnim sudovima pacova, rezultate je odlikovala varijabilnost, a zavisili bi od testirane doze, vrste receptora zastupljenih u datom biološkom materijalu, bazalnog vaskularnog tonusa i eventualno patološke prirode biološkog materijala (Moran i sar., 1997, 2008; Fernandez i sar., 2000; Calama i sar., 2002).

Uzimajući u obzir i navedena ograničenja, eksperiment je kreiran u nekoliko faza:

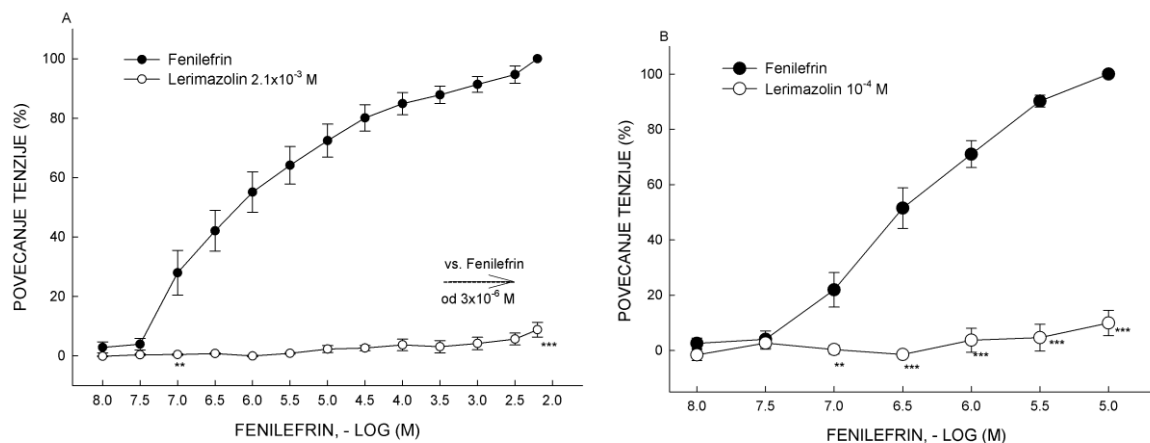
- a) Ispitivanje uticaja različitih koncentracija lerimazolina ( $2,1 \times 10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  i  $10^{-7}$  M) na kontraktilnu funkciju fenilefrina
- b) Ispitivanje uticaja oslobađanja endotelnog faktora NO,  $K_{Ca}$  kanala i metiotepina na kontraktilnu funkciju fenilefrina
- c) Ispitivanje uticaja oslobađanja endotelnog faktora NO na kontraktilnu krivu fenilefrina kojoj je dodan lerimazolin kao pretretman
- d) Ispitivanje uticaja  $K_{Ca}$  kanala i prostaglandina na kontraktilnu krivu fenilefrina kojoj je dodan lerimazolin kao pretretman
- e) Ispitivanje uloge  $5-HT_{1B}$ ,  $5-HT_{1D}$  i  $5-HT_7$  receptora na smanjenje ili povećanje kontraktilne funkcije fenilefrina kojoj je dodan lerimazolin kao pretretman.

### 4.3.1. Vaskularni efekat fenilefrina u pretretmanu različitim koncentracijama

#### lerimazolina

Pretretman visokim koncentracijama lerimazolina ( $2,1 \times 10^{-3}$  and  $10^{-4}$  M) doveo je do signifikantnog smanjenja maksimalne kontrakcije prouzrokovane fenilefrinom ( $E_{max} = 100 \pm 0,00\%$  i  $8,78 \pm 2,47\%$  ;  $pEC_{50} = 5,46 \pm 0,31$  i  $3,06 \pm 0,72$  za fenilefrin i fenilefrin plus lerimazolin  $2,1 \times 10^{-3}$  M, Slika. 13A,  $n = 7$ ,  $p < 0,05$ ;  $E_{max} = 100 \pm 0,00\%$  i  $9,91 \pm 4,58\%$  ;  $pEC_{50} = 5,60 \pm 0,17$  i  $5,23 \pm 0,23$  za fenilefrin i fenilefrin plus lerimazolin  $10^{-4}$  M, Slika. 13B,  $n = 10$ ,  $p > 0,05$ ).

Međutim, pretretman nižim koncentracijama lerimazolina ( $10^{-6}$  i  $10^{-7}$  M) pokazao je drugačije rezultate: niže koncentracije su dovele do značajne potencijacije kontraktilne krive fenilefrina (Slika 13C i 13D). Dok je lerimazolin u koncentraciji  $10^{-7}$  M prouzrokovao potencijaciju kontraktilne krive fenilefrina na svakoj tački počevši od najniže doze ( $E_{max}$  od  $100 \pm 0,00\%$  u odsustvu do  $168,10 \pm 21,40\%$  u prisustvu lerimazolina, Slika 12D,  $n = 9$ ,  $p < 0,01$ ) bez značajne promjene u vrijednosti  $pEC_{50}$  ( $6,11 \pm 0,20$  kontrola prema  $5,92 \pm 0,27$  u prisustvu lerimazolina), značajno povećanje razlike u maksimalnom odgovoru kod pretretmana sa  $10^{-6}$  M lerimazolina se desilo na  $3 \mu\text{M}$  i  $10 \mu\text{M}$  koncentracijama fenilefrina (Slika 13C,  $n = 10$ ,  $p < 0,05$  na  $3 \mu\text{M}$  i  $P < 0,001$  na  $10 \mu\text{M}$ ).  $E_{max}$  vrijednost je  $100 \pm 0,00\%$  u odsustvu prema  $139,99 \pm 10,65\%$  u prisustvu lerimazolina pri koncentraciji od  $1 \mu\text{M}$ ,  $p < 0,01$ , sa značajnom razlikom u vrijednosti  $pEC_{50}$  ( $5,60 \pm 0,29$  kontrola prema  $4,62 \pm 0,27$ ,  $p < 0,05$ ).



**Slika 13. (A) Koncentracijski zavisna kriva fenilefrina u odsustvu (●) i prisustvu lerimazolina  $2,10 \text{ mM}$  (○). (B) Koncentracijski zavisna kriva fenilefrina u odsustvu (●) i prisustvu lerimazolina  $10^{-4} \text{ M}$  (○). (C) Koncentracijski zavisna kriva fenilefrina u odsustvu (●) i prisustvu lerimazolina  $10^{-6} \text{ M}$  (○). (D) Koncentracijski zavisna kriva fenilefrina u odsustvu (●) i prisustvu lerimazolina  $10^{-7} \text{ M}$  (○). Rezultati (srednje vrijednosti  $\pm$  S.E.M) su izraženi kao procenat maksimalne kontrakcije u odnosu na  $10^{-4} \text{ M}$  kontraktilne vrijednosti fenilefrina. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  prema  $10^{-4} \text{ M}$  fenilefrinu.**

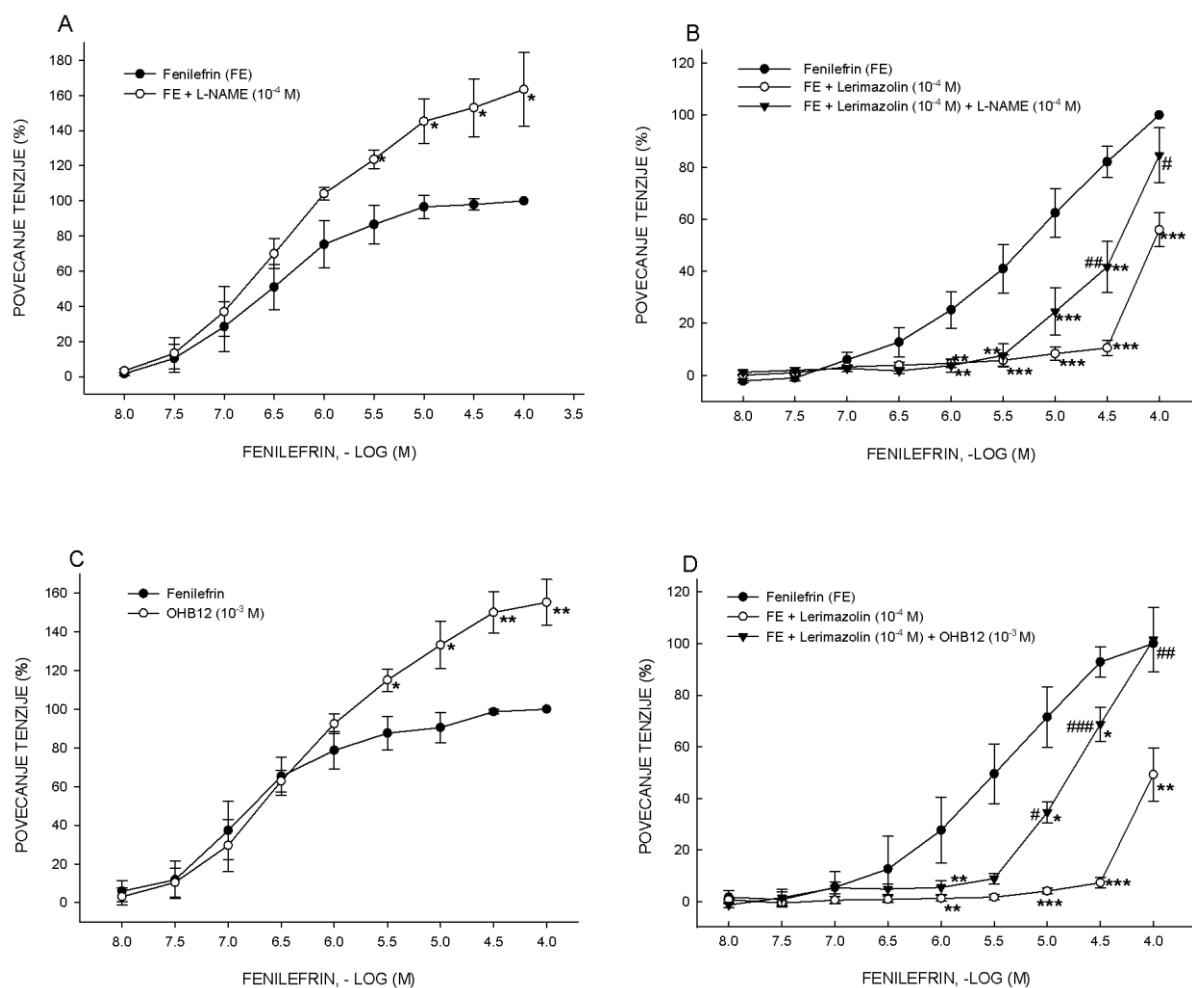
**Tabela 7. Efekti L-NAME, OHB<sub>12</sub>, indometacina, TEA, metiotepina, SB 269970 i BRL 15572 na pEC<sub>50</sub> dobiveni na kontraktilnoj krivoj fenilefrina u prisustvu 10<sup>-4</sup> M lerimazolina.**

	pEC <sub>50</sub>	<i>N</i>	Konc. (μM)
Fenilefrin	5,90 ± 0,19	10	100
Fenilefrin+	5,23 ± 0,23		
Lerimazolin (Kontrola)			
L-NAME			
Kontrola	4,37 ± 0,02	11	100
Kontrola+L-NAME	4,27 ± 0,29		
OHB 12			
Kontrola	4,40 ± 0,01	4	1000
Kontrola+OHB12	4,50 ± 0,21		
METIOTEPIN			
Kontrola	4,38 ± 0,03	7	0,3
Kontrola+Metiotepin	4,49 ± 0,06		
METIOTEPIN			
Kontrola	4,36 ± 0,04	7	1
Kontrola+Metiotepin	4,39 ± 0,14		
METIOTEPIN			
Kontrola	4,36 ± 0,04	5	100
Kontrola+Metiotepin	4,76 ± 0,64		
INDOMETACIN			
Kontrola	4,58 ± 0,34	5	10
Kontrola+Indometacin	4,44 ± 0,10		
TEA			
Kontrola	4,37 ± 0,03	8	1000
Kontrola+TEA	4,42 ± 0,10		

**Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna greška; pEC<sub>50</sub> koncentracije lerimazolina koji prouzrokuje 50% maksimalne kontrakcije.**

#### **4.3.2. Efekti L-NAME i OHB<sub>12</sub> na kontraktilnu funkciju fenilefrina u pretretmanu sa lerimazolinom**

Cilj je bio ispitati uticaj L-NAME ( $10^{-4}$  M) i OHB<sub>12</sub> ( $10^{-3}$  M) na kontraktilnu funkciju fenilefrina u odsustvu i prisustvu lerimazolina ( $10^{-4}$  M). L-NAME je doveo do potencijacije maksimalne kontrakcije fenilefrina, koja se povećala sa 100% na  $163,38 \pm 21,06\%$  (Slika.14A; n = 3, P < 0,05). Dodavanje lerimazolina kao pretretmana u konstrukciji kontraktilne krive fenilefrina, dovelo je do značajnog pada (P < 0,001) nivoa maksimalne kontrakcije fenilefrina sa 100% na  $55,95 \pm 6,47\%$  (Slika 14B, n = 11). L-NAME je u potpunosti spriječio lerimazolinom induciranu inhibiciju kontraktilne krive fenilefrina i značajno povećao maksimalnu kontrakciju fenilefrina pretretiranog sa lerimazolinom ( $10^{-4}$  M) sa  $55,95 \pm 6,47\%$  na  $84,59 \pm 10,49\%$  (Slika 14B; P < 0,05). U istom eksperimentalnom protokolu kao i sa L-NAME, OHB<sub>12</sub> je doveo do potencijacije maksimalne kontrakcije fenilefrina sa 100% na  $155,25 \pm 11,76\%$  (Slika 14C; n = 6, P < 0.01). Maksimalni odgovor fenilefrina pretretiranog sa lerimazolinom takođe je značajno uvećan kada se dodao OHB<sub>12</sub> sa  $49,18 \pm 1025\%$  na  $101,53 \pm 12,49\%$  (Slika 14D; n = 4, P < 0,01).

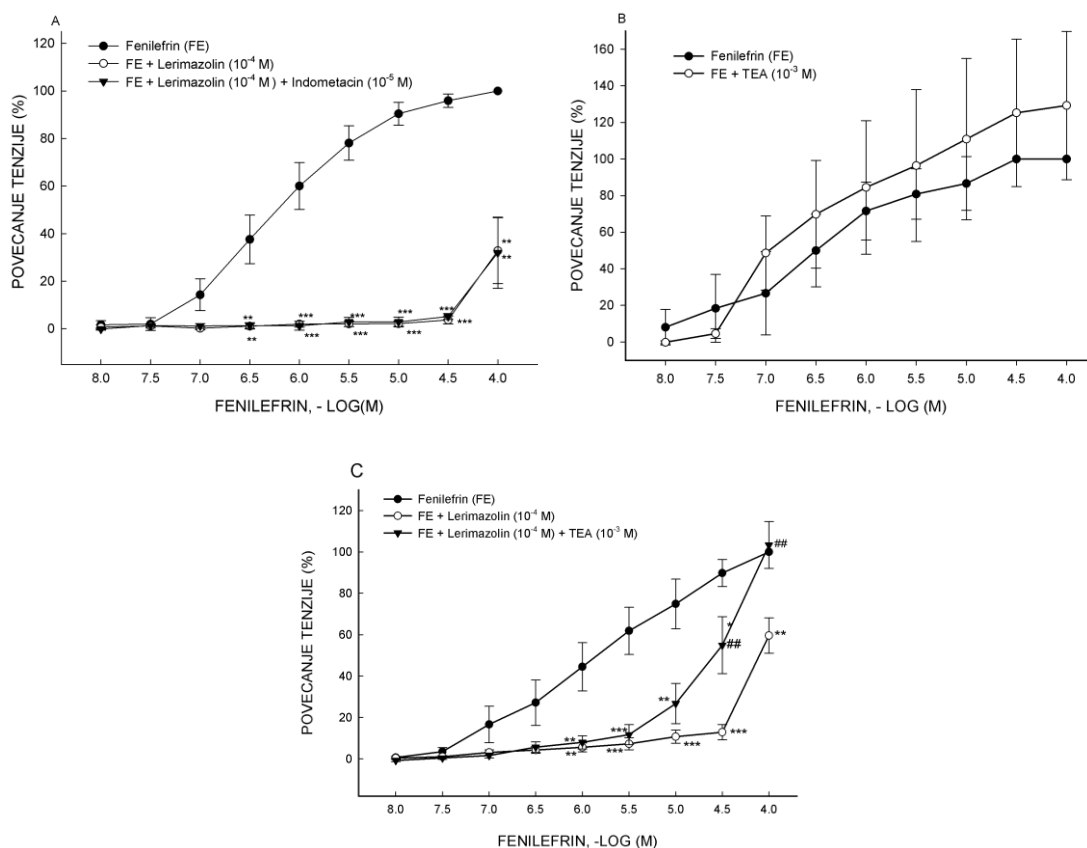


**Slika 14. (A) Efekti  $10^{-4}$  M L-NAME na koncentracijski zavisnu krivu fenilefrina u odsustvu  $10^{-4}$  M lerimazolina. (B) Efekti  $10^{-4}$  M L-NAME na koncentracijski zavisnu krivu fenilefrina u pretretmanu sa  $10^{-4}$  M lerimazolina . (C) Efekti  $10^{-3}$  M OHB<sub>12</sub> na koncentracijski zavisnu krivu fenilefrina u odsustvu  $10^{-4}$  M lerimazolina. (D) Efekti  $10^{-3}$  M OHB<sub>12</sub> na koncentracijski zavisnu krivu fenilefrina u pretretmanu sa  $10^{-4}$  M lerimazolinom. Rezultati (srednje vrijednosti $\pm$ S.E.M) su izraženi kao procenat maksimalne kontrakcije u odnosu na sam fenilefrin. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  prema  $10^{-4}$  M fenilefrinu; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  prema fenilefrin plus lerimazolin.**

#### 4.3.3. Efekti indometacina i TEA-e na kontraktilnu funkciju fenilefrina u pretretmanu sa lerimazolinom

U sljedećem setu eksperimenata, interakcija između fenilefrina i lerimazolina je ispitana u prisustvu indometacina ili tetraetilamonijuma (TEA). Dok inhibitor ciklooksigenaze indometacin ( $10^{-5}$  M) nije imao nikakav uticaj na inhibitorno dejstvo lerimazolina ( $10^{-4}$  M) na

kontraktilnu krivu fenilefrina (Slika 15A;  $n = 5$ ,  $p > 0,05$ ), u prisustvu blokatora  $K_{Ca}$  kanala TEA ( $10^{-3}$  M) došlo je do uvećanja  $E_{max}$  fenilefrina koji je pretretiran sa lerimazolinom. Dok TEA nije značajno uticala na maksimalnu kontrakciju fenilefrinske kontrolne krive (Slika 15B;  $n = 4$ ,  $p > 0,05$ ), značajno je uvećala maksimalnu kontrakciju fenilefrina u pretretmanu sa lerimazolinom ( $10^{-4}$  M) sa  $59,56 \pm 8,53$  % na  $103,32 \pm 11,31$  % (Slika 15C;  $n = 8$ ,  $p < 0,01$ ).

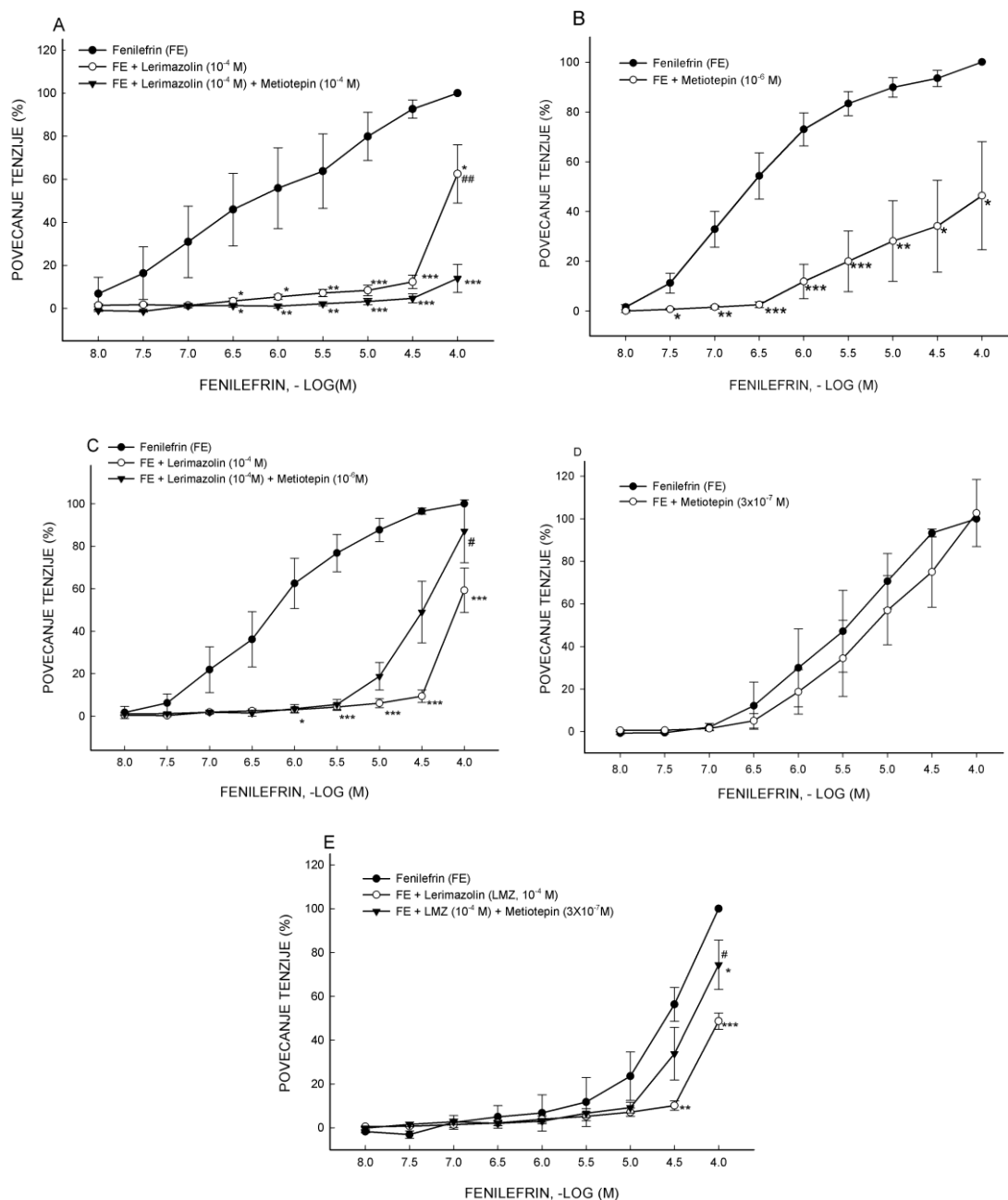


**Slika 15. (A) Efekat  $10^{-5}$  M indometacina na koncentracijski zavisnu krivu fenilefrina u pretretmanu sa  $10^{-4}$  M lerimazolinom. (B) Efekat TEA  $10^{-3}$  M na koncentracijski zavisnu krivu fenilefrina u odsustvu  $10^{-4}$  M lerimazolina. (C) Efekat TEA  $10^{-3}$  M na koncentracijski zavisnu krivu fenilefrina u pretretmanu sa  $10^{-4}$  M lerimazolina. Rezultati (srednje vrijednosti  $\pm$  S.E.M) su izraženi kao procenat maksimalne kontrakcije u odnosu na sam fenilefrin. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  prema fenilefrinu; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  prema fenilefrin plus lerimazolin.**



#### **4.3.4. Efekti metiotepina na kontraktilnu funkciju fenilefrina u pretretmanu sa lerimazolinom**

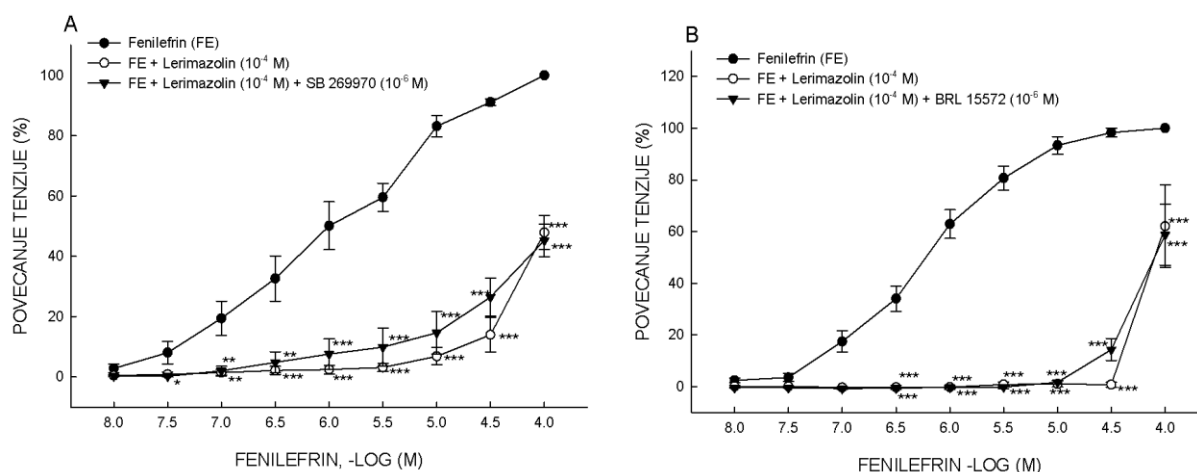
Uticaj međusobne kombinacije fenilefrina i lerimazolina na antagonizam metiotepinom je testiran koristeći tri različite koncentracije metiotepina ( $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  i  $3 \times 10^{-7}$  M). Koncentracija od  $10^{-4}$  M metiotepina dovela je do značajnog smanjenja maksimalne kontrakcije fenilefrina u pretretmanu sa lerimazolinom ( $E_{max}$ :  $62,49 \pm 13,58$  %  $10^{-4}$  M lerimazolina prema  $13,94 \pm 6,52$  %  $10^{-4}$  M lerimazolin plus  $10^{-4}$  M metiotepin, Slika 16A;  $n = 5$ ,  $p < 0,01$ ). Pretretman sa  $10^{-6}$  M metiotepinom na fenilefrinsku kontrakciju bez lerimazolina rezultirao je inhibicijom maksimalnog odgovora (Slika 16B,  $n = 6$ ), dok nije bilo promjene u maksimalnom odgovoru fenilefrinske koncentracijski zavisne krive u pretretmanu sa  $3 \times 10^{-7}$  M bez lerimazolina (Slika 16D,  $n = 4$ ). U prisustvu koncentracija od  $10^{-6}$  i  $3 \times 10^{-7}$  M metiotepina došlo je do povećanja koncentracijski zavisne krive fenilefrina u pretretmanu sa lerimazolinom na najveće tri koncentracije ( $E_{max}$ :  $59,24 \pm 10,42$  %  $10^{-4}$  M lerimazolin prema  $87,08 \pm 14,83$  %  $10^{-4}$  M lerimazolin plus  $10^{-6}$  M metiotepin, Slika 16C,  $n = 7$ ;  $48,68 \pm 3,73$  %  $10^{-4}$  M lerimazolin prema  $74,42 \pm 11,27$  % lerimazolin plus  $3 \times 10^{-7}$  M metiotepin, Slika 16E;  $n = 7$ ,  $p < 0,05$ ).



**Slika 16. (A) Efekat  $10^{-4}$  M metiotepina na koncentracijski zavisnu krivu fenilefrina u pretretmanu sa  $10^{-4}$  M lerimazolina. (B) Efekat  $10^{-6}$  M metiotepina na koncentracijski zavisnu krivu fenilefrina u odsustvu lerimazolina. (C) Efekat  $10^{-6}$  M metiotepina na koncentracijski zavisnu krivu fenilefrina u pretretmanu sa  $10^{-4}$  M lerimazolina. (D) Efekat  $0.3 \mu\text{M}$  metiotepina na koncentracijski zavisnu krivu fenilefrina u odsustvu lerimazolina. (E) Efekat  $0.3 \mu\text{M}$  metiotepina na koncentracijski zavisnu krivu fenilefrina u pretretmanu sa  $10^{-4}$  M lerimazolina. Rezultati (srednje vrijednosti  $\pm$  S.E.M) su izraženi kao procenat maksimalne kontrakcije u odnosu na sam fenilefrin. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  prema fenilefrinu; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  prema fenilefrin plus lerimazolin.**

#### 4.3.5. Efekti SB 269970 i BRL 15572 na kontraktilnu funkciju fenilefrina u pretretmanu sa lerimazolinom

Ispitivan je uticaj podtipova receptora 5-HT<sub>7</sub> i 5-HT<sub>1D</sub>. Korišteni su SB 269970, visoko selektivni antagonist za 5-HT<sub>7</sub> receptor, i BRL 15572, selektivni antagonista za 5-HT<sub>1D</sub> receptor. Rezultati su pokazali da ni SB 269970 niti BRL 15572 nisu uspjeli promjeniti bazalni tonus prouzrokovan lerimazolinom ( $47,89 \pm 5,52\%$   $10^{-4}$  M lerimazolina prema  $45,24 \pm 5,42\%$  lerimazolin plus  $10^{-6}$  M SB 269970, Slika 17A,  $n = 9$ ,  $p > 0,05$ ;  $62,08 \pm 16,01\%$   $10^{-4}$  M lerimazolin prema  $58,76 \pm 11,74\%$  lerimazolin plus  $10^{-6}$  M BRL 15572, Slika 17B,  $n = 6$ ,  $p > 0,05$ ).

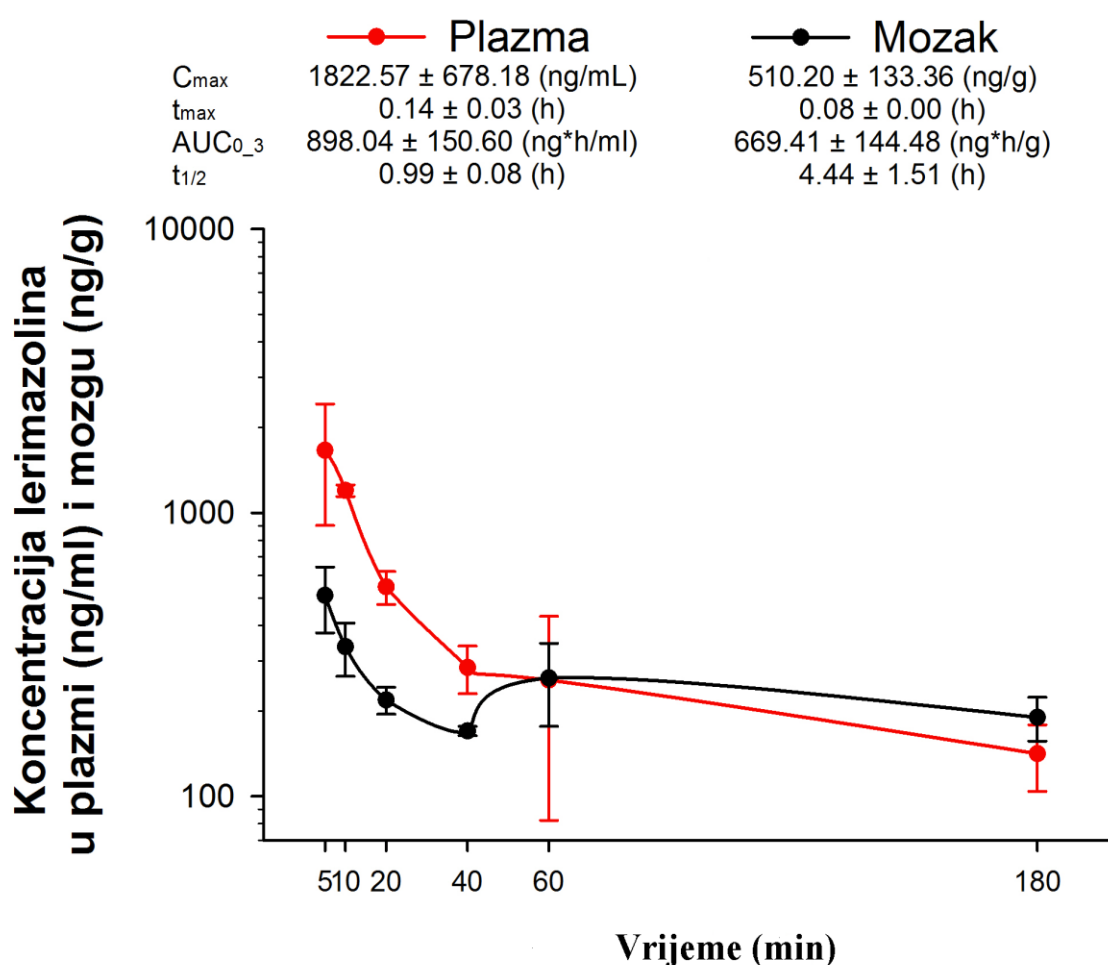


Slika 17. (A) Efekat  $10^{-6}$  M SB 269970 na koncentracijski zavisnu krivu fenilefrina u pretretmanu sa  $10^{-4}$  M lerimazolina. (B) Efekat BRL 15572  $10^{-6}$  M na koncentracijski zavisnu krivu fenilefrina u pretretmanu sa  $10^{-4}$  M lerimazolina. Rezultati (srednje vrijednosti  $\pm$  S.E.M) su izraženi kao procenat maksimalne kontrakcije u odnosu na sam fenilefrin. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  prema fenilefrinu; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  prema fenilefrin plus lerimazolin.

#### 4.4. Određivanje koncentracije lerimazolina i slobodna frakcija u plazmi/serumu i mozgu pacova

Koncentracijski raspon lerimazolina u plazmi i mozgu pacova poslije intraperitonealne aplikacije u dozi od 5 mg/kg, sa izračunatim farmakokinetičkim parametrima, prikazan je na Slici 17.

U svim intervalima uzimanja uzoraka (5, 10, 20, 40, 60 i 180 min nakon i.p. injekcije lerimazolina u dozi od 5 mg/kg), koncentracije lerimazolina u plazmi i homogenatu mozga bile su detektabilne, i u granicama vrijednosti očekivanih za supstancu koja se dobro apsorbira nakon sistemske primjene (slika 18). Koncentracije u plazmi su bile generalno veće od koncentracija u mozgu, ali je ukupna raspoloživost lijeka u moždanom tkivu, na osnovu odnosa parametra površine ispod krive koncentracije lijeka u vremenu, bila visoka, na nivou 75% one u cirkulaciji. Kinetički profil pokazuje da je nastup potencijalnog dejstva brz, kako u sistemske cirkulaciji, tako i u nervnom tkivu.



Slika 18. Koncentracija lerimazolina u plazmi (ng/ml) i mozgu (ng/g) poslije intraperitonealne aplikacije u dozi od 5 mg/kg (n=3).  $C_{max}$  = maksimalna koncentracija u mozgu i plazmi;  $T_{max}$  = vrijeme maksimalne koncentracije u mozgu i plazmi;  $t_{1/2}$  = poluvrijeme eliminacije u mozgu i plazmi; AUC = površina ispod koncentracijsko-vremenske krive za mozak i plazmu između 0 do 3h.

Molarne koncentracije lerimazolina u plazmi (nmol/l) i mozgu pacova (nmol/kg), ukupne i slobodne procjenjene, mjerene 20 minuta poslije i.p. primjene lerimazolina (5 mg/kg), prikazane su u Tabeli 8. Slobodna frakcija lijeka lerimazolina se računala množenjem dobivene ukupne koncentracije u plazmi i mozgu sa slobodnom frakcijom lijeka (24,51% za mozak i 27,78% za plazmu) određenom metodom brze ekvilibrijumske dijalize.

**Tabela 8. Ukupna i procjenjena slobodna koncentracija lerimazolina (nakon i.p. primjene doze od 5 mg/kg) u plazmi i moždanom tkivu pacova nakon 5, 10, 20, 40, 60 i 180 minuta poslije intraperitonealne primjene. Svaki podatak predstavlja srednju vrijednost ili srednju vrijednost  $\pm$  S.E.M., n = 3.**

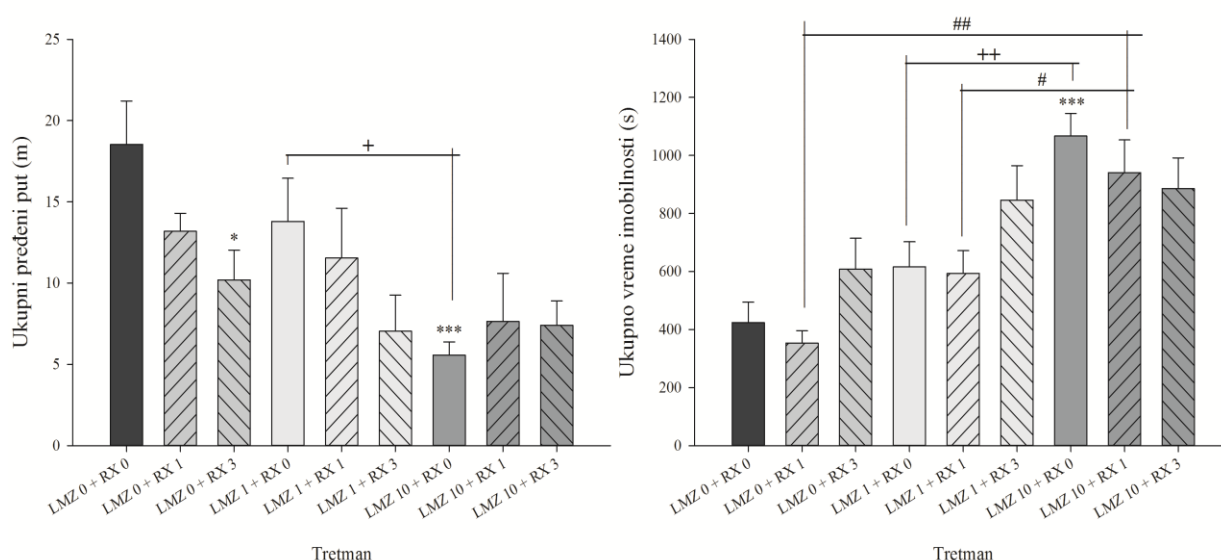
Doza (mg/kg)		5					
Vrijeme (min.)		5	10	20	40	60	180
Plazma (nmol/l)	<i>Ukupna konc.</i>	6958,46 $\pm$ 3179,43	5017,00 $\pm$ 232,04	2293,32 $\pm$ 303,84	1190,58 $\pm$ 226,65	1074,96 $\pm$ 730,79	591,89 $\pm$ 156,13
	<i>Slobodna konc.</i>	193,61	1393,40	636,94	330,67	298,56	164,39
Mozak (nmol/kg)	<i>Ukupna konc.</i>	2136,85 $\pm$ 558,53	1409,43 $\pm$ 300,53	915,02 $\pm$ 99,48	712,10 $\pm$ 27,61	1093,97 $\pm$ 355,94	795,39 $\pm$ 139,82
	<i>Slobodna konc.</i>	52,38	34,55	22,43	17,45	26,81	19,50

Dobijene vrijednosti procjenjenih slobodnih frakcija lerimazolina u moždanom tkivu, na nivou više desetina nM, korespondiraju sa vrijednostima afiniteta koji lerimazolin ima za one receptore za koje se najviše veže (umjereni afiniteti), i to je bila potvrda da je ispitivanje potencijalnih efekata lerimazolina na ponašanje ogleđnih životinja validno i istraživački relevantno.

## 4.5. Bihevioralni testovi

### 4.5.1. Test spontane lokomotorne aktivnosti (SLA)

Rezultati ispitivanja lokomotorne aktivnosti pacova analizirani su dvofaktorskom ANOVOM u kojoj su kao faktori korišćeni nivoi tretmana lerimazolin (0, 1 i 10 mg/kg), odnosno  $\alpha_2$  antagonist RX 821002 (0, 1 i 3 mg/kg). Efekat lerimazolina je bio značajan ( $F(2, 63) = 7,667$ ,  $p = 0,001$ ), a RX 821002 je ispoljio statistički trend smanjenja lokomotorne aktivnosti ( $F(2, 63) = 2,978$ ,  $p = 0,058$ ). Interakcija dva faktora nije bila statistički značajna ( $F(4, 71) = 1,627$ ,  $p = 0,178$ ). Procedura višestrukog uparenog *posthoc* poređenja SNK metodom je pokazala više značajnosti između pojedinačnih tretmana koje su prikazane na Slici 19a. Dok je kod ukupnog pređenog puta kao praćenog parametra utvrđena značajnost efekta ne samo lerimazolina u visokoj dozi (10 mg/kg), već i antagoniste RX 821002 u dozi od 3 mg/kg, relativni odnosi su bili drugačiji kod ukupnog vremena imobilnosti kao praćenog parametra. Za ovaj parametar, efekat lerimazolina je bio značajan ( $F(2, 63) = 22,567$ ,  $p < 0,001$ ), za razliku od efekata faktora RX 821002 ( $F(2, 63) = 2,018$ ,  $p = 0,141$ ). Interakcija dva faktora nije bila statistički značajna ( $F(4, 71) = 1,688$ ,  $p = 0,164$ ). Hipolokomotorni uticaj lerimazolina u visokoj dozi nije bio podložan prevenciji primjenom RX 821002, što znači da vezivanje za  $\alpha_2$  adrenergičke receptore ne predstavlja supstrat za ispoljavanje sedativnog dejstva ispitivanog simpatomimetika.



Slika 19. Efekti lerimazolina (LMZ) u dozama 1 i 10 mg/kg i selektivnog  $\alpha_2$  adrenergičkog antagoniste RX 821002, primjenjenih samih ili u kombinaciji, na a) pređeni put i b) ukupno

vrijeme imobilnosti u testu spontane lokomotorne aktivnosti. Prikazane značajnosti dobijene su analizom dvofaktorskom ANOVOM sa ponavljanjem i dodatnom procedurom višestrukog uparenog posthoc poređenja SNK metodom. \*,\*\*\*  $p < 0.05$  i  $p < 0.001$  u odnosu na kontrolnu grupu (LMZ0 + RX0); <sup>+</sup>, <sup>++</sup>  $p < 0.05$  i  $p < 0.01$  u odnosu na grupu LMZ1 + RX0; <sup>#</sup>, <sup>###</sup>  $p < 0.05$  i  $p < 0.01$  u odnosu na grupu LMZ10 + RX1.

#### 4.5.2. Uzdignuti plus lavirint

Ispitivan u desetostrukom rasponu doza, od 1 do 10 mg/kg, lerimazolin je pokazao potencijal dozno-zavisnog smanjenja dva od tri parametra u uzdignutom plus lavirintu koji su povezani sa lokomotornom aktivnošću: ukupnog pređenog puta i broja ulaza u sve krake lavirinta (Tabela 9). Parametri povezani sa nivoom anksioznosti (procenat ulazaka i vremena provedenog u otvorenim kracima lavirinta) nisu bili značajno izmjenjeni pod dejstvom lerimazolina, što znači da ovaj simpatomimetik ispoljava u višim dozama sedaciji-slično dejstvo koje nije praćeno promjenom u nivou anksioznosti.

**Tabela 9. Statistička analiza ispitivanja uticaja lerimazolina na ponašanje pacova u testu uzdignutnog plus lavirinta. \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolnu grupu (rastvarač).**

Parametar/ Grupe	Ukupni pređeni put	Ukupan broj ulazaka u krake	Broj ulazaka u zatvorene krake	% vremena provedenog u otvorenim kracima	% ulazaka u otvorene krake
Rastvarač (n=7)	11,27±0,45 <sup>†</sup>	12,14±0,63	5,86±0,63	51,79±7,33	51,68±4,55
Lerimazolin 1 mg/kg (n=8)	9,46±1,02	10,12±1,04	5,75±0,67	37,86±7,90	43,54±4,51
Lerimazolin 5 mg/kg (n=7)	7,26±0,65*	7,71±0,64*	4,86±0,46	35,66±7,78	36,57±4,45
Lerimazolin 10 mg/kg (n=7)	7,70±1,38*	7,71±1,58*	4,43±0,69	39,12±9,13	37,41±7,12
F(3,25) vrednost	3,57	4,01	1,22	0,79	1,72
P vrednost	0,028	0,018	0,323	0,511	0,189

<sup>†</sup> sve numeričke vrijednosti u tabeli su prikazane kao srednje vrijednosti ± standardna greška

#### 4.5.3. Rotarod test i pentilentetrazolski infuzioni test

Imajući u vidu rezultate u prethodnim testovima (testu spontane lokomotorne aktivnosti i uzdignutog plus lavirinta), u testu motorne spretnosti ispitane su samo dvije više doze lerimazolina. Pacovi tretirani sa 5 i 10 mg/kg lerimazolina su ispoljili normalnu motornu koordinaciju i balans u rotarod testu u odnosu na kontrolu. Jednofaktorska ANOVA ( $F(2,22) = 0,742$ ,  $P = 0,489$ , Tabela 10) nije pokazala značajnu razliku između kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa 5 mg/kg i 10 mg/kg lerimazolina kao ni značajnu razliku između pacova tretiranih sa 5 mg/kg u komparaciji sa pacovima tretiranim sa 10 mg/kg lerimazolina.

Jednofaktorska ANOVA pokazala je da u pentilentetrazolskom testu nije bilo statistički značajnog efekta tretmana sa nijednom od aplicirane tri doze ( $F(3,26) = 0,857$ ,  $P = 0,477$ , Tabela 10). Prema tome, u korišćenom rasponu doza lerimazolin nije utjecala na susceptibilnost na razvoj konvulzivne aktivnosti indukovane inhibicijom GABA-ergičke neurotransmisije.

**Tabela 10. Efekti različitih intraperitonealnih doza lerimazolina u rotarod i pentilentetrazolskom testu (PTZ), vrijednosti izražene kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna greška.**

TRETMAN	SREDNJA VRIJEDNOST $\pm$ STANDARDNA GREŠKA	BROJ PACOVA U GRUPI (n)
<b>Rotarod test</b>		
Vrijeme provedeno na rotarodu pri 15 rpm ( <i>rounds per minute</i> )		
SOL	120	4
5 mg/kg lerimazolin	108,75 $\pm$ 11,25	8
10 mg/kg lerimazolin	102,86 $\pm$ 14,17	7
<b>Pentilentetrazol test</b>		
Doze pentilentetrazola neophodne da izazovu napad		
SOL	62,68 $\pm$ 6,31	7
1 mg/kg lerimazolin	70,36 $\pm$ 7,34	6
5 mg/kg lerimazolin	83,14 $\pm$ 8,73	8
10 mg/kg lerimazolin	72,54 $\pm$ 15,09	6
<b>SOL- rastvarač</b>		



## 5. DISKUSIJA

### 5.1. In vitro nalazi

Lerimazolin je prisutan na tržištu i klinički poznat dug vremenski period kao topikalni simpatomimetik, ali je rijetko proučavan (Malta i sar., 1980; 1981; Nathanson, 1985; Boudier i sar., 1975). Law i saradnici (1998) su otkrili da ovaj derivat imidazolina ispoljava nanomolarni afinitet na humanim 5-HT<sub>1D</sub> receptorima ( $K_i = 72$  nM) i mikromolarni afinitet na humanim 5-HT<sub>1B</sub> receptorima ( $K_i = 3480$  nM). U ekperimentima rađenim na ćelijama kineskih hrčaka koje ispoljavaju humane rekombinantne 5-HT<sub>1B</sub> i 5-HT<sub>1D</sub> receptore, lerimazolin je spriječio forskolinom inducirano povećanje koncentracije cAMP, što bi moglo biti direktno povezano sa agonističkom aktivnošću na obje vrste receptora, koji su vezani za G<sub>i</sub> protein (Law i sar., 1998).

U drugom istraživanju sprovedenom od strane Law-a i saradnika (1998), istraživala se kontraktilna funkcija lerimazolina na veni safeni kunića u pretretmanu sa prazosinom, idazoksanom i indometacinom kako bi se isključili mogući adrenergički  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  ili prostaglandinski efekti. Utvrđeno je da je EC<sub>50</sub> lerimazolina u iznosu od 150 nM slično vrijednosti koju je kao pozitivna kontrola pokazao agonist 5-HT<sub>1B/D</sub> receptor sumatriptan (EC<sub>50</sub> = 220 nM). Bhattacharya i saradnici (2003) izvršili su pretretman vene safene kunića u odsustvu endotela sa sumatriptanom ili agonistom 5-HT<sub>1D</sub> receptora PNU-109291. Dok se kontrakcija nije desila sa PNU-109291, visoko selektivni antagonist 5-HT<sub>1B</sub> receptora MPPA-4F je doveo do kompetitivnog antagonizma kontraktilnog efekta sumatriptana (Bhattacharya i sar., 2003). Moglo bi se zaključiti na osnovu ovog istraživanja da bi se većinska uloga kontraktilne funkcije lerimazolina na krvnim sudovima mogla pripisati aktivaciji 5-HT<sub>1B</sub> receptora. Međutim, relativno nizak afinitet lerimazolina na 5-HT<sub>1B</sub> receptorima (3480 nM; Law i sar., 1998) nije usaglašen sa potentnošću izazivanja kontrakcije na veni safeni kunića.

U ovoj studiji, koja je kao model koristila dobro validiranu i najčešće korištenu pacovsku aortu (Rameshrad i sar., 2016), lerimazolin je ispoljio 40-55% jačine kontrakcije  $\alpha_1$  selektivnog simpatomimetskog amina fenilefrina. Kontrakcija lerimazolina postignuta na otprilike 70% ispitanih preparata bi mogla da izazove nedoumicu vezanu za replikativnost, ali se može porediti sa kontraktilnom aktivnošću sumatriptana koja je zapažena na većini, ali ne na svim humanim mezenteričnim arterijama (Gul i sar., 2003). Studije vezivanja radio-obilježenih liganada na  $\alpha_1$  i 5-HT podvrstama receptora (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> i 5-HT<sub>2A</sub>) sugerišu da bi 5-HT<sub>1A</sub> i 5-HT<sub>1D</sub> receptori mogli da budu prvi stimulirani, pri koncentracijama

manjim od 100 nM. Međutim, kontraktilna aktivnost lerimazolina započinje od koncentracije 10  $\mu$ M, što bi ukazalo na vjerovatniju mogućnost da su nisko afinitetna mjesta vezivanja odgovorna za kontraktilni efekat. Pokazalo se također da koncentracijski-zavisna kriva lerimazolina ne može održati plato, što ukazuje na neke moguće vazodilatatorne mehanizme koji se aktiviraju pri visokim koncentracijama, što otežava sagledavanje supstrata vazokonstriktornog dejstva.

Plan istraživanja je prvo podrazumjevaao provjeravanje hipoteze da su  $\alpha_1$  i/ili  $\alpha_2$  receptori odgovorni za kontraktilni mehanizam lerimazolina, i zato su efekti lerimazolina ispitivani u prisustvu  $\alpha_1$  antagoniste prazosina (Ford i sar., 1997) ili  $\alpha_2$  antagoniste RX 821002 (Devedjian i sar., 1994). Pokazalo se da RX 821002 nema nikakvog efekta na kontraktilni efekat lerimazolina, dok je kontrakcija inhibirana prazosinom, sa redukcijom u maksimalnom efektu. Pretretman sa kombinacijom prazosina i RX 821002 je otkrio skoro identičan nivo redukcije maksimalne kontrakcije kao kada je prazosin korišten sam kao pretretman, iz čega bi se moglo zaključiti da lerimazolin uzrokuje kontrakciju pacovske aorte putem  $\alpha_1$  adrenoceptora ali ne i putem  $\alpha_2$  adrenoceptora.

Kako bi sa sigurnošću isključili mogući uticaj  $\alpha_2$  receptora u kontrakciji, koncentracijski-zavisna kriva lerimazolina je konstruisana u prisustvu rauvolscina koji je dobro poznat  $\alpha_2$  antagonist sa pKi vrijednošću na humanim  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  i  $\alpha_{2C}$  receptorima od 8.4, 8.3 and 9.1 (Uhlén i sar., 1994). U prisustvu rauvolscina, došlo je do pomjeranja udesno koncentracijski-zavisne krive lerimazolina bez značajne promjene u maksimalnom odgovoru. Rezultat bi se mogao tumačiti u smislu djelovanja lerimazolina putem  $\alpha_1$  adrenoceptora, kroz činjenicu da rauvolscin ispoljava antagonističko dejstvo i na  $\alpha_1$  adrenoceptorima kod pacova, što je dokazano u studiji sa radio-obilježenim ligandima na pacovskom cerebralnom korteksu, sa vrijednošću odnosa vezivanja za dva tipa receptora ( $K_i$  odnos na  $\alpha_1/\alpha_2$  receptorima) od samo 5,5 (Doxey i sar., 1984). Govoreći o  $\alpha_2$  receptorima, najznačajniju ulogu u kontrakciji sinusoida i arteriovenskih anastomoza na humanoj nazalnoj mukozi ima  $\alpha_{2C}$  podvrsta receptora (Stafford-Smith i sar., 2007), ali u eksperimentu provedenom sa  $\alpha_{2C}$  antagonistom JP 1302 nije došlo do promjene na lerimazolin-induciranoj kontrakciji. Rezultati koji se tiču  $\alpha_2$  receptora se mogu povezati sa činjenicom da lerimazolin u dozi do 100 nmola ne uzrokuje bradikardiju poslije intrahipotalamičke injekcije kod pacova, dok klonidin, dobro poznati  $\alpha_2$ -selektivni agonist, uzrokuje bradikardiju već u dozi od 7 nmola (Boudier i sar., 1975). Nadalje, u istoj studiji,  $\alpha_1$ -selektivni agonist fenilefrin i tramazolin su prouzrokovali bradikardiju, iako u nešto većoj dozi od 40 nmola, dok neselektivni  $\alpha$  receptor oksimetazolin

nije prouzrokovao bradikardiju u dozi do 100 nmola. Teško da su ovi rezultati mogli biti konzistentni sa potencijalnom aktivnošću lerimazolina na  $\alpha_2$  receptorima, tako da se smjer istraživanja morao pomjeriti ka serotoninskom mehanizmu djelovanja lerimazolina. Uključujući neselektivnog serotoninskog antagonistu metiotepin kao pretretman, eksperimenti su pokazali snažno inhibirajuće dejstvo na kontraktilnu funkciju lerimazolina. Međutim, kako uticaj metiotepina na inhibiciju kontrakcije uključuje moguću ulogu 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B/1D</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> ili 5-HT<sub>2C</sub> receptora, dodatni ekperimenti su bili neophodni kako bi se otkrila uloga pojedinih receptora u kontraktilnom dejstvu lerimazolina.

Da bi testirali hipotezu o djelovanju lerimazolina preko 5-HT<sub>1B</sub> i/ili 5-HT<sub>1D</sub> receptora, korišteni su visoko selektivni 5-HT<sub>1B</sub> i 5-HT<sub>1D</sub> receptor antagonisti SB 224289 i BRL 15572. Nijedan antagonist nije značajno uticao na kontraktilnu funkciju lerimazolina, što nije u saglasnosti sa prethodnom diskusijom o aktivnosti lerimazolina na veni safeni kunića (Law i sar., 1998).

Kod većine pacovskih arterija, 5-HT<sub>2A</sub> receptori su primarno odgovorni za 5-HT kontraktilno dejstvo, što je dokazano efektivnošću agonista kao što su DOI i  $\alpha$ -metil-5-HT, i antagonizmom kontrakcije sa ketanserinom i MDL 100907 (Watts i Thompson, 2003). Dok se u eksperimentu pokazalo da obje koncentracije ketanserina značajno smanjuju kontrakciju lerimazolina, analiza korelacije literaturnih vrijednosti za 5-HT<sub>2A</sub> receptore je pokazala visoku i značajnu korelaciju sa pK<sub>b</sub> vrijednošću ketanserina u primjenjenoj dozi od 10 nM, ali ne i od 1  $\mu$ M. Očekivano je da će ketanserin u nižoj dozi (10 nM) antagonizirati receptore za koje ima najveći afinitet (pK<sub>i</sub> za 5-HT<sub>2A</sub> 8.6-9.0), dok u višim koncentracijama antagonizuje i  $\alpha_1$  receptore (pK<sub>i</sub> 7.8-8.2; Yoshio i sar., 2001). Zbog sličnosti u rezultatima sa dvije različite koncentracije ketanserina, dominacija 5-HT<sub>2A</sub> receptora u odnosu na  $\alpha_1$  može biti postulirana. Ukupno, rezultati ukazuju na mogućnost da su 5-HT<sub>2A</sub> receptori i nešto manje  $\alpha_1$  receptori odgovorni za lerimazolin-induciranu kontrakciju na izolovanoj pacovskoj aorti. Ovakav receptorski profil svrstava lerimazolin u grupu "atipičnih dekonjestanata", različitih od drugih imidazolinskih derivata. Modulacija lijekom različitih ciljnih mjesta u svrhu postizanja optimalnog terapijskog ishoda je obećavajući pristup u modernoj farmakologiji.

Druga vrsta eksperimentalnog pristupa išla je u cilju ispitivanja interakcija lerimazolina sa fenilefrinom kao standardnim dekonjestantom (prisutnim i u Adrianol kapima), primarno zbog mogućnosti da bi se "rebound" kongestija mogla prevazići polifarmakološkim pristupom administracije dekonjestanata sa različitim mehanizmom dejstva. Naša studija je pokazala poprilično komplikovanu interakciju između fenilefrina, vazokonstriktora

selektivnog za  $\alpha_1$  receptore i lerimazolina, imidazolina čija se skromna vazokonstriktorna aktivnost pripisuje više aktivaciji 5-HT<sub>1B</sub> (Law i sar., 1998) ili 5-HT<sub>2A</sub> (sadašnji rezultati) nego  $\alpha_1$  adrenergičkih receptora. Dok niže koncentracije lerimazolina ( $10^{-6}$  ili  $10^{-7}$  M) potenciraju vazokonstriktornu aktivnost fenilefrina, lerimazolin u višim koncentracijama ( $10^{-4}$  M i većim) prividno paradoksalno uspjeva da smanji vazokonstrikciju fenilefrina, što je bio nalaz koji je zahtjevao dalja istraživanja.

Potencijacija fenilefrinske kontrakcije niskim koncentracijama lerimazolina mogla bi se objasniti na sljedeći način: fenilefrin aktivira  $\alpha_1$  receptore na glatko mišićnim ćelijama i uzrokuje jak vazokonstriktivni efekat, dok lerimazolin prouzrokuje isti efekat aktivacijom 5-HT<sub>2A</sub> (sadašnji rezultati) ili 5-HT<sub>1B</sub> receptora (Law i sar., 1998). Što se tiče antagonističkog efekta visokih doza lerimazolina na fenilefrinskoj kontrakciji, eksperimenti su pokazali da kumulativno dodavanje koncentracije lerimazolina od  $10^{-4}$  M (koncentracija koja značajno smanjuje kontraktilni efekat fenilefrina) uzrokuje kontrakciju pacovske aorte jačine oko 20% kontraktilnog odgovora prouzrokovanog sa  $10^{-4}$  M fenilefrina, dok dodavanje odjednom iste koncentracije ne prouzrokuje promjenu u tonusu krvnog suda. Međutim, u slučaju jednokratnog a ne kumulativnog dodavanja, lerimazolin je dodavan u organsko kupatilo nakon odrađenog eksperimentalnog protokola konstrukcije kumulativne koncentracijski zavisne krive fenilefrina i ispiranja, pa je u tim uslovima moglo doći do homologne (vezane za  $\alpha_1$  receptore) ili vjerovatnije do heterologne (vezane za podvrste 5-HT receptora) desenzitizacije, objašnjene u detalje na primjeru aorte kunića eksponirane noradrenalinu i angiotenzinu II (Jerez i sar., 2004).

Dva glavna pitanja koja se postavljaju odnose se na molekularni nivo i receptorske mehanizme kojim dolazi do smanjenja kontraktilnog dejstva fenilefrina kada se doda lerimazolin. Endotel igra važnu ulogu u regulaciji vazokonstrikcije i vazodilatacije prouzrokovane različitim agonistima. Endotel oslobađa vazodilatatorne faktore kao što su NO, EDHF i prostaciklin, kao i vazokonstriktorne faktore kao što su endotelin 1, COX i superoksidni anjon (Luscher i sar., 1993; Marin i sar., 1995). Dok NO inhibitorno utiče na kontraktilni odgovor mnogih vazokonstriktora (Hatake i sar., 1995), EDHF uzrokuje endotel-zavisnu hiperpolarizaciju i relaksaciju na pacovskoj aorti otvaranjem K<sup>+</sup> kanala, na čiji se efekat ne može uticati blokadom sa NOS i ciklooksigenazom (Hatake i sar., 1995; Stallone, 1993). Kada smo koristili krvne sudove sa intaktnim endotelom i bez endotela u protokolu mjerenja vaskularne aktivnosti fenilefrina i lerimazolina, pokazalo se da ne postoji značajna razlika u odgovoru oba vazokonstriktora u prisustvu i odsustvu endotela, što bi dovelo do zaključka da modulacija endotelno zavisnih vazoaktivnih supstanci ne dovodi do promjene u

aktivnosti krvnog suda pri izlaganju dejstvu ovih vazokonstriktora. Mogućnost uticaja endogenog NO ili prostaglandina u interakciji fenilefrin-lerimazolin se istraživao u prisustvu NO inhibitora L-NAME i OHB<sub>12</sub> ili ciklooksigenaznog inhibitora indometacina. Dodatno, sproveden je eksperiment sa ciljem utvrđivanja uticaja neselektivnog K<sup>+</sup> inhibitora tetraetilamonijuma na smanjenje fenilefrinske kontrakcije uzrokovane lerimazolinom. Na kraju, uticaj pojedinih podtipova 5-HT receptora se istraživao koristeći visoko selektivnog 5-HT<sub>1D</sub> antagonistu BRL 15572, selektivnog 5-HT<sub>7</sub> antagonistu SB 269970 i neselektivnog 5-HT antagonistu metiotepin.

Pre tretman sa L-NAME ili OHB<sub>12</sub> doveo je do smanjenja negativnog uticaja lerimazolina na fenilefrinsku maksimalnu kontrakciju. Efekat povećanja kontrakcije u prisustvu ovih antagonista bi se mogao parcijalno objasniti putem lerimazolinom pokrenute NO modulacije na kontrakciju fenilefrina. Međutim, mogućnost ovakve uloge lerimazolina je poljuljana činjenicom da su i L-NAME i OHB<sub>12</sub> značajno potencirali koncentracijski zavisnu krivu fenilefrina. Nasuprot tome, otvaranje K<sup>+</sup>-kanala u glatko mišićnim ćelijama dovodi do hiperpolarizacije membrane, što posljedično uzrokuje inhibiciju kontrakcije krvnih sudova, čija aktivnost se inhibira neselektivnim blokatorom TEA-om (tetraetilamonijum). Otvaranje K<sup>+</sup> kanala se vjerovatno aktivira lerimazolinom neovisno o fenilefrinu, s obzirom da su rezultati eksperimentalnog istraživanja pokazali da nema značajne potencijacije koncentracijski zavisne krive fenilefrina u pretretmanu sa TEA-om. Na ovakav način opisana uloga signalnih mehanizama nije jedini slučaj; primjer analognog mehanizma imamo kod amfepramona (dietilpropion), lijeka za supresiju apetita, sa nepotpunim informacijama o afinitetima vezivanja za receptore, ali sa značajnom razlikom da amfepramon sam od sebe više relaksira nego što kontrahuje pacovsku aortu (López-Canales i sar., 2015).

Istražujući receptorski mehanizam koji bi mogao igrati ulogu u antagonizmu lerimazolina na fenilefrinskoj kontrakciji na pacovskoj aorti, usmjerili smo pažnju na 5-HT<sub>7</sub> receptor. Dokazano je da 5-HT ispoljava svoj vazodilatatorni potencijal aktivacijom 5-HT<sub>7</sub> receptora, koji se antagonizuje selektivnim antagonistom SB 269970, potkrijepljeno primjerom da 5-HT direktno relaksira pacovsku mezenteričnu venu preko aktivacije 5-HT<sub>7</sub> receptora (Watts i sar., 2015). Također, 5-HT direktno relaksira bazilarnu i cerebralnu arteriju kod psa putem 5-HT<sub>7</sub> receptora (Terron i sar., 1999). S druge strane, BRL 15572, selektivni antagonist na 5-HT<sub>1D</sub> receptorima smo koristili kao negativnu kontrolu uzimajući u obzir činjenicu da pseći vazodilatatorni odgovor karotidne arterije ostaje očuvan u prisustvu ovog liganda (Munoz-Islas i sar., 1999). Međutim, rezultati su pokazali ne samo da 5-HT<sub>1D</sub> nego i 5-HT<sub>7</sub> nisu uključeni u relaksantni odgovor lerimazolina. Eksperimenti sa metiotepinom su dali odgovor

na pitanje o receptorskom supstratu odgovornom za relaksantni potencijal lerimazolina. Naime, dok metiotepin u dozi od  $10^{-4}$  M nema uticaja na smanjenje fenilefrinske kontrakcije prouzrokovane lerimazolinom, metiotepin u dozi od  $10^{-6}$  i  $3 \times 10^{-7}$  M je uspio inhibirati smanjenje fenilefrinske kontrakcije prouzrokovano lerimazolinom, bez uticaja nižih doza metiotepina na zasebnu koncentracijski zavisnu krivu fenilefrina. Ako pretpostavimo da se metiotepin u niskim koncentracijama veže za receptore za koje ima najveći afinitet, onda je  $5\text{-HT}_{2B}$  (konstanta afiniteta za ovaj podtip receptora po IUPHAR bazi iznosi 8.7 – 9.2) prvi receptor blokiran metiotepinom, povećavajući kontraktilni odgovor krvnog suda izloženog fenilefrinu i lerimazolinu u kombinaciji. Hipoteza je u skladu sa činjenicom da su  $5\text{-HT}_{2B}$  receptori lokalizovani na endotelnim ćelijama i kada su aktivirani, stimuliraju NO oslobađanje (Ishida i sar., 1998). Pokazano je također da tretman sa  $5\text{-HT}_{2B}$  receptor antagonistom prevenira bajpasom-inducirani pad krvnog pritiska kod Wistar pacova in vivo (Borgdorff i sar., 2002). Drugi po redu receptor za koji metiotepin ima najveći afinitet je  $5\text{-HT}_7$  receptor sa konstantom afiniteta od 8.4 – 9.4 (IUPHAR baza), što nam potvrđuje da je  $5\text{-HT}_{2B}$  receptor najvjerojatniji receptorski supstrat relaksantnog dejstva lerimazolina. Svakako, daljnja istraživanja su neophodna prije definitivnog zaključka.

U konačnici, naizgled paradoksalno svojstvo lerimazolina, sa svojim skromnim kontraktilnim dejstvom ali i sposobnosti da smanji kontrakciju uzrokovanu mnogo efektivnijim kontraktilnim agensom, ne bi trebalo da se okarakteriše kao bez presedana. Kao važan primjer, Lamarre i saradnici (2013) su dokazali da kokain, jedna od referentnih vazokonstriktornih supstanci u literaturi, ispoljava i vazokonstriktorno i vazorelaksantno dejstvo. U nižim koncentracijama, kokain je potencirao vazokonstriktorno dejstvo noradrenalina, fenilefrina i metoksamina. S druge strane, visoke koncentracije kokaina u kombinaciji sa adrenergičkim agonistima prouzrokovale su koncentracijski-zavisnu relaksaciju, tj. invertnu U-formiranu dozno-zavisnu krivu. Autori su smatrali da se relaksantni efekat javio usljed aktivacije lakih lanaca miozina kokainom, a zasnovano na nalazima autora Li i saradnika (2004).

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da prisustvo lerimazolina, u koncentraciji jednakoj ili većoj od fenilefrina, rezultira vazokonstrikcijom manjom od vazokonstrikcije prouzrokovane agonistima pojedinačno. Postavlja se hipoteza da interakcija lerimazolina i fenilefrina kao standardnih dekongestanata, putem receptora i signalnih puteva mimo  $\alpha_1$  adrenergičkih receptora, može smanjiti ili usporiti nastanak stvaranja medikamentoznog rinitisa, što zahtjeva daljnja istraživanja.

## 5.2. In vivo nalazi

Prethodno citirani radovi koji su obrađivali lerimazolin bili su vezani za *in vitro* metodologije, tako da se prikazano ispitivanje *in vivo* efekata lerimazolina ne može uporediti sa ranijim rezultatima. U skladu sa očekivanjima zasnovanim na opisanim hemijsko-fizičkim osobinama lerimazolina, ovaj atipični simpatomimetik se odlikuje dobrom apsorpcijom nakon sistemske primjene, sa kratkim poluvremenom eliminacije iz plazme (1 h). Od posebnog značaja za ispitivanje potencijalnih efekata na ponašanje i nervne funkcije, lerimazolin ne samo da u znatnom stepenu ulazi u mozak (60 min nakon primjene doze od 5 mg/kg koncentracije lijeka u moždanom tkivu i plazmi su bile izjednačene), već je u znatnom stepenu (oko 25%) slobodan u moždanom tkivu, tako da su procjenjene koncentracije nevezanog lerimazolina, u nivou od oko 50 nM/kg, dovoljne za punu aktivaciju 5-HT<sub>1D</sub>, i znatnu aktivaciju 5-HT<sub>1A</sub> receptora (uzimajući u obzir izmjerene vrijednosti afiniteta lerimazolina za različite tipove receptora, sa submikromolarnim vrijednostima za ova dva podtipa 5-HT receptora).

Osnovni bihevioralni profil lerimazolina, sagledan iz rezultata ispitivanja u četiri često korišćena testa (spontana lokomotorna aktivnost, uzdignuti plus lavirint, rotarod test, pentilentetrazolom-izazvane konvulzije), pokazuje da ovaj simpatomimetik ne utiče na motornu koordinaciju, nivo anksioznosti ili osjetljivost na hemijsko izazivanje konvulzija, ali u višim dozama dovodi do smanjenja lokomotorne aktivnosti, procijenjeno na osnovu nalaza u prva dva testa. Imajući u vidu nalaz da je sedativno dejstvo simpatomimetika koji imaju aktivnost i na  $\alpha_1$  i na  $\alpha_2$  receptorima (klonidin, alinidin, oksimetazolin, nafazolin) pripisano isključivo aktivaciji  $\alpha_2$  adrenergičkih receptora (Hayes i sat., 1986), u našoj studiji je ispitan potencijal visoko selektivnog antagoniste  $\alpha_2$  adrenergičkih receptora RX 821002 da prevenira sedaciji-slično dejstvo lerimazolina. Međutim, utvrđeno je da RX 821002 ne može da suzbije hipolokomotorni efekat lerimazolina u testu spontane lokomotorne aktivnosti, i u tom smislu nije vjerovatno da  $\alpha_2$  adrenergički receptori doprinose sedaciji izazvanoj lerimazolinom. S obzirom na nalaze *in vitro* studija afiniteta i farmakokinetičke rezultate, može se postaviti validna hipoteza da lerimazolin bihevioralne efekte ostvaruje aktivacijom 5-HT<sub>1D</sub> i 5-HT<sub>1A</sub> receptora. U literaturi nema nalaza koji aktivaciju ovih receptora povezuju sa promjenama u lokomotornoj aktivnosti i/ili reaktivnosti na konstantan nivo spoljnjih draži, ali je od potencijalnog interesa skorašnji skup rezultata koji dokazuju da aktivacija 5-HT<sub>1D</sub> i 5-HT<sub>1A</sub> receptora može da dovede do klinički relevantne supresije emetogeneze (Lucot et al., 2014). S obzirom da su ovi noviji nalazi u saglasnosti sa kliničkim iskustvom da agonist 5-HT<sub>1D</sub>

receptora sumatriptan smanjuje emetičke događaje kod migrenozne glavobolje i u sindromu cikličnog povraćanja, i to preko mjesta vezivanja u centralnom nervnom sistemu (Hasler, 1999), analiza rezultata bihevioralne karakterizacije lerimazolina može da ukaže na potrebu daljeg ispitivanja ovog lijeka u testovima vezanim za mučninu i povraćanje. Kao nespecifične manifestacije, ovi simptomi uobičajeno prate kako osnovna patološka stanja, tako i komplikacije koje se mogu javiti u stanjima gornjih respiratornih puteva kod kojih se indikuje primjena nazalnih dekongestiva (Ramakrishnan i sar., 2007; Patel i sar., 2016) i čije bi potencijalno adekvatno zbrinjavanje lerimazolinom primjenjenim intranazalno dodatno olakšalo stanje ovih pacijenata.

### **5.3. Nedostaci i perspektive istraživanja**

Osnovni nedostatak prikazanih bazičnih ispitivanja jeste izostanak dijela koji bi se odnosio na korišćenje onog biološkog materijala koji predstavlja mjesto dejstva u uslovima kliničke primjene. Istraživanja koja se zasnivaju na korišćenju nosne sluznice ogleadne životinje jesu rijetka, a isto se odnosi i na korišćenje segmenata humane nosne sluznice koji se mogu dobiti pri sprovođenju određenih hirurških procedura u otorinolaringologiji. Jedan od nedostataka jeste i izostanak utvrđivanja, molekularno biološkim tehnikama, ekspresije različitih podtipova adrenergičkih i serotonergičkih receptora u korišćenim isječcima torakalne aorte pacova.

Literaturni podaci prikazani u prethodnoj diskusiji ukazuju na neophodnost sprovođenja sveobuhvatnijih studija, koje bi za cilj imale da primjenom farmakoloških metoda, zasnovanih na utvrđivanju dozne zavisnosti farmakoloških efekata i mogućnosti njihovog antagonizovanja selektivnim ligandima, uporedo sa analizom prisustva receptorskog supstrata, bude nedvosmisleno ustanovljen značaj pojedinih receptora na koje je sadašnja studija ukazala. U takvim ispitivanjima bilo bi potrebno da se koriste analozi lerimazolina, kao što su oksimetazolin ili ksilometazolin, ali i adrenergički vazokonstriktori koji ne pripadaju grupi imidazolina, kao što je fenilefrin. Jasno je da u literaturi prisutno favorizovanje  $\alpha$  adrenergičkih receptora kao supstrata za dejstvo vazokonstriktora treba da se preispita za svakog od predstavnika pojedinačno. Na taj način bi se utvrdilo i da li postoje potencijalne kombinacije, poput one sa fenilefrinom i lerimazolinom, čija uporeda primena može da se opravda razlikama u receptorskom dejstvu i samim tim optimizovanjem odnosa koristi i rizika.



## 6.ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj studiji, može se zaključiti sljedeće:

1. Lerimazolin ispoljava umjeren afinitet za 5-HT<sub>1A</sub> receptor, komparabilan publikovanom afinitetu za 5-HT<sub>1D</sub> receptor. Na drugim ispitanim receptorima:  $\alpha_1$ , 5-HT<sub>2A</sub> i D<sub>2</sub>, afinitet vezivanja je značajno manji i mikromolarnog je nivoa, a komparabilan je poznatom afinitetu za 5-HT<sub>1B</sub> receptore.
2. Lerimazolin prouzrokuje koncentracijski zavisnu kontrakciju isječaka torakalne arterije pacova, čija kontrakcija se ne razlikuje u prisustva ili odsustva endotela, a intenzitet kontraktalnog efekta odgovara 40-55% maksimalne kontrakcije koju izaziva koncentracija od 10<sup>-4</sup> M standardnog  $\alpha$ -adrenergičkog vazokonstriktora fenilefrina.
3. 5-HT<sub>2A</sub> receptori, i u nešto manjoj mjeri  $\alpha_1$  receptori, vjerovatno su primarno odgovorni za lerimazolinom induciranu kontrakciju na izolovanoj pacovskoj aorti.
4. Lerimazolin u nižim koncentracijama potencira vazokonstriktornu aktivnost fenilefrina, dok u višim koncentracijama prividno paradoksalno smanjuje efekat fenilefrina. Lerimazolin u višim koncentracijama djeluje pro-relaksantno, vjerovatno aktivacijom K<sup>+</sup> kanala i 5-HT<sub>2B</sub> receptora; endogeni NO i prostaglandini nemaju ulogu u ovom efektu.
5. Lerimazolin ima kratko poluvrijeme eliminacije (1 h) i dobru apsorpciju nakon sistemske primjene. Lerimazolin je u znatnom stepenu (oko 25%) slobodan u moždanom tkivu, tako da su procjenjene koncentracije nevezanog lerimazolina, u nivou od oko 50 nM/kg, dovoljne za punu aktivaciju 5-HT<sub>1D</sub>, i znatnu aktivaciju 5-HT<sub>1A</sub> receptora, za koje ima najveći afinitet vezivanja.
6. Lerimazolin ne utiče na motornu koordinaciju, nivo anksioznosti ili osjetljivost na hemijsko izazivanje konvulzija, ali u višim dozama dovodi do smanjenja lokomotorne aktivnosti, procijenjeno na osnovu nalaza u prva dva testa. Ovakav osnovni profil bihevioralnog dejstva opravdava dalje ispitivanje lerimazolina u specifičnim testovima u kojima bi se moglo utvrditi manifestovanje efekata posredovanih prije svega preko 5-HT<sub>1D</sub> i 5-HT<sub>1A</sub> receptora.

Klinički značaj sprovedenih istraživanja ogleda se u mogućnosti da pokazana interakcija lerimazolina, kao atipičnog simpatomimetika, i standardnog dekongestiva fenilefrina ima pozitivne posljedice u uslovima njihove kombinovane primjene. Može se postaviti hipoteza da lerimazolin, dejstvom na receptore i signalne puteve koji nisu direktno povezani sa

aktivacijom  $\alpha_1$  adrenergičkih receptora, ima potencijal da smanji ili uspori nastanak medikamentoznog rinitisa pri ponavljanoj lokalnoj primjeni na sluznicu nosa, što zahtjeva dalja istraživanja.

## 7. REFERENCE

- Andersson KE, Bende M. Adrenoceptors in the control of human nasal mucosal blood flow. *Ann Otol Rhino Laryngol* 1984; 93: 179–182.
- Baraniuk JN, Lundgren JD, Okayama M, Goff J, Mullol J, Merida M, Shelhamer JH, Kaliner MA. Substance P and neurokinin A in human nasal mucosa. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 4.3: 228-236.
- Baraniuk JN, Lundgren JD, Goff J, Mullol J, Castellino S, Merida M, Shelhamer JH, Kaliner MA. Calcitonin gene-related peptide in human nasal mucosa. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 1990; 258.2: L81-L88.
- Baraniuk JN, Castellino S, Goff J, Lundgren JD, Mullol J, Merida M, Shelhamer JH, Kaliner MA. Neuropeptide Y (NPY) in human nasal mucosa. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990; 3:165-73.
- Belzung C. Measuring rodent exploratory behavior. In: Crusio WE, Gerlai RT, eds. *Handbook of molecular-genetic techniques for brain and behavior research*. Elsevier Science BV, Amsterdam, 1999. pp. 738–49.
- Berridge TL, Roach AG. Characterization of the  $\alpha$ -adrenoceptors in the vasculature of the canine nasal mucosa. *Br J Pharmacol* 1986; 88: 345–354.
- Besnard J, Ruda GF, Setola V, Abecassis K, Rodriguiz RM, Huang XP, Norval S, Sassano MF, Shin AI, Webster LA, Simeons FR, Stojanovski L, Prat A, Seidah NG, Constan DB, Bickerton GR, Read KD, Wetsel WC, Gilbert IH, Roth BL, Hopkins AL. Automated design of ligands to polypharmacological profiles. *Nature* 2012; 492(7428): 215-20.
- Bhattacharya A, Schenck KW, Xu YC, Nisenbaum L, Galbreath E, Cohen ML. Hydroxytryptamine 1B receptor-mediated contraction of rabbit saphenous vein and basilar artery: role of vascular endothelium. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 309:825.
- Bialer M, White HS. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 68–82.
- Bockaert J, Dumuis A, Bouhelal R, Sebben M, Cory RN. Piperazine derivatives including the putative anxiolytic drugs, buspirone and ipsapirone, are agonists at 5-HT<sub>1A</sub> receptors negatively coupled with adenylate cyclase in hippocampal neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1987; 335: 588-592.

Borgdorff P, Fekkes D, Tangelder GJ. Hypotension caused by extracorporeal circulation: serotonin from pump-activated platelets triggers nitric oxide release. *Circulation* 2002; 106: 2588-2593.

Brayfield A, Martindale W. *The Complete Drug Reference*. Pharmaceutical Press. 38<sup>th</sup> ed. London 2014.

Breeze, Roger G, Wheeldon EB. The cells of the pulmonary airways 1. 2. *American Review of Respiratory Disease* 1977; 116.4: 705-777.

*British Pharmacopoeia, Version 2*, The Stationeri Office Ltd., Norwich, 1998.

Calama E, Fernandez MM, Moran A, Martin ML, San Roman L. Vasodilator and vasoconstrictor responses induced by 5-hydroxytryptamine in the in situ blood autoperfused hindquarters of the anaesthetized rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2002; 366: 110–6.

Cayna. The fine structure of the AVA and its nerve supply in the human nasal respiratory tract. *Anat Rec* 1970; 168: 9-21.

Cauna N. Electron microscopy of the nasal vascular bed and its nerve supply. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1970; 79: 443-50.

Chotani MA, Flavahan S, Mitra S, Daunt D, Flavahan NA. Silent  $\alpha_{2C}$ -adrenergic receptors enable cold-induced vasoconstriction in cutaneous arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: H1075-H1083.

Christ GJ, Jean-Jacques M. Mutual-effect amplification of contractile responses elicited by simultaneous activation of alpha-1 adrenergic and 5-hydroxytryptamine<sub>2</sub> receptors in isolated rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 256(2): 553-61.

Cole P. *The respiratory role of the upper airways: a selective clinical and pathophysiological review*. Pmph Bc Decker, 1993.

Corboz MR, Mutter JC, Rivelli MA, Mingo GG, McLeod RL, Varty L, Yia Y, Cartwright, Hey JA. Alpha<sub>2</sub>-adrenoceptor agonists as nasal decongestants. *Pulm Pharmacol Ther* 2007; 20(2): 149-156.

Corboz MR, Varty LM, Rizzo CA, Mutter JC, Rivelli MA, Wan Y, Umland S, Qui H, Jakway J, McCormick KD, Berlin M, Hey JA. Pharmacological characterization of  $\alpha_2$ -

adrenoceptor-mediated responses in pig nasal mucosa. *Auton Autacoid Pharmacol* 2003; 23: 208–219.

Corboz MR, Rivelli MA, Varty LM, Mutter L, Cartwright J, Rizzo M, Charles AE, Stephen PA, John C, John A. Pharmacological characterization of postjunctional  $\alpha$ -adrenoceptor in human nasal mucosa. *Am J Rhinol* 2005; 19: 495–502.

Cruz AP, Frei F, Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1994; 49: 171–6.

Davis CW, Dickey BF. Regulated airway goblet cell mucin secretion. *Annu Rev Physiol* 2008; 70: 487–512.

Drettner B. Plethysmographic studies of the blood flow in the mucosa of the human maxillary sinus. *Acta oto-laryngologica* 1974; 78.1-6: 259-263.

Eccles R, Bende M, Widdicombe JG. Nasal blood vessels. In: *Allergic and Vasomotor Rhinitis Pathophysiological Aspects*, 1st ed., Mygind N. and PipKorn U.(eds); 1987: 63-76.

*European Pharmacopoeia*, 3th Ed., Council of Europe, Strasbourg, 1996.

Fernandes C, File SE. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1996; 54: 31–40.

Fernandez MM, Moran A, Martin ML, San Roman L. Mesenteric vasoconstrictor responses to 5-hydroxytryptamine in the in situ blood autoperfused rat mesentery: Involvement of 5-HT<sub>2B</sub> and/or 5-HT<sub>2C</sub> receptor activation. *Eur J Pharmacol* 2000; 40: 221–7.

Festing MF, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR J* 2002; 43: 244–58.

Flavahan NA, McGrath JC. Are human vascular  $\alpha$ -adrenoceptors atypical? *J Cardiovasc Pharmacol* 1984; 6: 208-210.

Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology* 2012; 50: 1–12.

Fuder H, Bmm HJ, R.Schimkus. Presynaptic alpha-2 adrenoceptors activation and coupling of the receptor-presynaptic effector system in the perfused rat heart: affinity and efficacy of pbenethylamines and imidazoline derivatives. *Pharmacol Exp Ther* 1986; 237.

Gelfand EW. Inflammatory mediators in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(5 Suppl): S135-S138.

Geyer MA. Approaches to the characterization of drug effects on locomotor activity in rodents. *Modern Methods in Pharmacology*, Vol. 6, Testing and Evaluation of Drugs of Abuse, Wiley-Liss, Inc 1990: 81-99.

Graf P. Rhinitis medicamentosa: a review of causes and treatment. *Treat Respir Med* 2005; 4: 21-9.

Gothert M, Molederings GJ. Inhibitory presynaptic imidazoline receptors on sympathetic nerves in the rabbit aorta differ from I<sub>1</sub> and I<sub>2</sub> imidazoline binding sites. *Naunyn Schmiederbergs Arch of Pharm* 1995; 351: 507-516.

Gudermman T, Kalkbrenner F, Schultzet G. Diversity and selectivity of receptor-G protein signalling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36: 429-459.

Guillerm R. Pathophysiologische aspekte der oberen luftwege: Nase, nasennebenhöhlen, ohrtrompete. *Archiv für klinische und experimentelle Ohren-, Nasen-und Kehlkopfheilkunde* 1971; 199.1: 1-64.

Hadley JA. Overview of otolaryngic allergy management. An eclectic and cost-effective approach. *Otolarygol Clin North Am* 1998; 31: 69-82.

Hall LJ, Jackson RT. Effects of alpha and beta adrenergic agonists on nasal blood flow. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1968; 77: 1120-30.

Hasegawa M, Kern EB. The human nasal cycle. *Mayo Clin Proc* 1977; 52:28.

Hasler WL. Serotonin receptor physiology: relation to emesis. *Dig Dis Sci* 1999; 44(8 Suppl): 108S-113S.

Hatake K, Wakabayashi I, Hishida S. Endothelium-dependent relaxation resistant to N-nitro-L-arginine in rat aorta. *Eur J Pharmacol* 1995; 274: 25-32.

Hayes AG, Skingle M, Tyers MB. Alpha-adrenoceptor-mediated antinociception and sedation in the rat and dog. *Neuropharmacology* 1986; 25(4): 391-396.

Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1996; 54: 21-30.

Holgate ST and Broide D. New targets for allergic rhinitis- a disease of civilization. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2(11): 902-14.

Honner V, Docherty JR. Investigation of the subtypes of  $\alpha_1$ -adrenoceptor mediating contractions of rat vas deferens. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1323-1331.

Howarth PH. Allergic and Nonallergic Rhinitis. In Atkinson N, editor. Middleton's Allergy Principles and Practise. 6th ed. Philadelphia: Mosby; 2003.

Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane, Saxena PR, Humphrey PA. International Union of Pharmacology Classification of Receptors for 5-Hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 1994; 46: 157-203.

Huang XP, Setola V, Yadav PN, Allen JA, Rogan SC, Hanson BJ, Revankar C, Robers M, Doucette C, Roth BL. Parallel functional activity profiling reveals valvulopathogens are potent 5-hydroxytryptamine(2B) receptor agonists: implications for drug safety assessment. *Mol Pharmacol* 2009; 76(4): 710-22.

Hussain MB, Marshall I. Characterization of alpha1-adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 849-858.

Hutcheson JD, Setola V, Roth BL, Merryman WD. Serotonin receptors and heart valve disease--it was meant 2B. *Pharmacol Ther* 2011; 132(2): 146-57.

International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances (INN). Recommended International Nonproprietary Names: List 72: Lerimazoline. WHO Drug Information, Vol 28(3):400. 2014. <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21577en/s21577en.pdf>. Accessed April 17, 2016.

Ishida T, Kawashima S, Hirata K, Yokoyama M. Nitric Oxide is produced via 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>2B</sub> receptor activation in human coronary artery endothelial cells. *Kobe J Med Sci* 1998; 2: 51-63.

Jerez S, Peral de Bruno M, Coviello A. Cross talk between angiotensin II and alpha 1 adrenergic receptors in rabbit aorta: role of endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43(3): 402-9.

Johnson DA, Hricik JG. The pharmacology of  $\alpha$ -adrenergic decongestants. *Pharmacotherapy* 1993; 13: 110-115.

Jugoslovenska farmacopoeia, 5th Ed., Savremena administracija, Beograd, 2000.

Kelley AE. Locomotor activity and exploration. In: Van Haaren F, editor. *Methods in behavioral pharmacology*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV, 1993. pp. 499–518.

Kennedy DW, Zinreich SJ, Kumar AJ. Physiologic mucosal changes within the nose and the ethmoid sinus: imaging of the nasal cycle by MRI. *Laryngoscope* 1988; 98: 928.

Laitinen LA, Laitinen A. The bronchial circulation. *Histology and electron microscopy*. In: Butler J, ed. *The bronchial circulation*. New York: Marcel Dekker, 1992: 79-98.

Lamarre NS, Raffa RB, Tallarida RJ. Cocaine synergism with  $\alpha$  agonists in rat aorta: computational analysis reveals an action beyond reuptake inhibition. *Drug Alcohol Depend* 2013; 129(3): 226-31.

Law H, Dukat M, Teitler M, Lee DKH, Mazzocco L, Kamboj R, Rampersad V, Prisinzano T, Glennon RA. Benzylimidazolines as h5-HT<sub>1B/1D</sub> Serotonin Receptor Ligands: A Structure-Affinity Investigation. *J Med Chem* 1998; 41: 2243-2251.

Li W, Su J, Sehgal S, Altura BT, Altura BM. Cocaine-induced relaxation of isolated rat aortic rings and mechanisms of action: possible relation to cocaine-induced aortic dissection and hypotension. *Eur J Pharmacol* 2004; 496(1-3): 151-8.

Lin SL, Setya S, Johnson-Farley NN, Cowen DS. Differential Coupling of 5-HT<sub>1</sub> Receptors to G Proteins of the Gi Family. *Br J Pharmacol* 2002; 136: 1072-1078.

Lippa AS, Nash PA, Greenblatt EN. Pre-clinical neuro-psychopharmacological testing procedures for anxiolytic drugs. In: Fielding St, Lal H (eds) *Anxiolytics*, Futura Publishing Comp. Inc., New York, 1979. pp. 41-81.

López-Canales JS, Lozano-Cuenca J, Muñoz-Islas E, Aguilar-Carrasco JC, López-Canales OA, López-Mayorga RM, Castillo-Henkel EF, Valencia-Hernández I, Castillo-Henkel C. Mechanisms involved in the vasorelaxant effects produced by the acute application of amfepramone in vitro to rat aortic rings. *Braz J Med Biol Res* 2015; 48(6): 537-44.

Löscher W, Schmidt D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Res* 1988; 2: 145-81.

Lucot JB, Brame RE, Garrett TL, Pfadenhauer EH, Kumar A, Fick DB, Helton DR. The broad-spectrum antiemetic effects ETI-385 result from stimulation of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptors. *Exp Brain Res*. 2014; 232(8): 2699-707.

Luscher TE. The endothelium as a target and mediator of CNS diseases. *Eur J Clin Invest* 1993; 23: 670-685.



Malta E, Raper C, Tawa PE. Pre- and postjunctional effects of clonidine and oxymetazoline like compounds in guinea pig ileum preparations. *Br J Pharmacol* 1981; 73: 355-62.

Marin J, Rodriguez-Mertinez MA. Role of vascular NO in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther* 1995; 75:111-134.

Meltzer HY, Roth BL. Lorcaserin and Pimavanserin: Emerging Selectivity of Serotonin Receptor Subtype-Targeted Drugs. *J Clin Invest* 2013; 123: 4986-4991.

Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 2006; 442: 39-44.

Milligan G. Signal sorting by G-protein-linked receptors. *Adv Pharmacol* 1995; 32: 1-29.

Molderings GJ, Gothert M. Mutual interaction between presynaptic  $\alpha_2$ -adrenoceptors and 5-HT<sub>1B</sub> receptors on the sympathetic nerve terminals on the rat inferior vena cava. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1990; 341: 391-397.

Moran A, Ortiz de Urbina AV, Martín ML, Garcia M, Barbero AR, Dorado F, San Roman L. Characterization of contractile 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in the in situ autoperfused kidney in the anaesthetized rat. *Eur J Pharmacol* 2008; 592: 133-7.

Morton JS, Daly CJ, Jackson VM, McGrath JC.  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors mediate contractions to phenylephrine in rabbit penile arteries. *Br J Pharmacol* 2007; 150(1): 112-120.

Mortuaire G, de Gabory L, François M, Massé G, Bloch F, Brion N, Jankowski R, Serrano E. Rebound congestion and rhinitis medicamentosa: Nasal decongestants in clinical practice. Critical review of the literature by a medical panel. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases* 2013; 130: 137-144.

Muñoz-Islas E, Lozano-Cuenca J, González-Hernández A, Ramírez-Rosas MB, Sánchez-López A, Centurión D, Maassenvandenbrink A, Villalón CM. Spinal sumatriptan inhibits capsaicin-induced canine external carotid vasodilatation via 5-HT<sub>1B</sub> rather than 5-HT<sub>1D</sub> receptors. *Eur J Pharmacol* 2009; 615(1-3): 133-8.

Mygind N, Dahl R. Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1998; 29: 3-12.

Nathanson JA. Phenyliminoimidazolidines. Characterization of a class of potent agonists of octopamine-sensitive adenylate cyclase and their use in understanding the pharmacology of octopaminereceptors. *Mol Pharmacol* 1985; 28: 254-68.

Nathan RA. Pharmacotherapy for allergic rhinitis: a critical review of leukotriene receptor antagonists compared with other treatments. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003; 368: 733-743.

Nikolić SG, Savić IM, Banković VM. Systematic analysis of trimazoline hydrochloride as adrenergic vasoconstrictor. *Hem Ind* 2008; 62(2).

Patel NA, Garber D, Hu S, Kamat A. Systematic review and case report: Intracranial complications of pediatric sinusitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2016; 86: 200-12.

Pearlma DS. Pathophysiology of the inflammatory response. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104(4 Pt 1): S132-S137.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985; 14: 149–67.

Proctor DF, Adams GK. Physiology and Pharmacology of Nasal Function and Mucus Secretion. *Pharmacology & Therapeutics. Part B; General and systematic pharmacology* 1976; 2:493-509.

Quraishi MS, Jones NS, Mason J. The rheology of nasal mucus: a review. *Clinical Otolaryngology Allied Sci* 1998; 23.5: 403-413.

Ramakrishnan K, Sparks RA, Berryhill WE. Diagnosis and treatment of otitis media. *Am Fam Physician* 2007; 76(11): 1650-8.

Rameshrad M, Babaei H, Azarmi Y, Fouladia DF. Rat aorta as a pharmacological tool for in vitro and in vivo studies. *Life Sci* 2016; 145: 190-204.

Rasp G, Hochstrasser K. Tryptase in nasal fluid is a useful marker of allergic rhinitis. *Allergy* 1993; 48.2: 72-74.

Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 1997; 21: 801–10.

Rodgers RJ, Johnson NJ. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus–maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; 52: 297–303.

Roth BL, Nakaki T, Chuang DM, Costa E. Aortic Recognition Sites for Serotonin (5HT) Are Coupled to Phospholipase C and Modulate Phosphatidylinositol Turnover. *Neuropharmacology* 1984; 23: 1223-1225.

Roth BL, Willins DL, Kristiansen K, Kroeze WK. 5-Hydroxytryptamine<sub>2</sub>- Family Receptors (5-Hydroxytryptamine<sub>2A</sub>, 5-Hydroxytryptamine<sub>2B</sub>, 5-Hydroxytryptamine<sub>2C</sub>): Where Structure Meets Function. *Pharmacol Ther* 1998; 79: 231-257.

Rustay NR, Wahlsten D, Crabbe JC. Influence of task parameters on rotarod performance and sensitivity to ethanol in mice. *Behav Brain Res* 2003; 141: 237–49.

Sadé J, Eliezer N, Silberberg A. The role of mucus in transport by cilia. *Am Rev Respir Dis* 1970; 102: 48–52.

Savić IM, Nikolić SG, Banković VM, Savić I. Quantitative estimation of trimazoline hydrochloride in pharmaceutical preparation by RP-HPLC method. *Hem Ind* 2009; 63(2): 87-93.

Savić MM, Huang S, Furtmüller R, Clayton T, Huck S, Obradović DI, Ugresić ND, Sieghart W, Bokonjić DR, Cook JM. Are GABAA receptors containing alpha5 subunits contributing to the sedative properties of benzodiazepine site agonists? *Neuropsychopharmacology* 2008; 33: 332–9.

Savić MM, Milinković MM, Rallapalli S, Clayton T Sr, Joksimović S, Van Linn M, Cook JM. The differential role of alpha1- and alpha5-containing GABA(A) receptors in mediating diazepam effects on spontaneous locomotor activity and water-maze learning and memory in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 2009; 12: 1179–93.

Schoeffter P, Hoyer D. Interaction of the alpha-adrenoceptor agonist oxymetazoline with serotonin 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1C</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptors. *Eur J Pharmacol* 1991; 196(2): 213-6.

Stafford-Smith M, Bartz R, Wilson K, Baraniuk JN, Schwinn DA. Alpha-adrenergic MRNA subtype expression in the human nasal turbinate. *Can J Anaesth* 2007; 54: 549-55.

Stallone JN. Role of endothelium in sexual dimorphism in vasopressin- induced contraction of rat aorta. *Am J Physiol* 1993; 265: H2073-80.

Storms W. Allergic rhinitis-induced nasal congestion: its impact on sleep quality. *Prim Care Respir J* 2008; 17: 7–18.

Swift, David L, Proctor DF. Access of air to the respiratory tract. *Respiratory defense mechanisms* 1977; 5.1: 63-93.

Terrón JA, Falcón-Neri A. Pharmacological evidence for the 5-HT<sub>7</sub> receptor mediating smooth muscle relaxation in canine cerebral arteries. *Br J Pharmacol* 1999; 127(3): 609-616.

Tos M. Distribution of mucus producing elements in the respiratory tract. Differences between upper and lower airway. *European journal of respiratory diseases. Supplement* 1982; 128: 269-279.

Uddman R, Longmore J, Cardel LO, Edvinsson L. Expression of 5-HT<sub>1B</sub> receptors in human nasal mucosa. *Acta Otolaryngol* 2001; 121: 403-6.

United States Pharmacopeia, USP-NF, USA, 2000.

Van Megen YJB, Klaassen ABM, Rodrigues de Miranda JF, Van Ginneken CAM., Wentges BTR. Alterations of adrenoceptors in the nasal mucosa of allergic patients in comparison with nonallergic individuals. *J. Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 530–540.

Wall PM, Messier C. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 2001; 25: 275-86.

Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL. Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res* 1980; 47: 1-9.

Watts SW, Darios ES, Seitz BM, Thompson JM. 5-HT is a potent relaxant in rat superior mesenteric veins. *Pharmacol Res Perspect* 2015; 3(1):e00103.

Watelet JB, Van Cauwenberge P. Applied anatomy and physiology of the nose and paranasal sinuses. *Allergy* 1999; 57:14-25.

Willins DL, Deutch AY, Roth BL. Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> Receptors Are Expressed on Pyramidal Cells and Interneurons in the Rat Cortex. *Synapse* 1997; 27: 79-82.

Winther B, Innes DJ, Mills SE, Mygind N, Zito D, Hayden FG. Lymphocyte subsets in normal airway mucosa of the human nose. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1987; 113(1): 59-62.

Zeile K, Hauptmann K, Staehle H, inventors; CH Boehringer Sohn, assignee. Verfahren zur Herstellung von 2-(2', 4', 6'-Trimethylbenzyl)-1, 3-diazacyclopenten-(2) und seinen Salzen, German patent DE1154119. 1963 September 12.

## Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Eldina Rizvić

Broj indeksa: 18/10

Izjavljujem

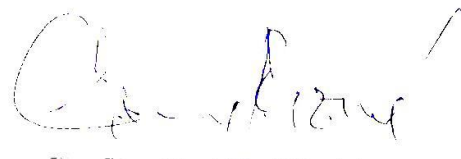
da je doktorska disertacija pod nazivom:

„ In vitro i in vivo farmakološki profil atipičnog simpatomimetika lerimazolina“.

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada
- da disertacija u cjelini i u dijelovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, 29.juni 2017.



Handwritten signature of Eldina Rizvić in blue ink, with a horizontal line underneath.

Izjava o istovjetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Eldina Rizvić

Broj indeksa: 18/10

Studijski program: Doktorske studije (Izborni modul: Farmakologija)

Naslov rada: „In vitro i in vivo farmakološka karakterizacija atipičnog simpatomimetika lerimazolina“.

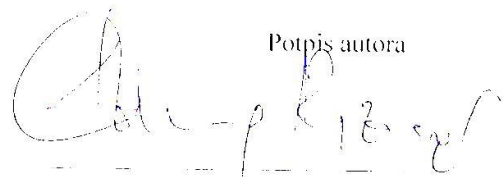
Mentor: Prof.dr Miroslav Savić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovjetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjenja u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mjesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 29.juni 2017.

Potpis autora  


## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „SvetozarMarković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„In vitro i in vivo farmakološka karakterizacija atipičnog simpatomimetika lerimazolina“  
koje je moje autorsko pravo.

Disertacija sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo - nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo - nekomercijalno - dijeliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo - bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo - dijeliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni dio ove izjave).

U Beogradu, 29. juni 2017.

Potpis autora

