

Simona Rajtar¹

Vpliv amitriptilina in sertralina na kinetiko eksogenega histamina v krvi mačke v *in vitro* poskusih²

The Influence of Amitriptyline and Sertraline in Vitro on the Kinetics of Exogenous Histamine in Cat Blood

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: histamin sproščanje – učinki zdravil, histamin, amitriptilin, sertralin, mačke

Histamin je biogeni amin in je znan kot primarni mediator pri alergijskih reakcijah. V možganih ima funkcijo živčnega prenašalca. Raziskave na področju farmakokinetike histamina so pokazale, da antidepresivi spremenijo farmakokinetiko eksogenega histamina pri mački in podgani, in sicer zmanjšajo porast koncentracije histamina v plazmi po vbrizganju eksogenega histamina, zaradi katerega se pri živalih, ki niso tretirane z antidepresivi, pojavi močno zvišana koncentracija histamina po intravenskem vbrizganju tega amina. Da bi ugotovili, v kolikšni meri pri spremembi kinetike eksogenega histamina zaradi delujočega antidepresiva sodelujejo krvne celice, smo naredili *in vitro* poskuse na mačji krvi. Po odvzemu krvi iz mačke smo ločili plazmo od krvnih celic in celicam *in vitro* dodajali eksogeni histamin in antidepresiva amitriptilin in sertralin. Koncentracijo histamina v vzorcih smo določali spektrofotometrično, metilhistamina pa s HPLC. Rezultati so pokazali, da tako amitriptilin kot sertralin *in vitro* povečata privzem eksogenega histamina v krvne celice mačke. Učinek sertralina na privzem histamina je večji od učinka amitriptilina.

339

ABSTRACT

KEY WORDS: histamine release – drug effects, histamine, amitriptyline, sertraline, cats

Histamine is a biogenic amine known as a primary mediator of allergic reactions. In brain, its role involves neurotransmission. Researches in the field of histamine pharmacokinetics have shown that antidepressants modify the pharmacokinetics of exogenous histamine in cats and rats. They decrease elevated histamine concentrations in plasma after an injection of exogenous histamine. Consequently, animals which have not been treated with antidepressants have significantly elevated histamine concentrations after an intravenous injection of this amine. In order to determine the extent to which blood cells participate in the modification of exogenous histamine kinetics, *in vitro* tests were performed on cat blood. After taking blood samples, the plasma was separated from blood cells and exogenous histamine and two antidepressants, amitriptyline and sertraline, were added to the blood cells *in vitro*. The concentration of histamine in the samples was determined spectrophotometrically, while methylhistamine was determined using HPLC. The results indicate that both amitriptyline and sertraline *in vitro* increase the reuptake of exogenous histamine in cat blood cells, although the effect of sertraline is more significant than that of amitriptyline.

¹ Simona Rajtar, univ. dipl. biol., mlada raziskovalka, Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, Medicinska fakulteta, Korytkova 2, 1000 Ljubljana.

² Delo je bilo narejeno pod mentorstvom prof. dr. Tatjane Irman - Florjanc in nagrajeno s Krkino nagrado za študente v letu 2003.

UVOD

Depresijo z nevrobiološkega vidika danes razlagamo kot neravnovesje živčnega prenosa v osrednjem živčevju, ki nastane zaradi pomanjkanja monoaminskih živčnih prenašalcev v določenih delih možganov, zlasti naj bi bilo moteno delovanje noradrenalina in serotonina (monoaminska hipoteza depresije). Vse več raziskav kaže na to, da monoaminska hipoteza ni več dovolj tehten argument za razlago depresivnih motenj. Novejše raziskave na področju nevropatologije in nevropsihiatrije pa vse bolj uveljavljajo tudi hipotezo, da spremenjene ravni histamina v osrednjem živčevju tehtno prispevajo k razvoju depresije. Endogeni histamin v možganih aktivira receptorje H1 in s tem povzroči antidepresivne učinke (1). Poznavanje vpliva antidepresivov na farmakokinetiko histamina je pomembno za proučevanje depresivnih motenj.

BIOSINTEZA IN BIOTRANSFORMACIJA HISTAMINA

Histamin (4(5)-(2-aminoetil)imidazol) je fiziološko aktivni biogeni amin. Biosinteza histamina poteka z dekarboksilacijo histidina (nabita polarna aminokislina) pod katalitičnim vplivom encima histidin dekarboksilaze, ki je odvisen od koencima PLP (piridoksal-5'-fosfat) (2). Pri fiziološkem pH je histamin v monokationski obliki, ki je sposobna vezave na receptorje. V celicah je z elektrostatskimi silami vezan na protein heparin (3).

Intravensko vbrizgani histamin hitro izgine iz obtoka in se v nekaj minutah pojavi skoraj v vseh tkivih kot presnovek. Presnova histamina poteka po dveh glavnih poteh: z oksidativno deaminacijo in z metilacijo na obroču. Prisotnost dveh poti razgradnje je prilagoditev, ki v primeručasne ustavitve delovanja ene poti omogoča razgradnjo histamina po drugi poti. Obkrajni histamin se presnavlja z deaminacijo in metilacijo, histamin v možganih pa se večinoma biotransformira z metilacijo.

Oksidativna deaminacija histamina

Oksidativna deaminacija histamina s kisikom, ki ga katalizira encim diaminooksidaza

(DAO), vodi v nastanek aldehida in nato imidazolocetne kisline. V nadaljnji presnovi se le-ta konjugira z ribozo in kot 1-ribozilimidazol-4-očetna kislina, ki je bolj hidrofila od imidazol očetne kisline, izloči z urinom. Pri podganah in miših je ta vrsta razgradnje najpogostejša. DAO spada v skupino baker vsebujočih aminooksidaz. Encimi iz te skupine vsebujejo na aktivnem mestu ohranjena aminokislinska zaporedja, ki so pomembna za strukturo beljakovine in njeno katalitično funkcijo, za delovanje pa je potreben tudi kofaktor kinon (4). DAO je topen, običajno znotrajcelični protein, v prašičjih ledvicah in črevesju ga najdemo tudi v celičnih mehurčkih, ki se nahajajo v neposredni bližini membrane (5). V krvni obtok se sprostijo ob indukciji s heparinom (5). V človeškem DAO-genu so določili pet polimorfni oblik, te se pri vnetnih obolenjih različno izražajo (6). Aktivnost DAO so izmerili v telesnih tekočinah, kot so plazma, limfa in seme.

Metiliranje histamina

Drugi način je metilacija histamina, ki lahko poteče na dušiku, ki je na stranski verigi, ali dušiku na telemestu imidazilovega obroča. Če poteče reakcija metilacije na stranski verigi, nastane α -metilhistamin ali dimetilhistamin. V primeru metilacije dušika na telemestu nastane presnovek telemetilhistamin. Reakcijo metilacije katalizira histamin-N-metiltransferaza (HNMT). Donor metilne skupine je S-adenozil-L-metionin. Nastali telemetilhistamin oz. metilhistamin je vmesni produkt, ki se delno izloči iz telesa z urinom. V drugi stopnji presnove se metilhistamin oksidira v metilimidazolocetno kislino in se nato tudi izloči z urinom. Reakcijo katalizirata encima monoaminska oksidaza B (MAO-B) ali (DAO).

HNMT je topen encim in se v možganih nahaja v citosolu nevronov in endotelijskih celicah (7). V mišjih sinaptosomih so ga našli tudi kot membransko vezan encim (8). Če se v možganih zniža koncentracija histamina, se posledično poveša koncentracija metilhistamina, razen tega zavora HNMT zviša koncentracijo možganskega histamina (8).

Porazdelitev histamina

Histamin najdemo pri večini živalskih vrst. Po telesu je porazdeljen v različnih tkivih

v različnih koncentracijah, kar je povezano z njegovo fiziološko in patofiziološko vlogo. V tkivih sesalcev se koncentracije histamina gibljejo od manj kot 1 $\mu\text{g/g}$ tkiva do več kot 100 $\mu\text{g/g}$ tkiva (9). Pri človeku se največ histamina nahaja v koži, pljučih in prebavnem traktu.

V omenjenih tkivih se histamin nahaja v mastocitih. Histamin, shranjen v mastocitih, imenujemo mastocitni histamin. V nekaterih tkivih histamin nastaja izven mastocitov. Izvenmastocitni histamin je rahlo vezan, se neprestano sprošča, zaloge pa so odvisne od nastajanja in biotransformacije histamina.

V krvi histamin v višjih koncentracijah najdemo v bazofilnih granulocitih, trombocitih in eozofilnih granulocitih. Posamezen mastocit vsebuje 0,1–0,2 molov histamina, posamezen bazofilni granulocit pa okrog 0,01 molov histamina. Bazofilni granulociti vsebujejo sekretorna zrnca, bogata s histaminom. V posameznem zrcu pride do biosinteze histamina. Sekretorna zrnca najdemo tik pod celično membrano in v bližini Golgijevega aparata (10).

V možganih se histamin nahaja v mastocitih in histaminergičnih nevronih. Mastocite najdemo v talamusu in hipotalamusu, prisotni pa so tudi v duri, leptomeningah in horoidnem pleksusu. Kakšna je vloga mastocitov v možganih, še ni popolnoma znano, najverjetneje pa vplivajo na krvni pretok in prepustnost možganske pregrade za imunske dejavnike.

Histaminergična vlakna so sestavljena večinoma iz magnocelularnih nevronov (pri podgani jih je okrog 2000) in se nahajajo v posteriornem hipotalamusu, imenujemo jih tuberomamilarno jedro. Histamin ima kot živčni prenašalec v možganih različne vloge, sodeluje pri analgeziji, pri uravnavanju ravnotežja za vodo, pomemben je za vzdrževanje telesne temperature. V vlaknih, ki povezujejo cerebelum in hipotalamus, so med drugimi prepoznali tudi histaminergična vlakna s H1-receptorji (11). Domnevajo, da histamin sodeluje pri prenosu signalov iz hipotalamusa do cerebeluma in je tako vključen v nadzor avtonomnih in čustvenih funkcij.

FARMAKOLOŠKO DELOVANJE ANTIDEPRESIVOV

Antidepresivi so učinkovine, ki jih uporabljamo pri zdravljenju depresije. V človeški medicini uporabljamo pri zdravljenju depresije različne antidepresive. Prva generacija antidepresivov so triciklični antidepresivi s srčnožilnimi stranskimi učinki, druga generacija so bolj specifični antidepresivi, netipični po zgradbi in z manj stranskih učinkov. Do sedaj znani vzrok depresije je pomanjkanje živčnih prenašalcev v sinaptični špranji.

Farmakološko prijemališče antidepresivov je sinaptična špranja. Antidepresivi zvišajo raven živčnih prenašalcev v sinaptičnem prostoru, in sicer tako, da:

- zavrejo njihovo razgradnjo (npr. zaviralci momoaminske oksidaze – IMAO),
- zavrejo njihov ponovni privzem (sertralin zavre ponovni privzem 5-HT, amitriptilin zavre ponovni privzem NA in 5-HT),
- spremenijo občutljivost in število postsinaptičnih in predsintaptičnih receptorjev,
- agonistično delujejo skupaj s posameznimi amini (12).

Vpliv antidepresivov na farmakokinetiko endogenega histamina

Pri podgani po intravenskem vnosu sproščevalca endogenega histamina (spojine 48/80) količina prostega histamina v plazmi močno naraste. Nato se prosti amin izloča iz plazme s hitrostno konstanto eliminacije 0,041 min^{-1} . Če podganam predhodno intraperitonealno vbrizgamo triciklični antidepresiv (amitriptilin) in nato spojino 48/80, pa se konstanta eliminacije poveča (0,076 min^{-1}) (13).

Vpliv antidepresivov na farmakokinetiko eksogenega histamina

Koncentracija eksogenega histamina v plazmi značilno močno naraste po intravenskem vbrizganju, nato pa se histamin zelo hitro izloči. Če so podgani predhodno intraperitonealno vbrizgali triciklični antidepresiv in nato intravenozno histamin, se v prvem merjenem vzorcu dve minuti po vnosu eksogenega histamina ni pokazal visok porast

koncentracije histamina v plazmi (14). V polni krvi podgane pa se je pri živalih, tretiranih s tricikličnim antidepresivom, koncentracija histamina v primerjavi s kontrolnimi živalmi zvišala. Izločitev eksogenega histamina je bila pri tretiranih živalih počasnejša.

Mehanizmi delovanja antidepresivov na farmakokinetiko histamina

Na kakšen način triciklični antidepresivi spremenijo farmakokinetične značilnosti histamina, še ni razjasnjeno. Možno je, da amitriptilin spremeni porazdelitev histamina v telesu podgane. Nekatere snovi, ki jih v klinični praksi uporabljamo kot antipsihotike (klorpromazin), in antidepresivne substance, npr. imipramin (triciklični antidepresiv), vplivajo na membranske lipide, in sicer na fosfatidilholin, sfingomielin in holesterol (15). Antidepresivi in antipsihotiki spremenijo elektrostatske in hidrofobne sile lipidov, zato postanejo membrane prepustnejše.

Amitriptilin pri človeku vpliva na tesne stike v endotelijskem gladkem mišičju (16). Pri bolnikih z amitriptilinskim zdravljenjem so spremljali fiziološke spremembe in spremembe oblike pri celicah endotelijskega gladkega mišičja. Celicam se je spremenila prepustnost in fluidnost membranskega lipidnega dvosloja. Opazili so tudi zmanjšano električno upornost lipidnega dvosloja. Povečano prevodnost in fluidnost membrane pripisujejo delovanju amitriptilina (v primeru prevelikih odmerkov) na tesne stike (16). Amitriptilin pri prevelikem odmerku povzroči propadanje pljuč (angl. *adult respiratory distress syndrome* – ARDS), fiziološki vzrok naj bi bil poškodovanje tesnih stikov v mišičnih celicah endotelija (16).

V veliki meri pri privzemu eksogenega histamina verjetno sodelujejo trombociti. Človeški trombociti imajo plazemski serotonski prenašalec in vezikularni monoaminski prenašalec (17). Med sabo se razlikujeta tako, da ima vezikularni monoaminski prenašalec enako afiniteto do histamina, serotonina, noradrenalina in dopamina, serotoninski pa različno. Ugotovili so, da je gostota vezikularnih monoaminskih prenašalcev pri bolnikih z depresijo večja kot pri bolnikih, zdravljenih z antidepresivi. Antidepresivi naj bi torej

zmanjšali gostoto vezikularnih monoaminskih prenašalcev (18).

Antidepresivi in drugi antipsihotiki vplivajo na presnovo histamina v največji meri z zavoro MAO. Poznamo skupino antidepresivov, ki selektivno zavirajo MAO, npr. fluksetin, norfluksetin (19). Triciklični antidepresivi, ki neselektivno zavirajo ponovni privzem serotonina in noradrenalina, imajo tudi afiniteto do MAO in kompetitivno zavirajo njeno delovanje. MAO se v možganih pojavlja v dveh oblikah MAO-A in MAO-B. Različni triciklični antidepresivi imajo različno afiniteto do MAO-A in MAO-B pri različnih živalih (20). Zaviralci MAO in triciklični antidepresivi so antidepresivi prve generacije in poleg delovanja na serotonin in noradrenalin delujejo tudi na histaminergične in holinergične sisteme in s tem povzročajo nezaželeno stranske učinke, kot so povečanje telesne teže, suha usta in vrtoglavica (21).

HNMT najdemo v različnih tkivih, jetrih, možganih, ledvicah, pljučih, prebavni sluznici in eritrocitih. Aktivnost HNMT je največja v jetrih; v pljučih, možganih in prebavni sluznici pa je aktivnost štirikrat manjša od aktivnosti HNMT v jetrih (22). Najbolj znani zaviralci HNMT so antimalariki. N-metiltransferazo inhibirajo tudi antipsihotiki, ki so po zgradbi podobni antimalarikom (23). Tetrahidroakridin, ki ga uporabljamo pri zdravljenju Alzheimerjeve bolezni, zavira HNMT v možganih pri podganah. Nekateri netipični nevroleptiki v možganih miši aktivirajo delovanje možganskih histaminergičnih nevronov in posledično zvišajo koncentracijo telemetilhistamina (24).

NAMEN IN HIPOTEZI

Namen raziskave je bil ugotoviti, ali imata zdravila amitriptilin in sertralin, ki se v človeški medicini uporabljata kot antidepresiva, po inkubaciji s histaminom vpliv na privzem in spreminjanje koncentracij histamina v krvnih celicah. Preverjali smo hipotezo: amitriptilin in sertralin v *in vitro* poskusih povečata privzem eksogenega histamina v krvne celice mačke in zmanjšata biotransformacijo v teh celicah.

METODE IN MATERIALI

Biološki material

Pri *in vitro* poskusih smo uporabljali kri domače mačke (lat. *Felis domestica*). Mačke smo anestezirali z odmerkom domitirja in ketanesta. Anestezirani mački smo s topo preparacijo v levem stranskem vratnem kotu osamili jugularno veno, v desnem pa skupno karotidno arterijo. V veno smo pritrdili trokraki ventil in vbrizgali heparin. V arterijo smo namestili plastično kanilo in 20 min po dodatku heparina lovili kri v čašo.

V skladu z etičnimi priporočili za biomedicinsko preizkušanje na živalih (Dolenc, 1993) smo število poskusnih živali omejili; če so se rezultati pri treh živalih/paralelkih ujemali (standardna napaka povprečja - SEM < 5%), poskusov nismo nadaljevali.

Izvedba *in vitro* poskusa

Centrifugiranje

Kri, ki smo jo dobili iz mačke, smo razdelili v osem plastičnih epruvet, v vsako po 5 ml krvi. Pred dodajanjem učinkovin smo najprej ločili plazmo od celic (razen pri štirih vzorcih iz drugega dela poskusa, kjer smo inkubirali celokupno kri). Celice smo od plazme ločili z dvajsetminutnim centrifugiranjem pri 3200 obratih (2000 g), izmerjen volumen plazme smo odstranili od celic (nad celicami smo pustili do 500 μ l plazme, ker se v tem delu plazme nahajajo trombociti). Znani prostornini celic smo dodali enak volumen fosfatnega pufru (pH = 7,2).

Inkubacija krvnih celic

Prvi del *in vitro* poskusa:

Znani prostornini celic smo v epruveti dodali enak volumen fosfatnega pufru (FP) (pH = 7,2), narahlo pomešali in zlili v erlenmajerice v vodni kopeli pri 37 °C. Epruvete smo sprali še z enim volumnom FP in zlili k celicam. Vzorce smo najprej pet minut segrevali na 37 °C, nato dodajali ali fiziološko raztopino ali antidepressiv (10 μ M). Vzorce smo pet minut inkubirali pri 37 °C in jim nato dodajali fiziološko raztopino ali histamin (40 ng/ml vzorca). Po naslednjih petih minutah inkubacije smo vzorce postavili na led in jih 15 minut

centrifugirali na 3200 obratih pri 4 °C. Po ločitvi celic od medija smo celicam dodali enak volumen 1 M HClO₄. Izmerjeni prostornini brezceličnega medija pa smo dodali polovični volumen 2 M HClO₄. Na ta način smo povzročili razpad celice in oborili proteine. Vzorce smo zamrznili pri -18 °C. Za nadaljnjo obdelavo smo jih odmrznili in centrifugirali 25 minut pri 3200 obratov ter supernatant shranili pri -18 °C.

Drugi del *in vitro* poskusa:

Vzorec je predstavljal celokupno kri, ki smo jo najprej pet minut segrevali na 37 °C, nato pa na 20 sekund dodajali fiziološko raztopino ali antidepressiva (10 μ M amitriptilin ali sertralin). Vzorce smo pet minut inkubirali pri 37 °C in nato dodajali ali fiziološko raztopino ali histamin (40 ng/ml). Po drugi petminutni inkubaciji smo s centrifugiranjem ločili plazmo od celic, in sicer tako, da smo dobili:

1. plazmo, revno s trombociti (kri smo 20 minut centrifugirali na 3200 obratih pri 4 °C).
2. plazmo, bogato s trombociti (kri smo 10 minut centrifugirali na 1500 obratih (400 g) pri 4 °C).

Po ločitvi plazme od krvi smo plazmi dodali enak volumen 1 M HClO₄. Na ta način smo oborili proteine. Vzorce smo zamrznili pri -18 °C. Za nadaljnjo obdelavo smo jih odmrznili in centrifugirali 25 minut pri 3200 obratov ter supernatant shranili pri -18 °C.

Analiza vzorcev

Koncentracijo histamina v vzorcih smo določali spektrofotometrično, koncentracijo metilhistamina pa s HPLC. Za merjenje koncentracije histamina na spektrofotometru smo histamin zgostili z OPT (o-ftalaldehidom). Ker OPT reagira z različnimi primarnimi amini, je zgostitev nespecifična za histamin. Poleg tega so koncentracije histamina v plazmi mačke zelo nizke. Zato smo morali vzorce pred merjenjem histamina prečistiti v dveh stopnjah:

- s tekočinsko kromatografijo na kolonah,
- z ekstrakcijo z organskimi topili (25).

Čiščenje s tekočinsko kromatografijo

Pri tekočinski kromatografiji je bila stoječa faza ionski izmenjevalec Dowex (W 80). V posamezno

kolono (1×2 cm) za tekočinsko kromatografijo smo nanegli po 1 ml vodne suspenzije Dowe-xa. Kolone smo sprali z 0,1 M fosfatnim pufrom (pH = 6,5), da smo stoječo fazo uravnali pH na 6,5.

Na kolone smo nanegli vzorec, ki je bil umerjen na pH 6,5. Histamin in metilhistamin smo iz stoječe faze eluirali v epruvete s 4 M HCl.

Ekstrakcija z organskimi topili

Vzorcu, ki smo ga ulovili iz kolon (približno 3,5 ml), smo dodali NaCl, 5 M raztopine NaOH in n-butanola. Tako pripravljeno mešanico smo stresali 5 minut in jo nato centrifugirali (5 minut pri 350 g). Butanolno fazo smo presneli v n-heptan in dodali 0,1 M HCl; mešanico smo tresli 5 minut in ponovno centrifugirali (5 minut pri 350 g) ter odlili zgornjo fazo; v spodnji, vodni fazi je ostal histamin in metilhistamin.

Kondenzacija in spektrofluometrično določanje koncentracije histamina, merjenje metilhistamina s HPLC

Histamin ne vsrka ali oddaja svetlobe v spektru, ki bi ga lahko uporabili za spektrofluometrično analizo, zato smo histamin zgotostili z OPT, da je nastal produkt, ki seva fluorescentno svetlobo (izsevana svetloba), če ga vzpodbudimo s svetlobo primerne valovne dolžine (vzbujevalna svetloba) (26).

Vzorca v 0,1 M HCl smo zmešali z 1 M NaOH in dodali 0,5 % OPT, ki v bazičnem okolju tvori komplekse s histaminom. Fluorescirajoči kompleksi so obstojni v kislem pH, zato smo na koncu zgostitve dodali 3 M HCl. Za določanje umeritvene krivulje smo naredili standarde različne koncentracije histamina. Jakost fluorescenc smo merili pri 450 nm (izsevalna ali emisijska valovna dolžina) z vzbujanjem pri 360 nm (vzbujevalna ali ekscitacijska valovna dolžina).

Metilhistamin smo merili s HPLC, predhodno smo ga zgotostili na prej opisan način. Gibljiva faza je vsebovala fosfatni pufer, acetonitril in metanol.

Statistično ovrednotenje

V okviru posamezne vrste poskusov smo poskuse ponovili tri- do štirikrat z vzorci po

dve paralelki, v enem poskusu izjemoma v eni paralelki. Pri enem poskusu smo, zaradi omejitve števila živali, poskus ponovili le dvakrat. Dobljene koncentracije histamina smo v rezultatih izrazili kot povprečno vrednost \pm standardno napako povprečja ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) iz treh do osmih statističnih enot.

Posamezne rezultate smo med sabo primerjali s t-testom, ki temelji na Studentovi porazdelitvi, prilagojeni na majhne statistične vzorce. Za statistično značilno smo vzeli vrednost $p < 0,05$.

REZULTATI

Merjenje koncentracij histamina v krvnih celicah, v brezceličnem mediju in v plazmi

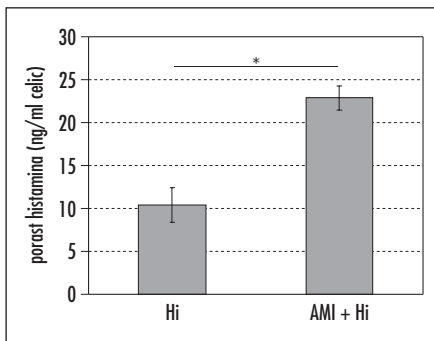
V prvem delu *in vitro* poskusov, pri katerih smo proučevali privzem histamina v krvne celice, smo posebej določili koncentracijo histamina v celicah in posebej v brezceličnem mediju. Izmerili smo tudi koncentracijo histamina v plazmi, bogati s trombociti, in v plazmi brez njih.

Koncentracije histamina in metilhistamina v celicah

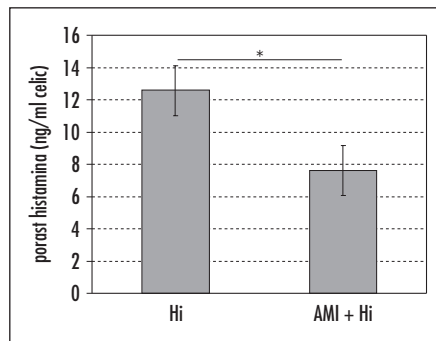
Rezultati (slika 1) prikazujejo porast histamina v celicah, podani na ml celic. V kontrolnem vzorcu celic je bila koncentracija histamina $29,0 \pm 4,1$ ng/ml. Če smo celicam dodali samo eksogeni histamin (Hi), smo po petih minutah inkubacije določili porast histamina za $10,4 \pm 2,4$ ng histamina/ml celic. Porast histamina v celicah, ki smo jih predhodno inkubirali z amitriptilinom in nato še s histaminom (AMI + Hi), je bila $22,8 \pm 1,5$ ng/ml. Med petminutno inkubacijo celic s histaminom naraste metilhistamin v celicah za $12,6 \pm 1,5$ ng/ml celic, manj metilhistamina nastane v celicah, če so le-te preinkubirane z $10 \mu\text{M}$ amitriptilinom. Metilhistamin v celicah v tem primeru naraste za $7,6 \pm 1,6$ ng/ml celic (slika 2).

Porast histamina v brezceličnem mediju

Po inkubaciji in po centrifugiranju vzorcev smo tudi v brezceličnem supernatantu določili koncentracijo histamina. V kontrolnih vzorcih (tistih, ki smo jim dodali bodisi samo



Slika 1. Porast histamina v vzorcih krvnih celic s predhodno inkubacijo z $10 \mu\text{M}$ amitriptilinom (AMI + Hi) ali fiziološko raztopino (Hi) in po dodatku histamina (40 ng/ml celotnega vzorca) (Hi in AMI + Hi) ter nadaljnji 5-minutni inkubaciji. (povprečna vrednost \pm SEM; $n = 4$). * $p < 0,05$

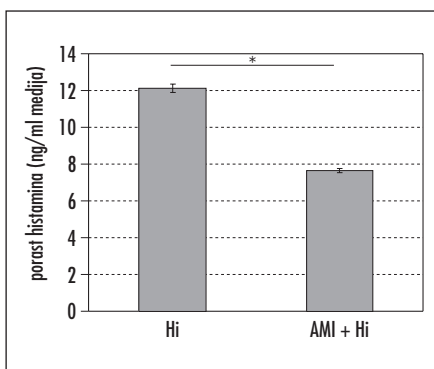


Slika 2. Porast metilhistamina v celicah s predhodno inkubacijo z $10 \mu\text{M}$ amitriptilinom (AMI + Hi) ali fiziološko raztopino (Hi) in po dodatku histamina (40 ng/ml celotnega vzorca) (Hi in AMI + Hi) ter nadaljnji 5-minutni inkubaciji. (povprečna vrednost \pm SEM; $n = 4$). * $p < 0,05$

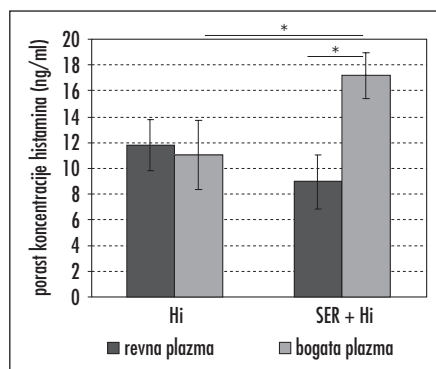
fiziološko raztopino bodisi samo amitriptilin) sta bili izmerjeni koncentraciji histamina pod 1 ng/ml . Slika 3 prikazuje porast histamina v dveh vzorcih brezceličnega medija, rezultati so podani v ng histamina na ml medija. V vzorcih, ki smo jim med poskusom dodali samo eksogeni histamin, je bila koncentracija histamina $12,1 \pm 0,2 \text{ ng/ml}$. V vzorcih, ki smo jim predhodno dodali amitriptilin, pa je bila po dodatku eksogenega histamina izmerjena koncentracija histamina na $7,6 \pm 0,1 \text{ ng/ml}$.

Porast histamina v plazmi revni s trombociti in v plazmi bogati s trombociti

Da bi ugotovili, v kakšni meri pri privzemu eksogenega histamina sodelujejo trombociti, smo inkubirali vzorce s celokupno krvjo. Po inkubaciji in centrifugiranju smo dobili enkrat plazmo, bogato s histaminom, in drugič plazmo brez trombocitov (revna plazma). Izmerili smo koncentracijo histamina v plazmi in izračunali porast koncentracije histamina



Slika 3. Porast koncentracije histamina (glede na kontrolni vzorec brezceličnega medija = $0,37 \text{ ng/ml}$ medija) v vzorcih brezceličnega medija s predhodno inkubacijo z $10 \mu\text{M}$ amitriptilinom (AMI + Hi) ali fiziološko raztopino (Hi) in po dodatku histamina (40 ng/ml celotnega vzorca) (Hi in AMI + Hi) ter nadaljnji 5-minutni inkubaciji. (povprečna vrednost \pm SEM; $n = 4$). * $p < 0,05$



Slika 4. Porast koncentracije histamina (glede na kontrolni vzorec plazme) v vzorcih z bogato in revno plazmo s predhodno inkubacijo z $10 \mu\text{M}$ sertralinom (SER + Hi) ali fiziološko raztopino (Hi) in po dodatku histamina (40 ng/ml celotnega vzorca) (Hi in SER + Hi) ter nadaljnji 5-minutni inkubaciji. (povprečna vrednost \pm SEM; $n = 6$). * $p < 0,05$

glede na kontrolni vzorec plazme. Rezultate smo podali v enotah ng histamina na ml plazme (slika 4).

Revna plazma: porast koncentracije histamina ($8,94 \pm 1,8$ ng/ml) je bil s predhodno inkubacijo s sertralinom (SER + Hi) in nato še s histaminom manjši od porasta koncentracije histamina po inkubaciji s histaminom samim (Hi) ($11,8 \pm 2,1$ ng/ml).

Bogata plazma: porast koncentracije histamina ($17,2 \pm 1,7$ ng/ml) je bil s predhodno inkubacijo s sertralinom (SER + Hi) in nato še s histaminom večji od porasta koncentracije histamina po inkubaciji s histaminom samim (Hi) ($11,0 \pm 2,6$ ng/ml).

Primerjava vpliva različnih antidepresivov na privzem histamina v krvne celice

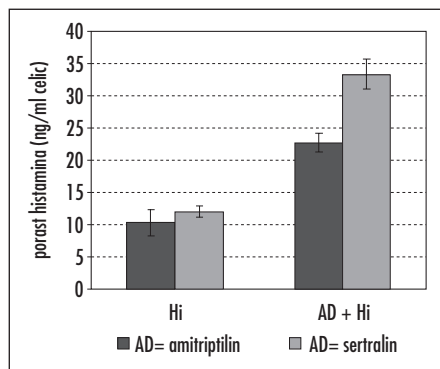
Poleg učinka amitriptilina smo proučevali tudi *in vitro* vpliv sertralina, selektivnega zaviralca serotoninskega privzema na privzem histamina v krvne celice mačke. Po petminutni inkubaciji celotnega vzorca s fiziološko raztopino (kontrola) ali sertralinom (AD in AD + Hi) smo vzorce dodatno inkubirali še z dodanim histaminom (dodali smo 40 ng/ml celic) (Hi in AD + Hi). Po zadnji inkubaciji smo s centrifugiranjem ločili celice od medija in določili koncentracijo histamina v celicah. Izmerjene koncentracije histamina (podane v celicah smo primerjali z rezultati, doblje-

nimi z amitriptilinom), (slika 5). Kontrolni vzorec pri poskusu s sertralinom je enak kontrolnemu vzorcu pri poskusu z amitriptilinom. Koncentracija histamina v celicah, ki smo jih inkubirali samo s sertralinom, je bila $45,4 \pm 2,6$ ng/ml. Če smo celicam dodali samo eksogeni histamin (Hi), smo po petih minutah inkubacije izmerili $51,7 \pm 0,9$ ng histamina/ml, če pa smo celotni vzorec predhodno 5 min inkubirali z $10 \mu\text{M}$ sertralinom, smo po nadaljnji petminutni inkubaciji z eksogenim histaminom našli $73,1 \pm 2,3$ ng histamina/ml (AD + Hi). Vsi rezultati so podani s povprečno vrednostjo histamina \pm SEM (standardna napaka povprečja) v ng/ml celic.

RAZPRAVA

Za proučevanje kinetike histamina in vpliva antidepresivov na farmakokinetiko histamina smo izbrali *in vitro* model – kri mačke. Raziskave na področju farmakokinetike histamina so bile najprej narejene na *in vivo* modelu na podgani (9). Pozneje so ugotovili, da so koncentracije histamina v krvi podgane primerljive s koncentracijo histamina v krvi mačke. Raziskave na mački in podgani so pokazale, da je tudi kinetika izločanja histamina pri obeh živalih podobna. Zato so nadaljnje raziskave o kinetiki histamina potekale tudi na mački (27, 28). Ugotovljeno je bilo, da je primerneje raziskovati na mački, saj je zaradi večje mase in vsebnosti krvi pri eni živali možno dlje časa spremljati koncentracijo histamina v krvi in tako natančneje določiti farmakokinetične parametre. Poleg tega poteka biotransformacija histamina podobno kot pri človeku.

Raziskave na mački in podgani so pokazale, da triciklični antidepresivi (med katere spada tudi amitriptilin) in SSRI (angl. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*, med katere spada sertralin) vplivajo na kinetiko eksogenega histamina pri mački in podgani (14, 28). Raziskave so pokazale, da amitriptilin po enkratnem odmerku *in vivo* zmanjša porast koncentracij histamina v plazmi in hkrati zviša koncentracijo histamina v celokupni krvi. Ta učinek je najbolj izrazit prvih pet minut po vbrizganju eksogenega histamina v mačko. Da bi ugotovili, v kolikšni meri pri opisanih spremembah sodelujejo krvne celice, smo se



Slika 5. Koncentracije histamina v vzorcih krvnih celic s predhodno inkubacijo z $10 \mu\text{M}$ antidepresivom (AD in AD + Hi) ali fiziološko raztopino (FR) in po dodatku histamina (40 ng/ml celotnega vzorca) (Hi in AD + Hi) ter nadaljnji petminutni inkubaciji (povprečna vrednost \pm SEM; $n = 3$). * $p < 0,05$

odločili za *in vitro* poskuse na mačji krvi. Poskuse bi lahko delali tudi na krvi podgane, vendar je *in vitro* poskus na mački primernejši, saj smo morali zaradi kompleksnosti raziskave naenkrat zastaviti več vzorcev krvi z različnimi dodatki, za kar potrebujemo tudi zadostno količino krvi.

V prvem delu poskusa smo preučevali privzem histamina v krvne celice in učinek amitriptilina (tricikličnega antidepresiva) na ta proces (hipoteza 1). Vzporedno smo proučevali spremembe, ko smo celicam v mediju (fosfatnem pufru) dodajali fiziološko raztopino ali histamin ali antidepresiv ali antidepresiv in histamin. Po inkubaciji in po ločevanju celic od medija smo določili koncentracijo histamina v celicah in mediju (slika 1 in 3). Rezultati porasta koncentracije histamina v celicah (slika 1) kažejo večji porast histamina v celicah, inkubiranih z amitriptilinom in eksogenim histaminom, kot v celicah, inkubiranih z eksogenim histaminom samim. Posledica večjega privzema histamina v celice, na katere je vplival amitriptilin, je nižja koncentracija histamina v mediju tega vzorca kot v mediju vzorca, ki smo mu dodali samo histamin (slika 3). Sklepamo, da zaradi delovanja tricikličnega antidepresiva histamin lažje prehaja preko membrane v celice in ga po koncu inkubacije lahko določimo v krvnih celicah.

O načinu delovanja antidepresivov na membrano celic iz naših rezultatov ne moremo sklepati. Histamin lahko v celice prehaja s translokatorji histamina, zelo počasi pa tudi z difuzijo (30). V literaturi smo zasledili, da nekatere substance, ki jih v klinični praksi uporabljamo kot antipsihotike (klorpromazin) in antidepresivne substance, npr. imipramin (ki je kot amitriptilin triciklični antidepresiv), kot smo že prej omenili, vplivajo na membranske lipide (15, 31). Ker je imipramin po zgradbi zelo podoben amitriptilinu, sklepamo, da verjetno tudi amitriptilin podobno kot imipramin spremeni lastnosti membran in eksogeni histamin lažje prehaja preko membrane.

Razen tricikličnega antidepresiva amitriptilina smo uporabljali tudi serotonin, ki je selektivni zaviralec serotoninškega privzema (SSRI). Rezultati kažejo (slika 5), da tako amitriptilin kot sertralin povečata privzem histamina v krvne celice. Učinek sertralina na

spremembe eksogenega histamina je bil večji od učinka amitriptilina. Domnevamo, da sertralin zaradi lipidotopnih značilnosti bolj kot amitriptilin vpliva na celično membrano in/ali na histaminske translokatorje in posredno na privzem histamina. Domnevamo, da krvne celice s privzemom histamina sodelujejo pri znižanju koncentracije histamina v plazmi, ki jo v *in vivo* poskusih na mačkah opazimo pet minut po vbrizganju eksogenega histamina živali, ki je bila predhodno tretirana z antidepresivom.

Da bi natančneje ugotovili, katere krvne celice sodelujejo pri privzemu eksogenega histamina, bi morali izolirano kri gradientno centrifugirati in ločiti posamezne tipe celic in za vsak tip posebej proučevati privzem histamina. Tega dela poskusa nismo naredili. Predpostavljamo pa, da so v *in vitro* poskusih za povečan privzem eksogenega histamina najbolj odgovorni trombociti in nevtrofilni granulociti. Za nevtrofilne granulocite je namreč značilno, da imajo nizko koncentracijo endogenega histamina, imajo pa receptorje za histamin in sposobnost privzema eksogenega histamina (32). Možno je, da amitriptilin z delovanjem na membrane nevtrofilcev še poveča njihovo sposobnost privzema histamina. Poskusi na eritrocitih človeka pa so pokazali, da te celice lahko privzamejo histamin, vendar ga zadržijo le približno 10%.

V veliki meri pri privzemu eksogenega histamina verjetno sodelujejo trombociti. Trombociti lahko večjeje plazemski serotoninški prenašalec in vezikularni monoaminski prenašalec (17). Na povečan privzem histamina v trombocite zaradi delovanja sertralina so pokazali poskusi, v katerih smo določali histamin v plazmi, bogati s trombociti, in plazmi, revni s trombociti (slika 4). V literaturi smo zasledili, da imajo v *in vitro* poskusih trombociti bolnikov z amitriptilinsko terapijo večjo zmožnost privzema histamina (in serotoninina) kot trombociti bolnikov, ki niso tretirani z amitriptilinom (33). Iz objavljenih podatkov in rezultatov naših poskusov sklepamo, da so v našem primeru za povečan privzem histamina v celice odgovorni tudi trombociti.

Privzem histamina v krvne celice, ki je posledica delovanja amitriptilina ali sertralina, je sicer opazen, je pa premajhen, da bi

samo s privzemom histamina v krvne celice lahko razložili znižano koncentracijo eksogenega histamina v plazmi pri *in vivo* poskusih na z amitriptilinom tretiranih mačkah. Po literaturi sodeč lahko histamin prehaja tudi v endotelij krvnih žil, v mastocite in fibroblaste (34, 35). Ugotovljeno je bilo, da amitriptilin vpliva na tesne stike v človeškem endotelijem gladkem mišičju (16). Ali amitriptilin poveča privzem histamina tudi v omenjene strukture, še ni znano. Domnevamo lahko, da amitriptilin z učinkovanjem na membrano endotelijemskih celic, fibroblastov in mastocitov poveča privzem histamina tudi v druga tkiva in tako zniža koncentracijo eksogenega histamina v plazmi.

Pri proučevanju privzema eksogenega histamina v krvne celice smo vzorcem dodali točno določeno količino histamina (40 ng/ml = 100%). Če smo po inkubaciji celic z eksogenim histaminom v celicah določili privzem eksogenega, smo v celicah našli 27% od 40 ng dodanega histamina, v brezceličnem mediju pa je ostalo 28% od dodanega histamina. Ostalih 45% dodanega histamina pa nismo našli ne v celicah in ne v mediju. Med samo inkubacijo poteka v celicah tudi presnova histamina, kar kažejo tudi rezultati na sliki 2.

Sklepamo lahko, da je v celicah potekla metilacija, za katerega je potreben encim metiltransferaza, ki ga najdemo tudi v eritrocitih, še zlasti pri mački (29).

Ob prisotnosti antidepresiva pa smo izmerili manj metilhistamina v celicah, zaradi česar domnevamo, da antidepresiv amitripti-

lin zavira encim metiltransferazo. Rezultati kažejo, da je v naših poskusih hkrati potekal privzem in biotransformacija histamina.

ZAKLJUČKI

1. Z *in vitro* poskusi smo pokazali, da različni antidepresivi, triciklični (TCA) in selektivni zaviralci serotoninskega ponovnega privzema (SSRI), povečajo privzem histamina v krvne celice. Učinek TCA je bil v naših poskusih manjši od učinka SSRI.
2. Koncentracija eksogenega histamina se med inkubacijo zniža.
3. Amitriptilin in sertralin v krvnih celicah mačke *in vitro* zavreta biotransformacijo eksogenega histamina.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svoji mentorici, prof. dr. Tatjani Irman - Florjanc, ki me je s svojimi idejami in strokovno pomočjo usmerjala skozi nalogo in navdušila za raziskovalno delo.

Zahvaljujem se Mojci Kranjec in Neni Dolžan, ki sta s svojo spretnostjo, zanesljivostjo in delovnim elanom pomagali pri tehnični izvedbi naloge in poskrbeli za prijetno vzdušje v laboratoriju. Hvala vsem ostalim zaposlenim na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, ker so mi bili vedno pripravljeni pomagati.

Za urejanje naloge se zahvaljujem Oji, Hanni in Tomažu ter vsem ostalim, ki so kakor koli pomagali, da je ta naloga nastala.

LITERATURA

1. Lamberti C, Ipponi A, Bartolini A, Schunack W, Malmberg - Aiello P. Antidepressant-like effects of endogenous histamine and of two histamine H1 receptor agonists in the mouse forced swim test. *Br J Pharmacol* 1998 Apr; 123 (7): 1331-6.
2. Voet D, Voet G. *Biochemistry*. 2nd ed. New York: John Wiley & sons, Inc, USA; 1995.
3. Benjamini E, Coico R, Sunshine G. *Immunology, A short course*. 4th ed. New York, John Wiley & sons, Inc, USA; 2000.
4. Janes SM, Palcic MM, Scaman CH, Smith AJ, Brown DE, Dooley DM, Mure M, Klinman JP. *Biochemistry* 1992; 31: 12147.
5. Wilflingseder D, Schwelberger HG. Highly efficient purification of porcine diamine oxidase. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000; 737 (1-2): 161-6.
6. Petersen J, Drasche A, Raithel M, Schwelberger HG. Analysis of genetic polymorphisms of enzymes involved in histamine metabolism. *Inflamm Res* 2003; 52 Suppl 1: S69-70.
7. Nishibori M, Tahara A, Sawada K, Sakiyama J, Nakaya N, Saeki K. Neuronal in vascular localization of histamine N-methyltransferase in the bovine central nervous system. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 415-424.
8. Barnes WG, Hough LB. Membrane-bound histamine N-methyltransferase in mouse brain: possible role in the synaptic inactivation of neuronal histamine. *J Neurochem* 2002; 82: 1262-1271.

9. Irman FT. Prispevek k poznavanju kinetike histamina in tele-metilhistamina v organizmu poskusne živali. [doktorsko delo]. Medicinska fakulteta: Univerza v Ljubljani; 1993.
10. Dvorak AM, MacGlashan DW Jr, Morgan ES, Lechenstein LM. Histamine distribution in human basophil secretory granules undergoing FMLP-stimulated secretion and recovery. *Blood* 1995; 86: 3560-6.
11. Takemura M, Kitanaka N, Kitanaka J. Signal transduction by histamine in the cerebellum and its modulation by N-methyltransferase. *Cerebellum* 2003; 2 (1): 39-43
12. Frazer A. Pharmacology of antidepressants. *J Clin Psychiatry* 1997; 17: 1-18.
13. Irman FT, Stanovnik L. Tricyclic antidepressants change plasma histamine kinetics after its secretion induced by compound 48/80 in the rat. *Inflamm Res* 1998; 47: S26-S27.
14. Irman FT. Amitriptyline changes the pharmacokinetic profile of histamine in rat blood. *Inflamm Res* 2002; 51: S23-S24.
15. Ahyaouch H, Raquero MA, Alonso A, Bennouna M, Goni FM. *J Colloid Interface Sci* 2002; 256: 284-289.
16. Dahlin KL, Bohlin K, Strindlund J, Ryrfeldt A, Cotgreave IA. Amitriptyline-induced loss of tight junction integrity in a human endothelial-smooth muscle cell bi-layer model. *Toxicol* 1999; 136: 1-13.
17. Zucker M, Weizman A, Rehavi M. Characterization of high-affinity [3H]TBZOH binding to the human platelet vesicular monoamine transporter. *Life Sci* 2001; 28, 69: 2311-7.
18. Zucker M, Aviv A, Shelef A, Weizman A, Rehavi M. Elevated platelet vesicular monoamine transporter density in untreated patients diagnosed with major depression. *Psychiatry Res.* 2002; 112 (3): 251-6.
19. Mukherjee J, Yang ZY. Monoamine oxidase A inhibition by fluoxetine: an in vitro and in vivo study. *Synapse* 1999; 31 (4): 285-9
20. Egashira T, Takayama F, Yamanaka Y. The inhibition of monoamine oxidase activity by various antidepressants: differences found in various mammalian species. *Jpn J Pharmacol* 1999; 81 (1): 115-21.
21. Feighner JP. Mechanism of action of antidepressant medications. *J Clin Psychiatry* 1999; 60 Suppl 4: 4-11; 12-3.
22. Pacifici GM, Donatelli P, Giuliani L. Histamine N-methyl transferase: inhibition by drugs. *Br J Clin Pharmacol* 1992; 34 (4): 322-7
23. Cumming P, Reiner PB, Vincent SR. Inhibition of rat brain histamine-N-methyltransferase by 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA). *Biochem Pharmacol* 1990; 40 (6): 1345-50.
24. Morisset S, Sahn UG, Traiffort E, Tardivel-Lacombe J, Arrang JM, Schwartz JC. Atypical neuroleptics enhance histamine turnover in brain via 5-Hydroxytryptamine_{2A} receptor blockade. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 288 (2): 590-6.
25. Lorenz W, Neugebauer E. Fluorometric assay. In: Uvnas B, eds. *Histamine and histamine antagonists*. Berlin: Springer-Verlag; 1991. p. 9-30.
26. Shore PA, Burkhalter A, Cohen VH. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 1959; 127: 138-41.
27. Pavličič M. Inhibicija eliminacije histamina iz krvnega obtoka mačke. Proceedings of the XXV. Krkine nagrade, 1995; Novo mesto, Slovenija.
28. Irman FT. Amitriptyline affects pharmacokinetics of histamine. In: European histamine research society. Proceedings of the XXVII-th Meeting, 1998; May 20-23; Lodz; 1998.
29. Van Loon JA, Pazmino PA, Weinshilboum RM. Human erythrocyte histamine N-methyltransferase: radiochemical microassay and biochemical properties. *Clin Chim Acta* 1985; 149: 237-251.
30. Beaven MA, Ganellin C, R., Pearson M. E. *The pharmacology of Histamine Receptors*. Littleton: PSG Publishing Co., Inc; 1982.
31. Ahyaouch H, Goni FM, Bennouna M. pH - dependent effects of clorpromazine on liposomes and erythrocyte membranes. *J Liposome Res* 2003; 13: 147-155.
32. Catini C, Miliani A, Gheri G, Legnaioli M. Histamine uptake by humal normal neutrophils. *Basic Appl Histochem.* 1990; 34 (3): 183-8.
33. Franke L, Schewe HJ, Uebelhack R, Muller OB. High platelet-serotonin uptake activity is associated with a rapid response in depressed patients treated with amitriptyline. *Neurosci Lett* 2003; 345: 105-108.
34. Holcslaw T, Wilson C, Nichols G. Histamine uptake and metabolism in the blood vessel of rats. *Agents Actions* 1984; 15: 202-210.
35. Baenziger LN, Mack P, Jong I Yuh-Jiin, Dalermar RL, Perez N, Lendberg C, Wilhelm B, Haddck CR. An environmentally regulated receptor for diamine oxidase modulates human endothelial cell/fibroblast histamine degradative uptake. *J Biol Chem* 1994; 269, 21: 14892-98.