

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Aleš PIRC

**VPLIV CITALOPRAMA NA PORAZDELITEV APLICIRANEGA
HISTAMINA PRI PODGANI**

DIPLOMSKA NALOGA
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF CITALOPRAM ON THE DISTRIBUTION OF
EXOGENOUS HISTAMINE IN THE RAT**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Histološke preiskave so bile opravljene na Inštitutu za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Tatjano Irman Florjanc.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Tom TURK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Tatjana Irman Florjanc
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta
Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo

Član: prof. dr. Lovro Stanovnik
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta
Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo

Datum zagovora: 14.9.2006

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Aleš Pirc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK 591.8:615.372:599.32(043)=863
KG histamin/porazdelitev/tkiva podgane/antidepresivi/citalopram
AV PIRC, Aleš
SA IRMAN FLORJANC, Tatjana (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2006
IN VPLIV CITALOPRAMA NA PORAZDELITEV APLICIRANEGA HISTAMINA PRI PODGANI
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 47 str., 2 pregl., 15 sl., 42 vir.
IJ sl
JI sl/an
AI Histamin je fiziološko aktivni biogeni amin in ima pomembno vlogo pri alergijskih reakcijah, uravnavanju izločanja želodčne kisline ter kot neurotransmitor in tudi kot modulator izločanja ostalih neurotransmitorjev. Ker novejša dognanja o depresivnih motnjah kažejo tudi na vlogo histamina pri nastanku depresije, je poznavanje vpliva antidepresivov na farmakokinetiko histamina pomembno. Raziskave so pokazale, da antidepresivi lahko spremenijo farmakokinetiko histamina, prav tako tudi citalopram, ki se kot antidepresiv uporablja v humani medicini in po delovanju spada med selektivne zaviralce privzema serotonina. Pri poskusnih živalih (mačka, podgana), ki so pred injekcijo histamina dobile citalopram, ni prišlo do porasta koncentracije histamina v plazmi, opazili pa so porast koncentracije histamina v celokupni krvi. Meritve z elektroparamagnetno resonanco so pokazale, da citalopram poveča fluidnost membrane eritrocitov mačke, kar bi lahko vplivalo na privzem histamina v celice. Z našimi poskusi smo želeli preveriti vpliv citaloprama na porazdelitev apliciranega histamina pri podgani, zato smo merili koncentracije histamina v različnih tkivih poskusne živele. Poskusne živali smo razdelili na 3 skupine: na kontrolne podgane, podgane tretirane s histaminom (intravensko, 125 µg/kg) ter podgane predhodno tretirane s citalopramom (intraperitonealno, 1 mg/kg) in po eni uri s histaminom (intravensko, 125 µg/kg). Iz vseh poskusnih živali smo izolirali 6 dobro prekrvljenih tkiv (aorta, slinavka – g. submandibularis, pljuča, srce, jetra in ledvica) ter pri eni podgani iz vsake skupine še sapnico. Pri večini tkiv podgan, ki so dobile citalopram in histamin, so bile koncentracije histamina v tkivih nižje kot pri podganah tretiranih samo s histaminom. Naši rezultati so pokazali, da citalopram vpliva na farmakokinetiko apliciranega histamina in s tem na koncentracije histamina v različnih tkivih pri podgani. Na podlagi dobljenih rezultatov in doslej opravljenih raziskav lahko sklepamo, da je citalopram poleg povečanja prepustnosti membran najverjetneje tudi pospešil razgradnjo histamina.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 591.8:615.372:599.32(043)=863
CX histamine/distribution/rat tissues/antidepressants/citalopram
AU PIRC, Aleš
AA IRMAN FLORJANC, Tatjana (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology
PY 2006
TI THE INFLUENCE OF CITALOPRAM ON THE DISTRIBUTION OF
EXOGENOUS HISTAMINE IN THE RAT
DT Graduation thesis (University studies)
NO IX, 47 p., 2 tab., 15 fig., 42 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Histamine is a physiologically active biogenic amine and plays an important role in allergic reactions, regulation of gastric acid secretion, and also as neurotransmitter and modulator of secretion of other neurotransmitters. Recent studies have shown that histamine has an important role in development of depression; therefore it is important to know the influence of antidepressants on histamine pharmacokinetics. It has been shown that antidepressants, among them citalopram, a selective serotonin reuptake inhibitor, can change the pharmacokinetics of histamine. Citalopram changes histamine pharmacokinetics. In animals (rat, cat) treated with citalopram before exogenous histamine was injected intravenously, no rise in plasma concentration of histamine was detected, however significant rise of the whole blood concentration of histamine was detected. Studies with electron paramagnetic resonance have shown that citalopram increases membrane fluidity of feline red blood cell and thus probably influences histamine uptake in the cells. In our work we studied the influence of citalopram on the pharmacokinetics of histamine by following the distribution of applied histamine in different rat tissues. The test animals were divided into three groups: control rats, rats treated with histamine, given intravenously (125 µg/kg), and rats pre-treated with citalopram, given intraperitoneally (1 mg/kg) one hour before intravenous histamine application (125 µg/kg). We isolated different well perfused tissues (aorta, gl. submandibularis, lung, heart, liver and kidneys) from all test rats. In addition we also isolated the trachea from one animal of each group. In most of the tissues histamine concentrations were lower in animals treated with citalopram and histamine than in animals treated only with histamine. Our results show that citalopram changes histamine concentrations in various tissues and thus changes pharmacokinetics of exogenous histamine. On the basis of our results and recent studies it can be suggested that citalopram most likely changes histamine distribution and probably also histamine metabolism.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VIII
SLOVARČEK	IX
1 UVOD	1
1.1 UVOD.....	1
1.2 NAMEN RAZISKOVANJA IN DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 HISTAMIN.....	3
2.1.1 Sinteza histamina	3
2.1.2 Razgradnja histamina	4
2.1.3 Porazdelitev histamina v organizmu	7
2.1.4 Privzem histamina	8
2.1.4.1 Privzem histamina v krvničke	8
2.1.4.2 Privzem histamina v celice ostalih tkiv	8
2.1.5 Mehanizem sproščanja histamina iz mastocitov in bazofilcev	9
2.1.6 Farmakokinetika histamina	11
2.1.6.1 Farmakokinetika endogenega histamina	11
2.1.6.2 Farmakokinetika eksogenega histamina.....	12
2.1.7 Histaminski receptorji	12
2.1.8 Farmakološki učinki histamina	14
2.2 FARMAKOLOŠKO DELOVANJE ANTIDEPRESIVOV	15
2.3 CITALOPRAM	16
2.3.1 Kemične lastnosti citaloprama	16
2.3.2 Delovanje citaloprama	17
2.3.3 Vpliv citaloprama na farmakokinetiko eksogenega histamina	18
2.3.4 Učinek citaloprama na celične membrane	19
3 METODE DELA	20

3.1	MATERIAL	20
3.1.1	Uporabljeni pribor, kemikalije in učinkovine	20
3.1.2	Biološki material	20
3.2	IZVEDBA <i>IN VIVO</i> POSKUSA	21
3.2.1	Preparacija podgane	21
3.2.2	Izolacija tkiv	22
3.3	ANALIZA VZORCEV	23
3.3.1	Homogenizacija izoliranih tkiv	23
3.3.2	Ekstrakcija z organskimi topili	23
3.3.3	Kondenzacija in spektrofluorometrično določanje koncentracije histamina	23
3.4	OBDELAVA PODATKOV DOBLJENIH Z ANALIZO	24
3.5	STATISTIČNO OVREDNOTENJE	25
4	REZULTATI	26
4.1	PODATKI O ŽIVALIH	26
4.2	VSEBNOSTI HISTAMINA V TKIVIH	26
4.2.1	Aorta	26
4.2.2	Slinavka	28
4.2.3	Pljuča	29
4.2.4	Srce.....	30
4.2.5	Jetra	31
4.2.6	Ledvica.....	32
4.2.7	Sapnica.....	33
4.3	HISTOLOŠKE SPREMEMBE TKIV	34
4.3.1	Slinavka	34
4.3.2	Jetra	36
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	37
5.1	RAZPRAVA.....	37
5.2	SKLEPI.....	41
6	POVZETEK	42
7	VIRI	43

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 4.1: Podatki o poskusnih živalih	26
Pregl. 4.2: Koncentracije histamina v aortah	27

KAZALO SLIK

Sl. 1.1: Strukturna formula histamina	3
Sl. 1.2: Shema biosinteze histamina	4
Sl. 1.3: Shema razgradnje histamina	6
Sl. 2.1: Strukturna formula citaloprana	16
Sl. 3.1: Shema poskusa	22
Sl. 4.1: Koncentracije histamina v aortah	27
Sl. 4.2: Koncentracije histamina v slinavkah	28
Sl. 4.3: Koncentracije histamina v pljučih	29
Sl. 4.4: Koncentracije histamina v srcih	30
Sl. 4.5: Koncentracije histamina v jetrih	31
Sl. 4.6: Koncentracije histamina v ledvicah	32
Sl. 4.7: Koncentracije histamina v sapnicah	33
Sl. 4.8: Histološki preparat slinavke kontrolne podgane	34
Sl. 4.9: Histološki preparat slinavke podgane tretirane s histaminom	35
Sl. 4.10: Histološki preparat slinavke podgane tretirane s citalopramom in histaminom	36

SLOVARČEK

ALD-DH	aldehid dehidrogenaza
AM	S-adenozil-L-metionin
cAMP	ciklični adenzinmonofosfat
DAO	diaminooksidaza
GPCR	z G-proteinom sklopljeni receptorji (ang. G-protein-coupled receptors)
HMT	histamin-N-metiltransferaza
HRF	faktorji sproščanja histamina (ang. histamine-releasing factors)
IAA	imidazol-4-ocetna kislina
IAA-RP	ribotid imidazolocetne kisline
IP ₃	inozitol-1,4,5-trifosfat
IPRT	IAA 5'-fosforibozil transferaza
MAO-B	monoaminska oksidaza B
OCT3	transporter organskih kationov 3 (ang. organic cation transporter 3)
PLC	fosfolipaza C
PLP	piridoksal-5'-fosfat
SSRI	selektivni zaviralci ponovnega privzema serotonina (ang. selective serotonin reuptake inhibitors)
TCA	antidepresivi tricikličnega tipa (ang. three-cyclic antidepressants)
VMAT	vezikulami monoaminski transporter

1 UVOD

1.1 UVOD

Histamin je fiziološko aktivni biogeni amin in ima pomembno vlogo pri alergijskih reakcijah, uravnavanju izločanja želodčne kisline ter deluje kot nevrottransmitor in tudi kot modulator izločanja ostalih nevrottransmitorjev v perifernem in centralnem živčnem sistemu.

Depresijo z nevrobiološkega vidika razlagamo kot neravnovesje živčnega prenosa v osrednjem živčevju, zlasti naj bi bilo moteno delovanje noradrenergičnih in serotonergičnih poti (monoaminska hipoteza depresije). Rezultati novejših raziskav kažejo, da zgolj monoaminska hipoteza ni več dovolj močan argument za razlago depresivnih motenj, in tako odkrivajo vse večjo vlogo histamina kot nevrottransmitorja in vse bolj uveljavljajo hipotezo, da spremenjene količine histamina v osrednjem živčevju pomembno prispevajo k razvoju depresije. Ker je torej pri depresiji najverjetneje vpleten tudi histamin, je poznavanje vpliva antidepresivov na kinetiko histamina pomembno.

Dosedanje raziskave so pokazale, da antidepresivi spremenijo farmakokinetiko histamina pri poskusni živali. Raziskave na mački (Irman Florjanc, 1998) in podgani (Irman Florjanc, 2002) so pokazale, da antidepresivi pri poskusni živali vplivajo na kinetiko eksogenega histamina. Sprememba v farmakokinetiki histamina se kaže tudi pri citalopramu, ki se v humani medicini uporablja kot antidepresiv in po delovanju spada med selektivne zaviralce privzema serotonina. Če pri poskusih na mačkah ter podganah *in vivo* intravensko injiciramo histamin, plazemska koncentracija histamina takoj po injiciranju močno naraste in nato biekspONENTNO upade in v 10 minutah pride na kontrolno koncentracijo. Če pa je žival predhodno tretirana z citalopramom, po injiciranju eksogenega histamina ne opazimo porasta histamina v plazmi, opazimo pa porast histamina v celokupni krvi. Ena od hipotez teh raziskav je, da antidepresivi vplivajo na privzem histamina v krvne celice in to med drugim doprinese k zmanjšanju porasta koncentracije histamina v plazmi. Meritve z elektroparamagnetno resonanco so pokazale,

da citalopram poveča fluidnost membrane eritrocitov mačke, kar bi lahko pomenilo večji privzem histamina v celice (Arko, 2004).

1.2 NAMEN RAZISKOVANJA IN DELOVNA HIPOTEZA

Namen raziskave je bil ugotoviti, ali zdravilo citalopram, ki je eden izmed pogosteje uporabljenih antidepresivov v humani medicini, po tretiranju podgane s histaminom vpliva na privzem tega biogenega amina v različna dobro prekrvljena tkiva te živali.

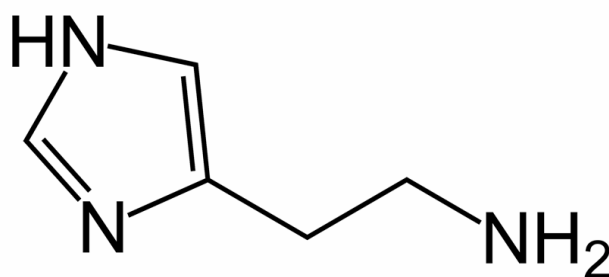
Delovna hipoteza:

Citalopram poveča privzem histamina v različna dobro prekrvljena tkiva podgane.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HISTAMIN

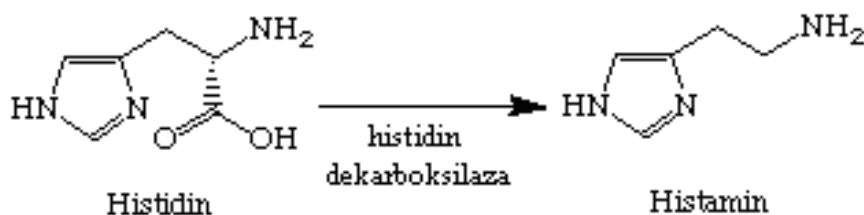
Histamin (4(5)-(2-aminoetil) imidazol ali β -aminoetilimidazol) (Slika 1.1) je fiziološko aktivni biogeni amin. Od prvih farmakoloških študij histamina na začetku 20. stol. (Dale in Laidlaw, 1910) je trajalo kar nekaj časa, preden so ga dokazali v organizmih (Best in sod., 1927). V živalskem kraljestvu je zelo razširjen, prisoten pa je tudi v mnogih strupih, bakterijah in rastlinah. Danes vemo, da ima histamin pomembno vlogo pri alergijskih reakcijah, vazodilataciji, prepustnosti kapilar, bronhokonstrikciji, uravnavanju izločanja želodčne kisline ter deluje kot neurotransmitor in tudi kot modulator izločanja ostalih neurotransmitorjev v perifernem in centralnem živčnem sistemu.



Slika 1.1: Strukturna formula histamina.

2.1.1 Sinteza histamina

Biosinteza histamina (Slika 1.2) poteka z dekarboksilacijo L-histidina (nabita polarna aminokislina) pod katalitičnim vplivom encima histidin dekarboksilaze, ki je odvisen od koencima PLP (piridoksal-5'-fosfat) (Voet, 1995). V organizmu obstaja še nespecifični encim, aromatska aminokislinska dekarboksilaza, ki pa ima mnogo večjo afiniteto do aromatskih aminokislin in je njegova aktivnost za histidin precej nizka ter za sintezo histamina nepomembna.



Slika 1.2: Shema sinteze histamina iz histidina pod katalitičnim vplivom encima histidin dekarboksilaza.

2.1.2 Razgradnja histamina

Večina tkiv vsebuje encime za razgradnjo histamina, vendar se ta ne razgradi popolnoma, saj imidazolov obroč v telesu ne razpade in tako lahko prepoznamo različne metabolne produkte, ki se skupaj s histaminom vsi pojavljajo v urinu.

Metabolizem histamina poteka po dveh poteh (Slika 1.3):

1. z metiliranjem na imidazolovem obroču in
2. z oksidativnim deaminiranjem.

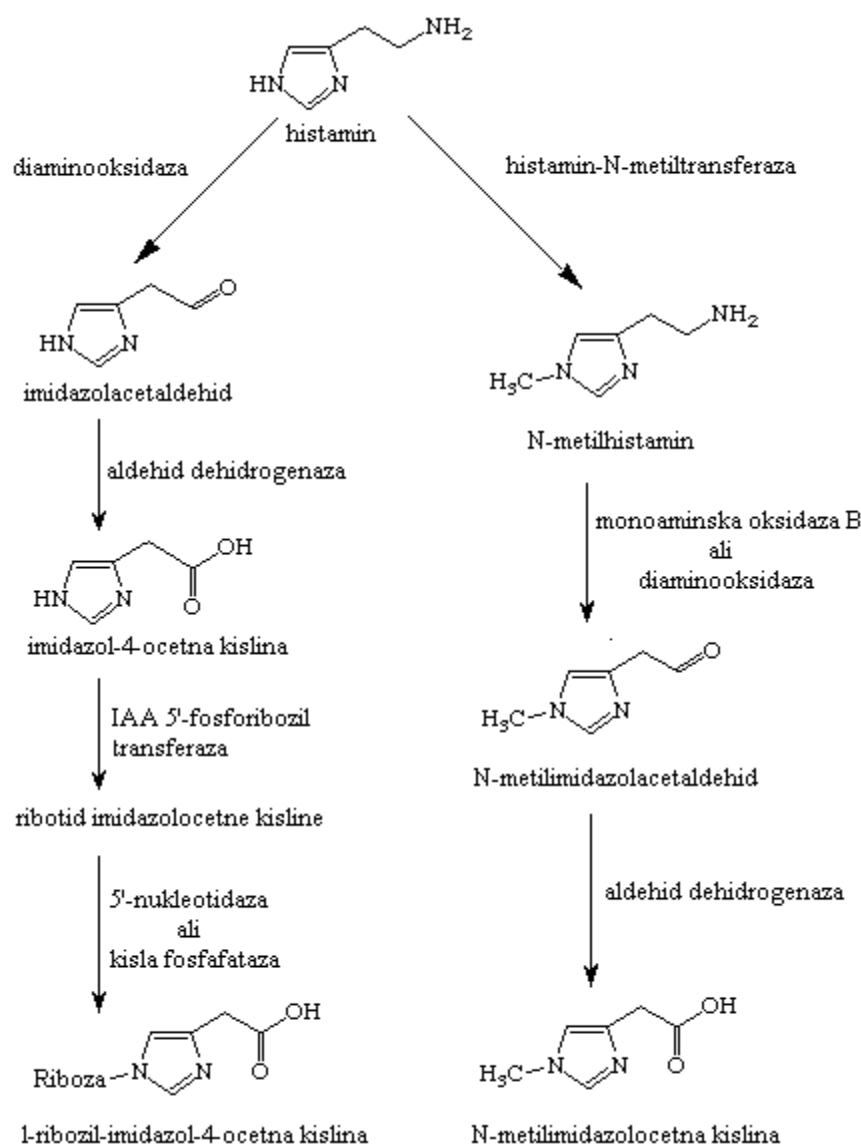
Prvi način razgradnje je metiliranje histamina, ki lahko poteče na dušikovem atomu, ki je na stranski verigi, ali pa na dušikovem atomu na tele mestu imidazolovega obroča. Če poteče metilacija na stranski verigi, nastane metilhistamin ali dimethylhistamin. Ta način je manj pomemben. V primeru metilacije obroča na tele mestu nastane metabolit tele-methylhistamin, ki je eden glavnih metabolnih produktov histamina. Reakcijo metiliranja katalizira encim histamin-N-metiltransferaza (HMT) pod vplivom kofaktorja S-adenozil-L-metionin (AM). Nastali *tele*-metilhistamin oz. N-methylhistamin je intermediat, ki se v drugi stopnji metabolizma preko vmesne stopnje N-methylimidazolacetaldehid oksidira v N-methylimidazolocetno kislino, ki se izloči iz organizma z urinom. Pretvorbo N-methylhistamina v aldehyd katalizira encim monoaminska oksidaza B (MAO-B) ali diamino oksidaza (DAO), pretvorbo aldehyda v kislino pa encim aldehyd dehidrogenaza (ALD-DH) s kofaktorjem NAD^+ . Biotransformacija histamina po tej poti je v nekaterih

tkivih glavni in morda edini način razgradnje histamina (Schwartz, 1971). V centralnem živčnem sistemu je ta pot najpomembnejša.

Direktna oksidacija aminoetilnega ostanka pod katalitičnim vplivom nespecifičnega encima DAO vodi v nastanek imidazolacetaldehida. Iz tega pod vplivom ALD-DH nastane imidazol-4-ocetna kislina (ang. imidazole-4-acetic acid - IAA), ki se pod vplivom encima IAA 5'-fosforibozil transferaza (IPRT) konjugira z fosforibozil-pirofosfatom, da nastane l-ribotil-imidazol-4-ocetna kislina (ribotid imidazolocetne kisline - IAA-RP). IAA-RP lahko defosforilirajo 5'-nukleotidaze ali pa kisle fosfataze, pri čemer nastane končni produkt te poti l-ribozil-imidazol-4-ocetna kislina (ribozid imidazolocetne kisline). Slednja je bolj hidrofilna kot imidazolocetna kislina in se lahko izloči z urinom (Beaven, 1982). Ugotovili so, da IAA preko receptorjev za γ -aminomasleno kislino (ang. γ -aminobutyric acid – GABA) izzove številne učinke v centralnem živčevju. IAA je namreč močan agonist za GABA_A receptor in tudi močan antagonist za nativni GABA_C receptor, za katerega ima skoraj trikrat višjo afiniteto kot GABA (Thomas in Prell, 1995).

Poleg končnih produktov obeh poti razgradnje histamina (l-ribozil-imidazol-4-ocetna kislina in N-metilimidazolocetna kislina) se delno z urinom izločata tudi intermediata N-metilhistamin in IAA.

Prisotnost dveh poti razgradnje v organizmu je prilagoditev, ki v primeru blokade ene poti omogoča razgradnjo histamina po drugi poti.



Slika 1.3: Shema obeh poti razgradnje histamina. Po eni poti ga diaminooksidaza oksidativno deaminira v imidazolocetno kislino, ki se nato konjugira z ribozo v 1-ribozil-imidazol-4-ocetno kislino (IAA) in izloči iz telesa. Lahko pa encim histamin-N-metiltransferaza metilira histamin, da nastane N-metilhistamin (*tele*-metilhistamin), ki se nato pod vplivom monoaminske oksidaze B ali diaminooksidaze oksidativno deaminira v N-metilimidazolocetno kislino, ki se prav tako izloči iz telesa.

2.1.3 Porazdelitev histamina v organizmu

Pri sesalcih je histamin v telesu porazdeljen v različnih tkivih v različnih koncentracijah, kar je povezano z njegovo fiziološko in patofiziološko vlogo. Več kot 90% histamina se v telesu nahaja v mastocitih (v rahlem vezivu v tkivih), najdemo pa ga tudi v bazofilcih (v krvi) in v sinaptičnih mehurčkih v centralnem živčevju. Tkiva sesalcev vsebujejo od manj kot 1 µg histamina v 1 g tkiva do več kot 100 µg histamina v 1 g tkiva. Pri človeku se veliko mastocitov nahaja v koži, v dihalni poti, v pljučih (do 2% alveolarnega tkiva), v želodcu, v črevesju, v mukozi reproduktivnih organov in ob krvnih ter limfnih žilah okoli živcev. V telesnih tekočinah je histamina zelo malo (kri mačke 18 ng/ml, kri človeka 50 ng/ml), medtem ko ga je v človeški cerebrospinalni tekočini nenavadno veliko.

Mastociti so enojedrne tkivne celice, ki vsebuje granule s histaminom in drugimi mediatorji. Pri pH ~5,5 v granulih je histamin v monokationski obliki. Le v monokationski obliki pa se je sposoben vezati na receptorje (Kumbar, 1975). V celicah je shranjen z elektrostatskimi povezavami s kislinskimi skupinami proteaz, heparinom (Benjamini in sod., 2000) in hondroitinsulfatnimi proteoglikani (Serafin in Austen, 1987). V nekaterih tkivih, kot so epidermis, črevesna sluznica, centralni živčni sistem in obnavljajoča se ali hitro rastoča tkiva, histamin nastaja izven mastocitov. Izvenmastocitni histamin je rahlo vezan, se neprestano sprošča, zaloge pa so odvisne od nastajanja in biotransformacije histamina.

V krvi se histamin v večjih koncentracijah nahaja v različnih krvničkah: pri človeku največ v bazofilcih, pri zajcih v trombocitih in pri psih v eozinofilcih ter trombocitih. Bazofilci prav tako vsebujejo sekretorne granule, ki vsebujejo visoke koncentracije histamina s histaminom in se nahajajo tik pod celično membrano ter v bližini Golgijevega aparata (Dvorak in sod., 1995). V enem mastocitu je 0,1-0,2 pmol histamina, v bazofilcu pa okrog 0,01 pmol histamina.

2.1.4 Privzem histamina

2.1.4.1 Privzem histamina v krvničke

Bazofilci in eozinofilci eksogenega histamina ne privzemajo oz. je privzem histamina zanemarljiv zaradi relativno visoke koncentracije endogenega histamina. Raziskave so pokazale, da nevtrofilci, ki imajo nizko koncentracijo endogenega histamina, najverjetneje aktivno transportirajo histamin preko plazmaleme in tako sodelujejo pri uravnavanju koncentracije histamina v plazmi (Catini in sod., 1990).

Poskusi *in vitro* na prašičjih trombocitih so pokazali, da lahko privzamejo histamin, če jih dovolj dolgo inkubiramo v večji koncentraciji histamina. Trombociti vsebujejo encim histidin dekarboksilazo, kar pomeni, da so sposobni sami sintetizirati histamin. Poleg zmožnosti sinteze so v trombocitih opazili tudi aktivni od ATP odvisen privzem histamina (Fukami in sod., 1984), saj trombociti lahko v membrano vežejo vezikulami monoaminski transporter (VMAT), ki prepozna glavne monoaminske mediatorje (serotonin, histamin, noradrenalin in dopamin) (Zucker in sod., 2001). VMAT v celicah sicer transportira monoamine iz citoplazme v vezikle.

2.1.4.2 Privzem histamina v celice ostalih tkiv

Pri podgani so v poskusih *in vitro* opazovali privzem histamina v steni abdominalne aorte, iliakalne arterije, mezenterične arterije in jetrne portalne vene. Ugotovili so, da je proces privzema histamina v celice žilne stene *in vitro* odvisen od temperature, koncentracije endogenega histamina in izvencelične koncentracije Na⁺. V celicah žilne stene podgane so našli imidazolocetno kislino, kar kaže na metabolno aktivnost encima DAO (Holsclaw in sod., 1984).

Pri endotelijskih celicah in fibroblastih so opazili poseben primer privzema histamina t.i. degradativni privzem histamina. Fibroblasti in endotelijske celice imajo na membrani receptorje za encim DAO, kar pomeni, da celice privzamejo metabolite histamina in ne

samega histamina. Proces privzema je odvisen od zunajceličnih koncentracij ionov (Na^+ in Cl^-). Degradativni privzem histamina bi bil lahko eden od možnih vzrokov za znižanje koncentracije endogenega histamina v krvi 40 minut po sprostitvi histamina iz mastocitov (Baenziger in sod., 1994).

Človeške endometrijske celice za privzemanje in izločanje vsebujejo plazmalemski ekstranevralni monoaminski transporter in vezikularni monoaminski transporter 2, ki imata oba visoko afiniteto do histamina (Noskova in sod., 2006).

Zarodne celice v kostnem mozgu pri miši pod vplivom interleukina-3 ali kalcijevega ionofora proizvajajo precejšnje količine histamina, vendar pa histamin tudi privzemajo s sistemom aktivnega transporta, ki nadzira tudi izločanje histamina (Corbel in Dy, 1996).

Za transport v živčne celice je odgovoren kationski transportni protein, t.i. transporter organskih kationov 3 (ang. organic cation transporter 3 – OCT3). Skozi membrano veziklov pa se histamin prenese z VMAT. OCT3 so odkrili tudi na bazofilcih, kjer naj bi prispevali k regulaciji delovanja bazofilcev. Trenutno potekajo raziskave, ali bi bilo možno s stimulacijo OCT3 na bazofilcih sprožiti reverzni transport histamina in tako ublažiti alergijske reakcije, prvi rezultati pa kažejo na to, da bi farmakološka modulacija transporta histamina lahko postala orodje za kontrolo delovanja bazofilcev med alergijsko reakcijo (Schneider in sod., 2005).

2.1.5 Mehanizem sproščanja histamina iz mastocitov in bazofilcev

Vzrok za sproščanje histamina iz mastocitov in bazofilcev so različni imunološki in neimunološki dražljaji. Med imunološke dražljaje, ki stimulirajo izločanje histamina, uvrščamo IgE protitelesa, komplement (C3a , C4a in C5a), citokine (interleukina 1 in 8) in faktorje sproščanja histamina (histamine-releasing factors – HRF), ki so produkti limfocitov, nevtrofilcev, eozinofilcev, trombocitov, endotelijskih celic in pljučnih makrofagov. HRF po interakciji z bazofilci oz. mastociti sprožijo sproščanje histamina (MacDonald in sod., 1991). Primeri neimunoloških dražljajev so nevrokini peptidi (snov P, bradikinin, nevrokinin A) (Cross in sod., 1997), sprostitveni hormon za kortikotropin

(CRH), somatostatin, nevrotenzin, opioidi, endorfini, ATP, eksperimentalne spojine (48/80) in nekateri fizikalni dražljaji (vibracije, vročina, mraz, sončna svetloba, mehanske poškodbe površine kože ter sluznic prebavil in dihal).

Dober primer masovnega sproščanja histamina je takojšnji preobčutljivostni odgovor. Primarne tarče takojšnjega preobčutljivostnega odgovora so mastociti in bazofilci (Galli, 1993; Schwartz, 1994). Oboji imajo na površini receptorje F_c z veliko afiniteto za protitelesa IgE (Benjamini in sod., 2000). Prečna povezava dveh protiteles IgE s specifičnim antigenom na površini mastocita vodi po kaskadi reakcij fosforilacije proteinov (fosfolipaze C) do sproščanja kalcijevih ionov (Ca^{2+}) iz znotrajceličnih zalog ali pa se poveča prepustnost za Ca^{2+} skozi membrano mastocitov. Zvišana koncentracija Ca^{2+} v celici vodi v degranulacijo mastocita preko kaskade reakcij, ki v celici sproži aktivacijo proteinskih kinaz in fosforilacijo beljakovin (tubulin, intermediarni filament vimetin, α in β fodrin, ankirin ter aktin), ki so ključne za zlitje granulov s celično membrano (Kasel in sod., 1995; Neugebauer in sod., 1994). Znotrajcelični granuli se zlijejo s celično membrano in tako se sprostijo histamin, serotonin in nekateri kemotaktični dejavniki (Kasel in sod., 1995). Po sprostitvi histamina iz sekretornih granulov so opazili povečano aktivnost Na^+/K^+ črpalke in povečan privzem kalija v mastocite. Na podlagi tega sklepajo, da Na^+/K^+ črpalka sodeluje pri obnovi mastocitov po sprostitvi histamina (Knudsen in sod., 1993). Zaloge histamina v takih tkivih se počasi obnovljajo, zato lahko traja tedne preden se vzpostavi normalna koncentracija histamina.

Poleg degranulacije mastocitov vezava protiteles IgE na receptorje preko fosfolipaze A2 pospeši tudi presnovo aktivacijskega faktorja trombocitov (ang. platelet-activating factor – PAF) in arahidonske kisline, katere metaboliti (prostaglandini, levkotrieni, tromboksani) ter številni citokini so pomembni molekularni mediatorji, ki skupaj s histaminom povzročajo in vzdržujejo vnetje (Contran in sod., 1994).

V *in vitro* ter *in vivo* poskusih na podgani so ugotovili, da aktivacija adenozijskih A3 receptorjev na mastocitih prav tako vodi v degranulacijo le-teh (Reeves in sod., 1997)

2.1.6 Farmakokinetika histamina

Pri testnih živalih lahko koncentracijo histamina v krvi povišamo s sproščanjem endogenega (notranjega oz. lastnega) histamina iz mastocitov in krvničk z različnimi sproščevalci histamina ali z aplikacijo eksogenega (zunanjega oz. nelastnega) histamina.

2.1.6.1 Farmakokinetika endogenega histamina

Potem, ko se histamin sprostí iz mastocitov in drugih celic, po nekaj minutah izgine iz obtoka (razpolovni čas ($t_{1/2}$) je 0,5-2 minut) (Baenziger in sod., 1994). Tako kratek razpolovni čas skoraj gotovo ni posledica difuzije preko celičnih membran glede na to, da je histamin pri fiziološkem pH pozitivno nabita molekula in ne more prehajati preko lipidnega dvosloja. Zato najverjetneje obstajajo posebni prenašalci za prenos histamina preko membran ali pa se histamin lahko pred vstopom v celice razgradi in v celice prehajajo že metaboliti, kar imenujejo degradativni privzem histamina (Baenziger in sod., 1994).

Pri poskusni živali endogeni histamin iz mastocitov in drugih celic lahko sprostimo s spojino 48/80 (sproščevalec histamina). Na ta način sproščeni endogeni histamin se metabolizira in nato tudi izloči iz telesa. Dve minuti po intravenskem injiciranju spojine 48/80 se v krvi podgane pokaže povišana koncentracija endogenega histamina. Pri podgani je koncentracija endogenega histamina v krvi približno 50 ng/ml. Dve minuti po i.v. injiciranju spojine 48/80 koncentracija histamina naraste na 900 ng/ml. Po 40 min pade koncentracija histamina v krvi skoraj za polovico, medtem pa se po 40 min količina tele-metilhistamina s kontrolne koncentracije 8,3 ng/ml poveča na 100 ng/ml (Irman Florjanc in Erjavec, 1992).

2.1.6.2 Farmakokinetika eksogenega histamina

Če podgani ali mački i.v. injiciramo eksogeni histamin, se po dveh minutah koncentracija histamina močno zviša tako v plazmi kot v celokupni krvi (Irman Florjanc in Erjavec, 1992; Irman Florjanc, 2002). V primerjavi s koncentracijama po dveh minutah pet minut po i.v. injekciji eksogenega histamina pri podgani in pri mački opazimo znižanje koncentracije histamina v plazmi in v krvi. Pri podgani z 90 ng/ml (konc. histamina dve minuti po injiciranju histamina) po petih minutah pade na 60 ng/ml. V petih do desetih minutah po i.v. injekciji se izloči največ eksogenega histamina ($t_{1/2} = 1,4-2,5$ min), kasneje pa je izločanje eksogenega histamina iz plazme počasnejše ($t_{1/2} = 25-80$ min). Hitro znižanje koncentracije histamina v prvih minutah po i.v. injiciranju eksogenega histamina nastopi najverjetneje zaradi privzema v različne telesne celice ali pa zaradi metabolizma. V celokupni krvi podgane se je koncentracija teletmetilhistamina pet minut po injiciranju eksogenega histamina močno povišala, s kontrolne koncentracije 8,3 ng/ml na 20 ng/ml (Irman Florjanc in Erjavec, 1992). Leta 2002 so enak vzorec farmakokinetike histamina pokazali tudi na mački (Irman Florjanc, 2002).

Raziskave razgradnje histamina v tkivih mačke so pokazale, da je po aplikaciji histamina $t_{1/2}$ letega zelo različen od tkiva do tkiva. Tako znaša $t_{1/2}$ v podčeljustni žlezi 95,9 min, v parotidni žlezi 36,1 min, v želodcu 39,5 min, v ščitnici 28,3 min, v jetrih 23,7 min in v ledvici 36,4 min (Erjavec in Irman Florjanc, 1986). Vsa tkiva so dobro prekrvljena, zato razlike v $t_{1/2}$ najverjetneje nastopijo zaradi različnih vsebnosti encimov za razgradnjo histamina.

2.1.7 Histaminski receptorji

Histamin je lokalni hormon (avtakoid), ki deluje parakrino. Svoje učinke izzove z vezavo na receptorje, ki se nahajajo na membranah različnih celic, v katerih pride do različnih reakcij. Novejše raziskave kažejo, da imajo nekatere celice specifična vezavna mesta za histamin na jedru in citoplazemskih organelih, zato predpostavljajo tudi vezavo in delovanje histamina v sami celici.

Doslej so odkrili 4 podtipe receptorjev za histamin (H1, H2, H3 in H4). Receptorji za histamin so z G-proteinom sklopljeni receptorji (GPCR – ang. G-protein-coupled receptors) s sedmimi transmembranskimi domenami. Aktivacija receptorjev za histamin in posledična aktivacija G-proteina vodi v kaskado znotrajceličnih reakcij in fizioloških ter patoloških odgovorov.

Receptorji H1 se nahajajo v možganih (zlasti hipotalamus), v placenti, v pljučih, v srcu, v skeletnih mišicah, v ledvicah, v sredici nadledvične žleze, na endotelijskih celicah, na limfocitih ter v gladkih mišicah želodca, črevesa, srčnih žil in dihalne poti. Vezava histamina na receptor H1 preko proteina $G_{q/11}$ aktivira encim fosfolipaza C (PLC) in preko PLC intracelularno obveščevalno pot inozitol-1,4,5-trifosfata (IP_3) ter mobilizacijo Ca^{2+} , ki lahko naprej aktivirata protein kinazo C, kalmodulin in fosfolipazo A2. Te kaskade specifičnih znotrajceličnih reakcij pripeljejo do različnih bioloških odzivov, kot so krčenje gladkih mišic v črevesu in maternici, oženje dihalnih poti, povišanje frekvence proženja nevronskega akcijskega potenciala, spremembe v mikrocirkulaciji (razširitev arteriol, oženje venul), ločitev celičnih povezav v endotelu in povečanje prepustnosti kapilar, stimulacija sproščanja hormonov in ojačanje odziva limfocitov.

Receptorje H2 najdemo v steni žil, srčni mišici, na parietalnih celicah želodčne sluznice, v glomerulih, v centralnem živčnem sistemu, na nevtrofilcih, bazofilcih, mastocitih, limfocitih in v gladkih mišicah dihalne poti, žil in maternice. Primarni učinek delovanja agonistov na receptorje H2 je interakcija z G_s proteinom, aktivacija adenilat ciklaze in posledično zvišanje znotrajcelične koncentracije cAMP (ciklični adenozinmonofosfat), kar izzove biološki odgovor. Aktivacija H2 receptorjev lahko povzroči povečano izločanje želodčne kisline, relaksacijo gladkih mišic (vazodilatacija), povečano krčenje srčne mišice, inhibicijo delovanja limfocitov, znižanje frekvence proženja nevronskega akcijskega potenciala, hiperpolarizacijo oz. olajšanje prenosa signala v centralnem živčevju, uravnavanje presnove maščob, povratno zaviranje sproščanja histamina iz bazofilcev in inhibicijo kemotakse nevtrofilcev ter sproščanja encimov. Zanimivo je, da so odkrili, da so mutacije H2 receptorjev povezane s shizofrenijo. Med zdravila za inhibicijo izločanja želodčne kisline spadajo tudi antagonisti H2 receptorjev.

Receptorji H3 se nahajajo v centralnem živčnem sistemu (bazalni gangliji, hipokampus, možganska skorja), aksonih avtonomnega živčevja, ki oživčuje gladke mišice dihalne poti, želodca, črevesa in žil, ter na endotelijskih celicah. Ti receptorji so sklopljeni z proteinom $G_{i/o}$, ki inhibira adenilat ciklazo in tvorbo cAMP. V osrednjem živčevju se H3 receptorji nahajajo kot avtoreceptorji na presinaptični membrani histaminergičnih nevronov (Lovenberg in sod., 1999), kjer preko zaprtja kalcijevih kanalčkov povratno uravnavajo sproščanje histamina kot živčnega prenašalca v sinaptično špranjo in uravnavajo sintezo histamina (Arrang in sod., 1983). H3 receptorji se kot heteroreceptorji nahajajo tudi na aksonih holineričnih, dopaminergičnih, noradreneričnih, GABAergičnih, glutamatergičnih in serotonergičnih živčnih celic osrednjega in predvsem perifernega živčevja, kjer povratno zavirajo izločanje neurotransmitorjev prav tako preko zapiranja kalcijevih kanalčkov.

Receptorje H4 so odkrili nazadnje (Nyugen in sod., 2001) in so predmet intenzivnih raziskav. Doslej so jih našli v kostnem mozgu, debelem črevesu, jetrih, pljučih, tankem črevesu, vranici, timusu, mandljih, sapnici, največ pa jih je na celicah z izvorom v kostnem mozgu (levkociti in mastociti). Pri človeku za razliko od miši H4 receptorjev v centralnem živčevju niso našli. Tako kot H3 receptor tudi H4 receptor sproži kaskado reakcij preko $G_{i/o}$ na znižanje koncentracije cAMP, s tem da v nekaterih celicah poleg tega mobilizira znotrajcelične zaloge Ca^{2+} . Receptor H4 povzroča kemotakso levkocitov in mastocitov brez degranulacije (Hofstra in sod., 2003). V hematopoetskih celicah imajo najverjetneje regulatorno vlogo pri sintezi histamina. Nekatere raziskave kažejo, da bi lahko bili H4 receptorji novo mesto delovanja zdravil proti astmi in alergijam.

2.1.8 Farmakološki učinki histamina

Histamin sodeluje pri številnih patofizioloških procesih. Ključno vlogo ima v zgodnji fazi akutnega vnetja in pri imunskih preobčutljivostih tipa ena, kot so alergična astma, seneni nahod in koprivnica. Zvišana raven histamina v telesnih tekočinah povzroča značilne spremembe (anafilaktični šok), ki segajo od kožnih reakcij (rdečica, koprivnice, srbečica) in sistemskih sprememb (povečano izločanje želodčnega soka, zvišanje frekvence bitja srca z nevarnostjo fibrilacije prekatov, padec arterijskega krvnega tlaka) do smrti zaradi

zastaja srca (Horvat, 1998). Histamin zniža prag za proženje nociceptivnih živčnih končičev, kar povzroča srbenje in boleče zbadanje. Zvišane ravni histamina beležijo pri mastocitozi (povečana proliferacija mastocitov), histidinemiji, pravi policitemiji, kroničnih mieloničnih levkemijah (povečana količina bazofilcev) in želodčnih rakavih tumorjih.

Novejše razskave dajejo vse večjo težo histaminu kot živčnemu prenašalcu. V centralnem živčevju histamin sintetizira strogo omejena populacija nevronov v bazalnih ganglijah in posteriornem delu hipotalamusa (visoka koncentracija H1 receptorjev), ki je vpleten v številne funkcije možganov (spanje/budnost, izločanje hormonov, kardiovaskularna kontrola, termoregulacija, vnos hrane, nastanek spominov idr.). Skozi receptorje H1 histamin povečuje budnost in inhibira apetit. Najverjetneje histaminergični nevroni sodelujejo tudi pri regulaciji pitja, telesne temperature, izločanju antidiuretičnega hormona, pri kontroli krvnega tlaka in zaznavanju bolečine. Pri miših, ki so jim onеспособili gen za H1 receptor, so opazili povečano agresivnost, probleme z lokomocijo in druge nevrološke simptome (Simons, 2003). Učinke histamina v centralnem živčevju posredujejo tudi H3 avtoreceptorji.

Odkrili so, da je histamin kot parakrini signal vpleten tudi pri decidualizaciji endometrija in implantaciji embrija (Noskova in sod., 2006). V ščitnici podgane hormon TSH iz ščitničnih mastocitov sprosti histamin, ki znotraj ščitnice stimulira večjo prepustnost žil in hitrost pretoka krvi skozi (Melander in sod., 1975).

2.2 FARMAKOLOŠKO DELOVANJE ANTIDEPRESIVOV

Farmakološko mesto delovanja antidepresivov je sinaptična špranja, zato so na podlagi teh učinkov predlagali monoaminsko teorijo depresije (Schildkraut, 1965). Antidepresivi zvišajo raven neurotransmitorjev v sinaptičnem prostoru in sicer tako da:

1. zavrejo njihovo razgradnjo (npr. inhibitorji monoaminske oksidaze - IMAO);
2. zavrejo njihov ponovni privzem (citalopram inhibira ponovni privzem serotonina);
3. spremenijo občutljivost in gostoto presinaptičnih in posinaptičnih receptorjev ali pa
4. agonistično delujejo skupaj s posameznimi amini (Frazer, 1997).

Obstaja več razdelitev antidepresivov, v farmakologiji pa je najbolj uporabljana delitev glede na farmakološki način delovanja, in sicer na:

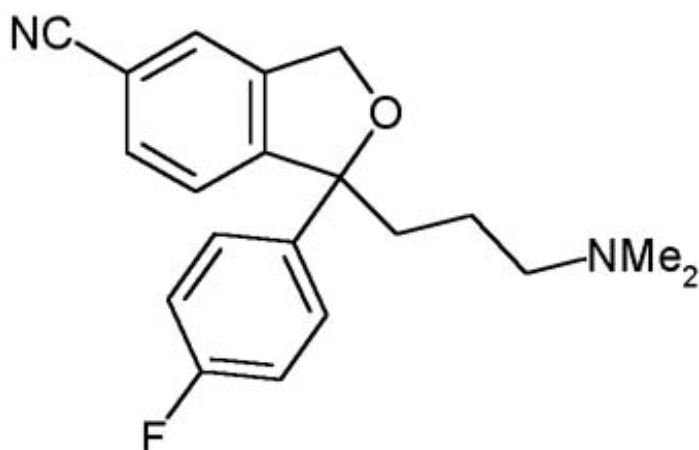
1. triciklične antidepresive (ang. tricyclic antidepressants - TCA);
2. selektivne zaviralce ponovnega privzema serotonina (ang. selective serotonin reuptake inhibitors - SSRIs; mednje sodi tudi citalopram);
3. inhibitorje monoaminske oksidaze – IMAO;
4. ostale antidepresive (Rang in dr., 1999).

Pri bolnikih, ki jemljejo antidepresive se prve izboljšave kliničnega stanja pokažejo po 2 - 4 tednih. Razlage za ta časovni zamik še ni, domnevajo pa, da je vzrok za zakasnen učinek antidepresivov v dolgotrajnem prilagajanju pre- in postsinaptičnih receptorskih molekul na spremenjene ravni nevrottransmitorjev (»uravnavanje navzdol« α_2 in β adrenergičnih receptorjev ter serotoninergičnih receptorjev 5-HT₂). Drugi farmakokinetični učinki se lahko pojavijo hitro, kot npr. vpliv na farmakokinetiko histamina (Irman Florjanc in Stanovnik, 1998; Rajtar 2004).

2.3 CITALOPRAM

2.3.1 Kemične lastnosti citaloprama

Citalopram (Slika 2.1) je antidepresiv z relativno molekulsko maso 324,40. Njegovo kemijsko ime je 1-[3-(dimetilamino)propil]-1-(4-fluorofenil)-1,3-dihidroizobenzofuran-5-karbonitril, empirična formula pa C₂₀H₂₁N₂O. Citalopram je amfifilna snov. Je lipidotopen in zato zlahka prehaja celično membrano. Po strukturi ni soroden z drugimi SSRI, TCA ali drugimi antidepresivi.



Slika 2.1: Strukturna formula citaloprama. (Me – metilna skupina)

2.3.2 Delovanje citaloprama

Kot že omenjeno je citalopram antidepressiv in spada v skupino selektivni zaviralci ponovnega privzema serotonina (SSRI). Serotonin je nevrottransmitor, ki se ob depolarizaciji membrane aksona v centralnem živčevju sprosti v sinaptično špranjo, z difuzijo pride do receptorja na membrani dendrita postsinaptičnega nevrona in do receptorja na presinaptični membrani (avtoceptor) lastnega nevrona in se privzame nazaj v celico. SSRI blokirajo privzem serotonina v presinaptični živčni končič z vezavo na serotoninski prenašalec, ki je transmembranski protein in ima 12 transmembranskih domen z N-glikoziliranim delom, ki je pomemben za vezavo serotonina. Ker zaradi blokade serotoninskih transporterjev koncentracija serotonina v sinaptični špranji naraste, pride do povečane vezave serotonina na serotoninske receptorje na postsinaptični membrani. Serotonin v organizmu sodeluje pri termoregulaciji, vazomotoričnem odgovoru, hipertoniji, spolnem vedenju, spanju in agregaciji trombocitov.

Citalopram v prvi vrsti uporabljajo za zdravljenje simptomov depresije, predpisujejo pa ga tudi za druga bolezenska duševna stanja. Terapevtska doza za človeka je 20 do 60 mg/dan. Učinke citaloprama pripisujejo selektivni inhibiciji ponovnega privzema serotonina v centralnem živčnem sistemu. In vitro raziskave so pokazale, da je močan SSRI in da ima zelo šibek učinek na ponovni privzem noradrenalina in dopamina. Prav tako nima omembe

vredne afinitete do adrenergičnih, noradrenergičnih, holinergičnih, GABA-nergičnih, dopaminergičnih, histaminergičnih in serotonergičnih receptorjev (Baumann, 1996). Ne inhibira MAO.

2.3.3 Vpliv citaloprama na farmakokinetiko eksogenega histamina

S poskusi *in vivo* so pokazali, da pri podganah tretiranih s citalopramom (1 mg/kg) 1 uro pred injekcijo histamina (10 µg/kg) porast koncentracije histamina v plazmi po injekciji ni opazen. Če so podgane tretirali s citalopramom (1 mg/kg) 15 minut pred injekcijo histamina (10 µg/kg), je bil v plazmi po dveh minutah opazen porast koncentracije histamina ($15,0 \pm 2,3$ ng/ml), kar pa je še vedno skoraj za polovico manjši porast kot pri podganah, ki so dobile samo histamin ($27,1 \pm 4,9$ ng/ml) (Irman Florjanc in sod., 2004).

Raziskave vpliva antidepresivov (amitriptilin – TCA, sertralin – SSRI) na privzem eksogenega histamina *in vitro* so pokazale, da oba antidepresiva povečata privzem eksogenega histamina v krvničke mačke. Dokazali so tudi, da je učinek sertralina, večji od učinka amitriptilina (Rajtar, 2004).

Citalopram ima pri mački močan vpliv na histaminski sistem. Tretiranje s citalopramom je povezano s spremembami bazalne ravni endogenega histamina v plazmi ter preprečitvijo porasta prostega histamina v plazmi po aplikaciji eksogenega histamina. Sklepajo, da so učinki odvisni od odmerka (Ferjan & Erjavec, 1996) in verjetno tudi od časa, ki je pretekel od aplikacije histamina do odvzema vzorca (Irman Florjanc in sod., 2004). Citalopram skoraj nima učinka na histaminergične receptorje, vendar bi lahko privzem histamina v krvne celice vsaj deloma doprinesel k protivnetnim učinkom antidepresivov.

Poskusi s citalopramom *in vitro* na izolirani krvi mačke so le v manjši meri v skladu s poskusi *in vivo*. Če so bili vzorci krvi *in vitro* inkubirani samo s citalopramom, so rezultati v vzorcih plazme kazali na tendenco k zniževanju koncentracij endogenega histamina, medtem ko pri poskusih s citalopramom *in vivo* ni prišlo do sprememb bazalnega nivoja histamina v plazmi. Pri vzorcih, ki so bili *in vitro* poleg citaloprama inkubirani tudi z dodatkom histamina, so meritve pokazale porast koncentracije histamina v plazmi, čeprav so v plazmi živali tretiranih

s citalopramom odkrili inhibicijo porasta histamina po njegovi intravenski injekciji. Za navidezna nasprotja med poskusi *in vitro* ter poskusi *in vivo* je možnih več razlag, med njimi tudi ta, da v učinke antidepresivov na histaminski sistem niso vključeni le elementi v krvi temveč tudi ožilje in druga tkiva (Arko, 2004).

2.3.4 Učinek citaloprama na celične membrane

Nekatera zdravila, med njimi tudi nekateri antidepresivi, spreminjajo fluidnost membrane. S spremembo fluidnosti se spremeni tudi permeabilnost membrane, kar bi lahko vplivalo na prehajanje histamina v celice.

Celična membrana eritrocitov je heterogena, sestavljena iz 3 področij (domen) z različno ureditvijo fosfolipidnih verig in različno dinamiko gibanja molekul. Ta dva parametra sta značilna za posamezne domene in določata njihovo fluidnost. Na eritrocitih ločimo najbolj urejeno domeno, vmesno domeno in najmanj urejeno domeno. Meje je težko določiti, saj so prehodi med domenami zvezni. Raziskave z elektronsko paramagnetno resonanco so pokazale, da se delež najmanj urejene domene v membrani eritrocitov mačke pod vplivom citaloprama poveča na račun ostalih dveh komponent. Poleg tega so rezultati pokazali, da se v povprečju molekule v membrani po delovanju zdravila gibljejo hitreje. Torej pod vplivom citaloprama v membrani pride do prerazporeditve membranskih komponent tako, da se poveča fluidnost membrane in s tem tudi njena permeabilnost (Arko, 2004).

3 METODE DELA

3.1 MATERIAL

3.1.1 Uporabljeni pribor, kemikalije in učinkovine

Pribor: operacijska deska, elastike, steklovina (čaše, buče, epruvete), plastični material (epruvete, nastavki za pipete različnih volumnov), pipete, šest-kanalska pipeta, kapalke, drobni kirurški pribor, plastične kanile, brizgalke, injekcijske igle.

Kemikalije: bidestilirana voda, fiziološka raztopina (0·9% NaCl), 1 M in 5 M natrijev hidroksid (NaOH), 0·1 M in 3 M klorovodikova kislina (HCl), 0·4 M perklorna kislina (HClO₄), n-butanol, n-heptan, natrijev klorid (NaCl), metanol, orto-ftalaldehid (Sigma, St. Louis, ZDA; ang. orto-phthalaldehyde - OPT; 0·5% raztopina v metanolu).

Proizvajalec vseh kemikalij za raztopine, razen OPT, n-butanola, n-heptana in metanola je Merck.

Učinkovine: fiziološka raztopina (NaCl; 0·9%), uretan (Sigma, St. Louis, ZDA; 20% raztopina v fiziološki raztopini), heparin (ampule 25.000 i.e./5ml, Krka, Novo mesto), histamin (Sigma, St. Louis, ZDA) (iz osnovne raztopine 1 mg/ml smo pripravili nižje koncentracije v 0·1 M HCl: 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, 100 ng/ml), antidepresiv citalopram (Cipramil[®], Krka, Novo mesto; ampule 20 mg/0·5 ml; raztopina citaloprama 0·4 µg/ml v fiziološki raztopini).

3.1.2 Biološki material

Pri poskusih smo uporabili 9 odraslih samcev "Wistar" podgane.

3.2 IZVEDBA *IN VIVO* POSKUSA

Glede na to, s čim so bile tretirane med poskusom, smo živali razdelili v 3 skupine po 3 podgane:

1. kontrolne podgane (1. skupina);
2. podgane tretirane s histaminom (125 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (2. skupina) ter
3. podgane tretirane s citalopramom (1 mg/kg) in histaminom (125 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (3. skupina).

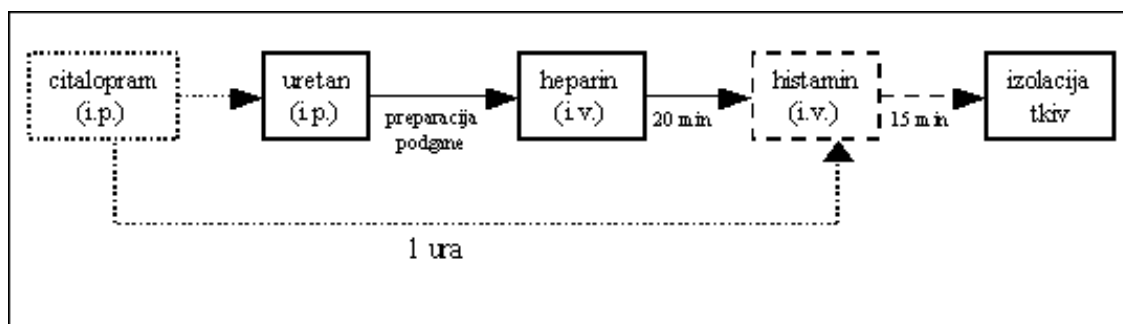
Za namen tega diplomskega dela smo morali poskus izvesti *in vivo*, potem izolirati tkiva in jih nato naprej analizirati. Bil sem prisoten skozi cel poskus, vendar sem postopek samostojno izpeljal od izolacije tkiv naprej. Vsi poskusi so bili izvedeni med 9. in 12. uro.

3.2.1 Preparacija podgane

Podganam smo pred preparacijo intraperitonealno (i.p.) vbrizgali uretan (anestetik). Ko so podgane zaspale, smo jim preparirali žili (leva vratna vena in desna karotidna arterija) in jim intravensko (i.v.) v levo vratno veno vbrizgali heparin (antikoagulant). 20 minut po dodatku heparina smo podgane iz kontrolne skupine pustili, da so izkrvavele skozi kanilo, vstavljeno v desno karotidno arterijo, in nato čim hitreje izolirali tkiva.

Podganam iz 2. in 3. skupine smo 20 min po dodatku heparina i.v. vbrizgali histamin (125 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in jih izkrvaveli 15 min po dodatku histamina.

Podganam iz tretje skupine smo 1 uro pred dodatkom histamina i.p. vbrizgali citalopram (1 mg/kg).



Slika 3.1: Shema poskusa. (neprekinjena črta) del poskusa pri vseh skupinah podgan. (manj črtkana črta) del poskusa izveden le pri 2. in 3. skupini podgan. (močno črtkana črta) del poskusa izveden samo pri 3. skupini podgan.

3.2.2 Izolacija tkiv

Iz vsake podgane smo izolirali 6 dobro prekrvljenih tkiv:

1. aorto;
2. obe podjezični slinavki;
3. pljuča (nekaj tkiva iz leve in nekaj iz desne polovice pljuč);
4. srce (ventrikel);
5. jetra (nekaj tkiva z vsakega režnja);
6. ledvice (polovico leve in polovico desne ledvice).

Pri eni podgani iz vsake skupine smo izolirali tudi sapnico, saj je to eno izmed glavnih mest delovanja histamina (bronhokonstriktorski učinek).

Ko smo tkivo izolirali iz živali, smo ga sprali v fiziološki raztopini in nato rahlo osušili na papirnati brisači. V epruvete smo že pred preparacijo pripravili po 1 ml (za aorto 200 μ l) 0,4 M HClO₄ (denaturator proteinov) in jih stehali. Tkiva smo na drobno narezali in koščke dali v pripravljene plastične epruvete. Ko smo stehali epruvete in izračunali maso tkiv, smo dodali toliko 0,4 M HClO₄, da je bilo razmerje med maso tkiva in volumnom 0,4 M HClO₄ 1:7 (mg: μ l). Aortam smo zaradi majhne mase dodali toliko 0,4 M HClO₄, da je bilo razmerje med maso tkiva in volumnom 0,4 M HClO₄ 1:11. Faktor redčenja je bil torej 7 ali 11. Izolirana tkiva smo nato do nadaljnje obdelave zamrznili na -70°C.

3.3 ANALIZA VZORCEV

3.3.1 Homogenizacija izoliranih tkiv

Ko smo tkiva odtalili, smo jih homogenizirali pri 24.000 vrtljajih noža. Po vsaki homogenizaciji smo homogenizacijski nož sprali z dvakratnim volumnom (masa:volumen) 0,4 M HClO₄. Celokupni faktor redčenja je bil torej pri aortah 13, pri ostalih tkivih pa 9. Homogenate smo nato zamrznili na -25°C, kjer so zmrzovali počasneje in so lahko kristali poškodovali še morebitne ohranjene celične membrane.

3.3.2 Ekstrakcija z organskimi topili

Pred ekstrakcijo smo homogenate centrifugirali 25 minut pri 3200 obratih. Nato smo odlili supernatante. Centrifugate smo zavrgli.

V ekstrakcijo smo vzeli po 2 ml posameznega supernatanta. Če je bilo kakega vzorca manj, smo do dveh mililitrov dodali 0,4 M HClO₄. V ekstrakcijo smo poleg supernatantov vzeli tudi 2 ml 0,4 M HClO₄ (notranji "blank") in notranje standarde histamina (10 ng, 50 ng, 100 ng, 150 ng in 200 ng), ki smo jih pripravili iz založnih raztopin in dopolnili do 2 ml z 0,4 M HClO₄. Vzorcem smo nato dodali 0,7 g NaCl, 1,25 ml 5 M NaOH in 3 ml n-butanola. Vse skupaj smo nato 10 min stresali in 10 min centrifugirali pri 1500 obratih. V nove epruvete smo nato prenesli 2,5 ml butanola (iz zgornje, butanolne, faze). Temu smo dodali 2,5 ml heptana in 500 µl 0,1 M HCl. Zatem smo zopet 10 min stresali in 10 min centrifugirali pri 1500 obratih. Po centrifugiranju smo zgornjo (organsko) plast odsesali. Spodnja vodna faza (0,1 M HCl), v kateri je bil histamin, pa je šla v nadaljnjo obdelavo.

3.3.3 Kondenzacija in spektrofotometrično določanje koncentracije histamina

Histamin ne absorbira in ne emitira svetlobe v spektru, ki bi ga lahko uporabili za spektrofotometrično analizo. Histamin smo zato kondenzirali z OPT, pri čemer nastane

produkt, ki fluorescira (seva fluorescentno svetlobo), če ga ekscitiramo s svetlobo primerne valovne dolžine (Shore in sod., 1959).

Pred kondenzacijo smo izmerili volumne vzorcev iz ekstrakcije. Po 500 μ l smo jih odpipetirali v nov set epruвет in pri tem pazili, da nismo zraven zajeli tudi morebitnih ostankov organske faze iz ekstrakcije, kar bi motilo nadaljnje meritve. Vzorcem, ki jih je bilo manj kot 500 μ l, dodali 0,1 M HCl. Za kondenzacijo smo pripravili tudi 500 μ l 0,1 M HCl (zunanji "blank") in zunanje standarde histamina (10 ng, 20 ng, 30 ng, 40 ng, 50 ng in 60 ng), ki smo jih pripravili iz založnih raztopin in dopolnili do 500 μ l z 0,1 M HCl. Pripravili smo si 0,5% OPT iz 0,025 g OPT v 5 ml metanola.

Pripravljenim vzorcem smo dodali 100 μ l 1M NaOH, jim nato v enakih časovnih intervalih (5 sekund) dodali 50 μ l 0,5% OPT in premešali na krožnem mešalu. Po preteku 4 minut od prvega dodatka OPT smo v vzorce v enakih časovnih intervalih odpipetirali 50 μ l 3M HCl, znova premešali in nato takoj izmerili fluorescence na spektrofluorometru. Ekscitacijska valovna dolžina je bila 360 nm, intenziteto fluorescence pa smo merili pri emisijski valovni dolžini 450 nm. Florescenca zunanjega "blanka" je fluorescenca samih kemikalij, ki smo jih uporabili pri kondenzaciji.

3.4 OBDELAVA PODATKOV DOBLJENIH Z ANALIZO

Iz zunanjih standardov smo določili umeritveno krivuljo in izračunali naklon (faktor) le-te (1). Faktor kondenzacije je povprečje faktorjev zunanjih standardov.

Formula:
$$f = \frac{KONC_{ZST}}{(SFM_{ZST} - SFM_{ZBL})} \quad \dots(1)$$

f – faktor; $KONC_{ZST}$ – količina histamina v zunanjem standardu; SFM_{ZST} – intenziteta fluorescence zunanjega standarda; SFM_{ZBL} – intenziteta fluorescence zunanjega "blanka".

Iz notranjih standardov smo izračunali izkoristke ("recovery-je") za posamezno ekstrakcijo, ki nam povejo, kolikšen delež histamina se je skozi analizo ohranil (2). Izkoristek ekstrakcije (REC_{EKS}) je povprečje izkoristkov notranjih standardov.

$$\text{Formula: } REC = (SFM_{NST} - SFM_{NBL}) \cdot f \cdot \frac{3ml}{2,5ml} \cdot \frac{500\mu l}{V_{KONDS}} \cdot \frac{100}{KONC_{NST}} \quad \dots(2)$$

REC – izkoristek; SFM_{NST} – intenziteta fluorescence notranjega standarda; SFM_{NBL} – intenziteta fluorescence notranjega "blanka"; f – faktor; V_{KONDS} – volumen vzorca standarda, ki je šel v kondenzacijo; $KONC_{NST}$ – količina histamina v notranjem standardu.

Iz dobljenih meritev smo izračunali koncentracije histamina v tkivih (3). Koncentracije so podane kot masa histamina (μg) v gramu tkiva.

$$\text{Formula: } KONC_{HI} = (SFM_{VZ} - SFM_{NBL}) \cdot f \cdot \frac{2ml}{V_{EKS}} \cdot \frac{3ml}{2,5ml} \cdot \frac{500\mu l}{V_{KONDVZ}} \cdot \frac{100}{REC} \cdot F_{RED} \quad \dots(3)$$

$KONC_{HI}$ – koncentracija histamina v tkivu; SFM_{VZ} – intenziteta fluorescence vzorca; SFM_{NBL} – intenziteta fluorescence notranjega "blanka"; f – faktor; V_{EKS} – volumen vzorca, ki je šel v ekstrakcijo; V_{KOND} – volumen vzorca, ki je šel v kondenzacijo; REC_{EKS} – izkoristek ekstrakcije; F_{RED} – faktor redčenja pri izolaciji tkiva.

3.5 STATISTIČNO OVREDNOTENJE

V okviru posamezne skupine podgan smo poskuse ponovili trikrat.

Za obdelavo rezultatov smo uporabili program EXCEL in program SIGMA PLOT. Dobljene koncentracije histamina smo v rezultatih izrazili kot povprečno vrednost \pm standardno napako povprečja ($x \pm SEM$) iz treh statističnih enot. Skupine rezultatov smo med sabo primerjali s t-testom, ki temelji na Studentovi porazdelitvi, prilagojeni na majhne statistične vzorce. Za statistično značilno smo vzeli vrednost $p < 0,05$.

4 REZULTATI

4.1 PODATKI O ŽIVALIH

Kot že omenjeno so bile živali v poskusu odrasli samčki "Wistar" podgane, vendar pa so se predvsem zaradi različnih starosti ob preparaciji vseeno razlikovali v razvitosti.

Preglednica 4.1: Datumi kotitev, datumi preparacij, starosti, mase na dan preparacije in poskusi, v katerih smo uporabili posamezne podgane.

<i>št. podg.</i>	<i>datum kotitve</i>	<i>datum prep.</i>	<i>starost [dan]</i>	<i>masa [g]</i>	<i>poskus</i>
P1	4.7.2005	6.12.2005	155	310	kontrola
P2	9.8.2005	7.12.2005	120	330	histamin
P3	30.7.2005	8.12.2005	131	320	histamin in citalopram
P4	9.8.2005	12.12.2005	125	250	histamin
P5	20.6.2005	14.12.2005	177	330	kontrola
P6	20.6.2005	15.12.2005	178	340	histamin in citalopram
P7	9.8.2006	28.3.2006	231	380	kontrola
P8	9.8.2006	29.3.2006	232	420	histamin
P9	9.8.2006	30.3.2006	233	400	histamin in citalopram

4.2 VSEBNOSTI HISTAMINA V TKIVIH

Za vsa tkiva smo izračunali maso histamina [μg] v masni enoti tkiva [g] (koncentracija histamina v tkivu [$\mu\text{g/g}$]). Vsi rezultati so podani kot povprečna vrednost \pm SEM (standardna napaka povprečja).

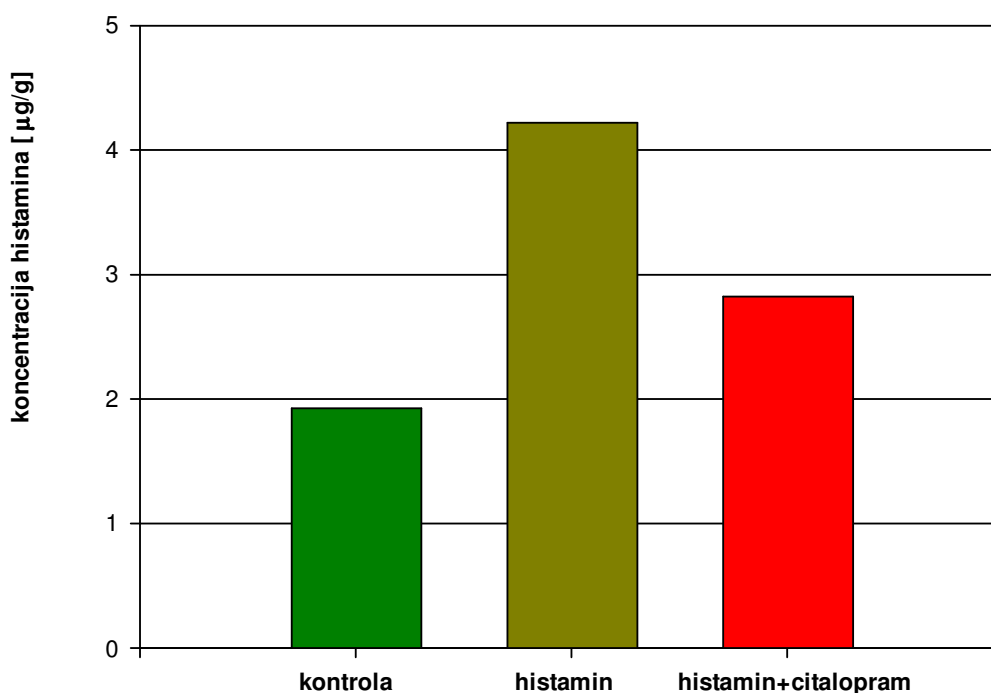
4.2.1 Aorta

Rezultati (Slika 4.1 in Tabela 4.2) prikazujejo koncentracijo histamina v aortah. Pri aortah je zaradi premajhne razredčitve po izolaciji tkiv uspelo samo 5 meritev, in sicer dve iz kontrolne skupine (1. skupina), ena iz skupine tretirane samo s histaminom (125 $\mu\text{g/kg}$) (2.

skupina) ter dve iz skupine tretirane s citalopramom (1 mg/kg) in histaminom (125 µg/kg) (3. skupina). Zaradi premajhnega števila rezultatov so rezultati podani samo kot povprečja. Vsebnost histamina pri kontrolnih aortah je 1,92 µg/g, pri 2. skupini 4,22 µg/g in pri 3. skupini 2,82 µg/g.

Tabela 4.2: Koncentracije histamina [µg/g] v aortah podgan iz kontrolne skupine (kontrola), v aorti podgane iz skupine tretirane s histaminom (125 µg/kg) (histamin) in v aortah podgan tretiranih s citalopramom (1 mg/kg) in histaminom (125 µg/kg) (histamin+citalopram).

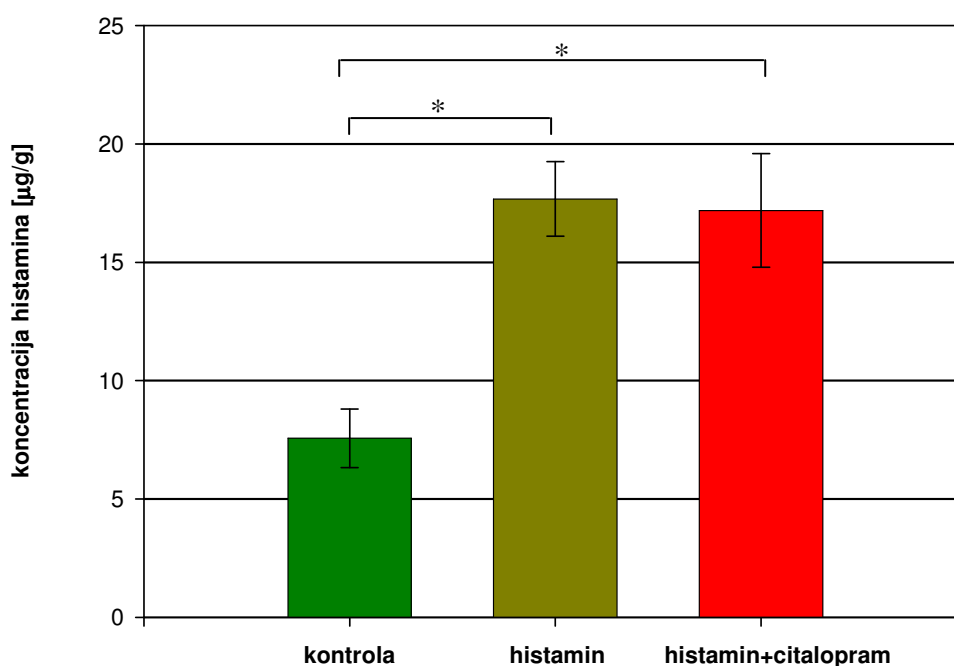
	kontrola		histamin		histamin+citalopram	
	P1	1,95	P8	4,22	P6	2,84
	P2	1,89			P9	2,80
POVPREČJE	1,92		4,22		2,82	



Slika 4.1: Koncentracije histamina v aortah podgan iz kontrolne skupine (kontrola), v aorti podgane iz skupine tretirane s histaminom (125 µg/kg) (histamin) in v aortah podgan tretiranih s citalopramom (1 mg/kg) in histaminom (125 µg/kg) (histamin+citalopram). (povprečna vrednost; kontrola, n = 2; histamin, n = 1; histamin+citalopram, n = 2)

4.2.2 Slinavka

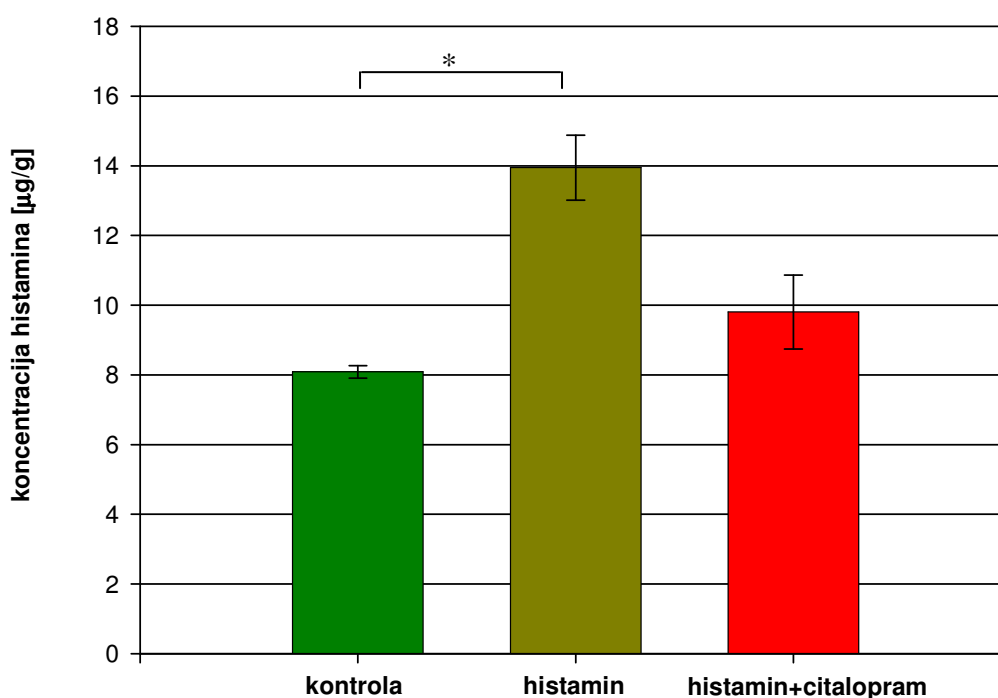
Koncentracije histamina v slinavki znašajo pri 1. skupini podgan $7,56 \pm 1,23 \mu\text{g/g}$, pri 2. skupini $17,67 \pm 1,57 \mu\text{g/g}$ in pri 3. skupini $17,19 \pm 2,40 \mu\text{g/g}$ (Slika 4.2). Izračunana vrednost p je manjša od 0,05 pri primerjavah kontrolne skupine z ostalima dvema (1. z 2. in 1. z 3.).



Slika 4.2: Koncentracije histamina v slinavkah podgan iz kontrolne skupine (kontrola), podgan iz skupine tretirane s histaminom ($125 \mu\text{g/kg}$) (histamin) in podgan tretirane s citalopramom (1 mg/kg) in histaminom ($125 \mu\text{g/kg}$) (histamin+citalopram). (povprečna vrednost \pm SEM; $n = 3$) * $p < 0,05$

4.2.3 Pljuča

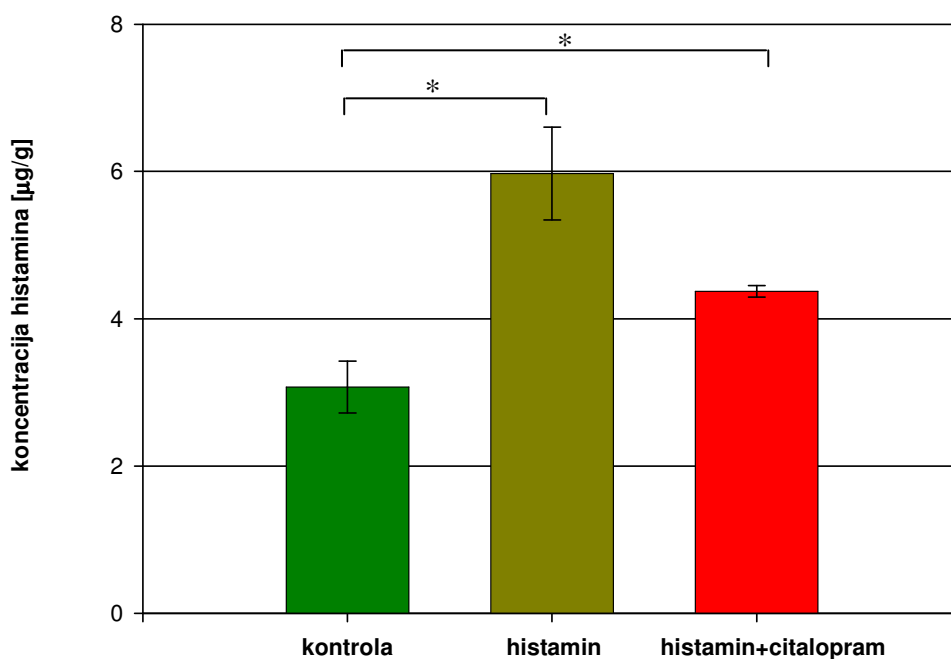
Koncentracije histamina v pljučih znašajo pri 1. skupini podgan $8,09 \pm 0,18 \mu\text{g/g}$, pri 2. skupini $13,95 \pm 0,93 \mu\text{g/g}$ in pri 3. skupini $9,80 \pm 1,06 \mu\text{g/g}$ (Slika 4.3). Izračunana vrednost p je manjša od 0,05 pri primerjavi kontrolne skupine z 2. skupino, pri primerjavi med 2. in 3. skupino je p 0,056.



Slika 4.3: Koncentracije histamina v pljučih podgan iz kontrolne skupine (kontrola), podgan iz skupine tretirane s histaminom ($125 \mu\text{g/kg}$) (histamin) in podgan tretirane s citalopramom (1 mg/kg) in histaminom ($125 \mu\text{g/kg}$) (histamin+citalopram). (povprečna vrednost \pm SEM; n = 3) *p < 0,05

4.2.4 Srce

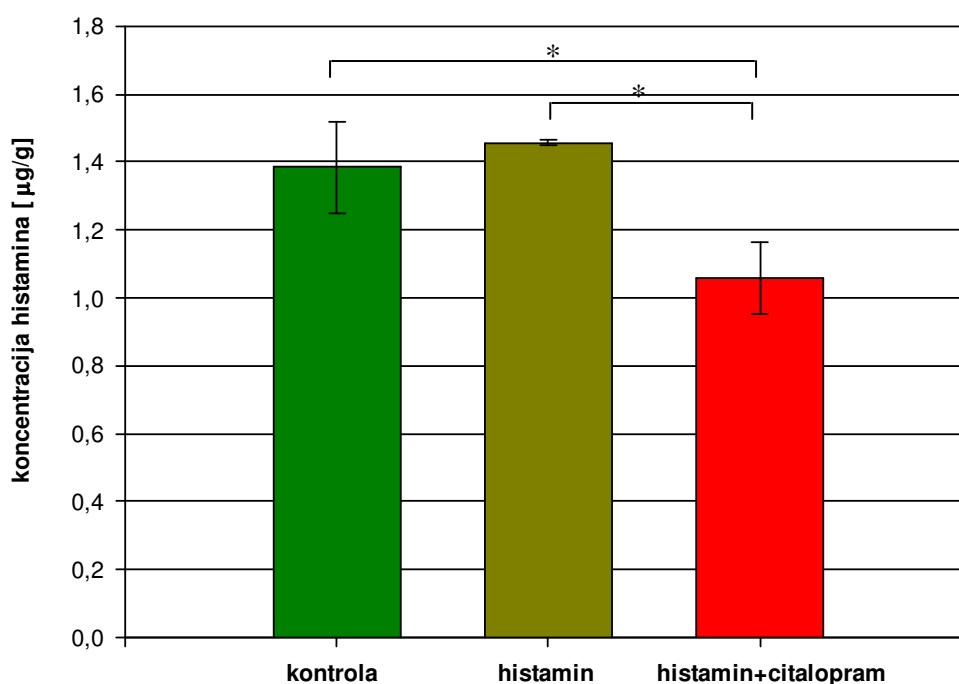
Koncentracija histamina v srcu (ventrikel) znaša pri kontrolni skupini podgan $3,07 \pm 0,35$ $\mu\text{g/g}$, pri skupini tretirani s histaminom $5,97 \pm 0,63$ $\mu\text{g/g}$ in pri skupini tretirani s citalopramom in histaminom $4,37 \pm 0,08$ $\mu\text{g/g}$ (Slika 4.4). Vrednost p je manjša od 0,05 pri primerjavah kontrolne skupine z ostalima dvema (1. z 2. in 1. z 3.), pri primerjavi med 2. in 3. skupino je vrednost p 0,06.



Slika 4.4: Koncentracije histamina v srcih (ventriklih) podgan iz kontrolne skupine (kontrola), podgan iz skupine tretirane s histaminom (125 $\mu\text{g/kg}$) (histamin) in podgan tretirane s citalopramom (1 mg/kg) in histaminom (125 $\mu\text{g/kg}$) (histamin+citalopram). (povprečna vrednost \pm SEM; n = 3) *p < 0,05

4.2.5 Jetra

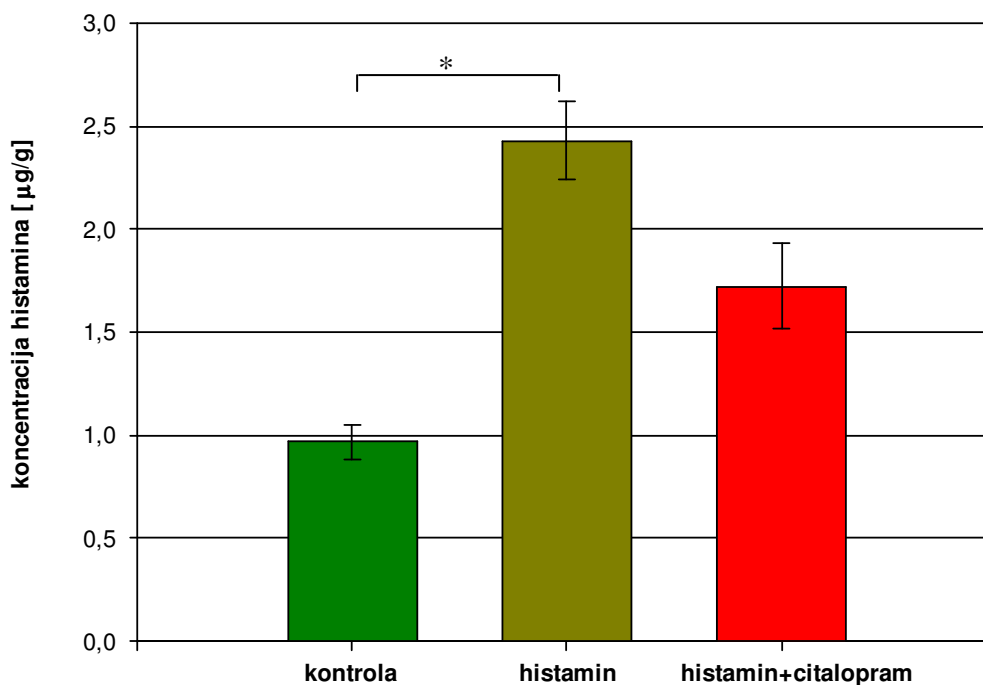
Koncentracija histamina v jetrih znaša pri kontrolni skupini podgan $1,39 \pm 0,13 \mu\text{g/g}$, pri skupini tretirani s histaminom $1,46 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$ in pri skupini tretirani s citalopramom in histaminom $1,06 \pm 0,10 \mu\text{g/g}$ (Slika 4.5). Vrednost p je manjša od 0,05 pri primerjavi kontrolne skupine s 3. skupino in 2. s 3. skupino.



Slika 4.5: Koncentracije histamina v jetrih podgan iz kontrolne skupine (kontrola), podgan iz skupine tretirane s histaminom ($125 \mu\text{g/kg}$) (histamin) in podgan tretirane s citalopramom (1 mg/kg) in histaminom ($125 \mu\text{g/kg}$) (histamin+citalopram). (povprečna vrednost \pm SEM; $n = 3$) * $p < 0,05$

4.2.6 Ledvice

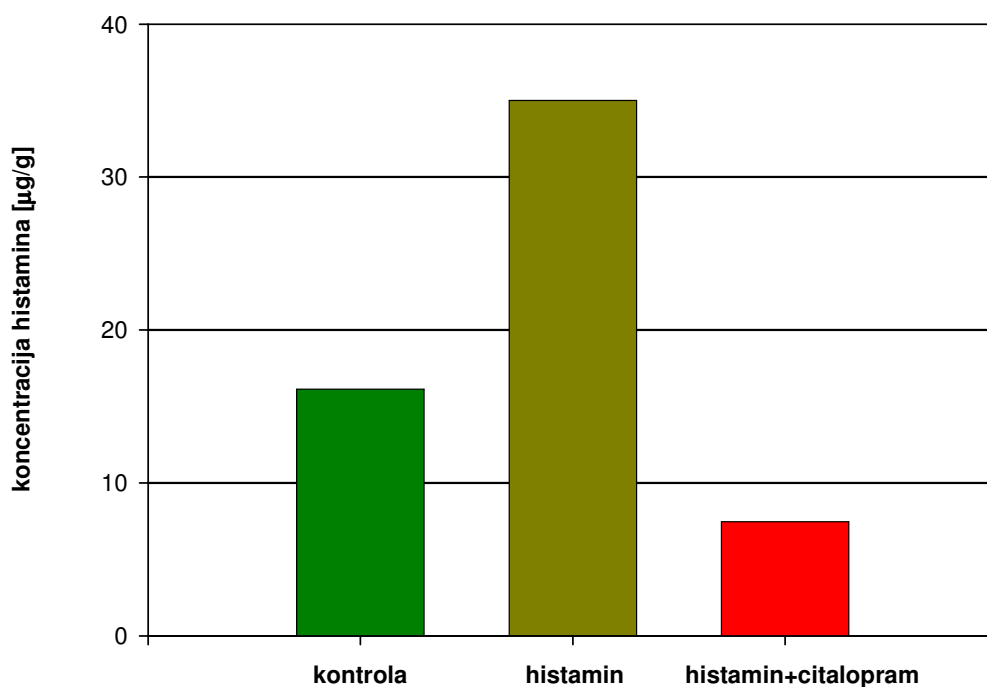
Koncentracija histamina v ledvicah znaša pri kontrolni skupini podgan $0,97 \pm 0,08 \mu\text{g/g}$, pri skupini tretirani s histaminom $2,43 \pm 0,19 \mu\text{g/g}$ in pri skupini tretirani s citalopramom in histaminom $1,72 \pm 0,20 \mu\text{g/g}$ (Slika 4.6). Vrednost p je manjša od 0,05 pri primerjavi kontrolne skupine z 2. skupino. Pri primerjavi med 1. in 3. skupino je vrednost p 0,058, pri primerjavi med 2. in 3. skupino pa 0,10.



Slika 4.6: Koncentracije histamina v ledvicah podgan iz kontrolne skupine (kontrola), podgan iz skupine tretirane s histaminom ($125 \mu\text{g/kg}$) (histamin) in podgan tretirane s citalopramom (1 mg/kg) in histaminom ($125 \mu\text{g/kg}$) (histamin+citalopram). (povprečna vrednost \pm SEM; $n = 3$) * $p < 0,05$

4.2.7 Sapnica

Zanimale pa so nas tudi orientacijske vsebnosti histamina v sapnicah pri različnih poskusih, zato smo pri eni podgani iz vsake skupine poleg drugih tkiv izolirali tudi sapnice. Vsebnost histamina v sapnici podgane iz kontrolne skupine znaša 16,12 $\mu\text{g/g}$, v sapnici podgane iz 2. skupine 35,02 $\mu\text{g/g}$ in v sapnici podgane iz 3. skupine 7,47 $\mu\text{g/g}$ (Slika 4.7).



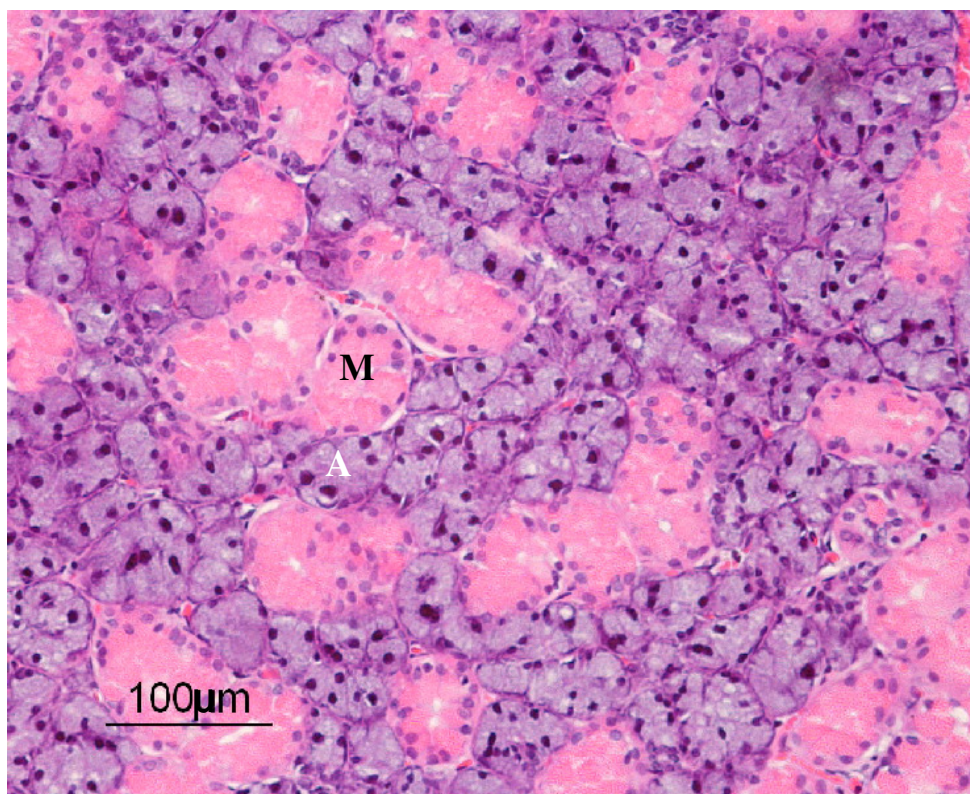
Slika 4.7: Koncentracije histamina v sapnicah podgane P7 iz kontrolne skupine (kontrola), podgane P8 iz skupine tretirane s histaminom (125 $\mu\text{g/kg}$) (histamin) in podgane P9 tretirane s citalopramom (1 mg/kg) in histaminom (125 $\mu\text{g/kg}$) (histamin+citalopram).

4.3 HISTOLOŠKE SPREMEMBE TKIV

Poleg vsebnosti histamina v različnih tkivih nas je zanimal tudi vpliv različnih poskusov *in vivo* na razlike v zgradbi tkiv med posameznimi skupinami živali. Zato smo poslali na histološki pregled slinavko in jetra podgane iz kontrolne skupine, podgane iz skupine tretirane s histaminom in podgane tretirane s citalopramom in histaminom.

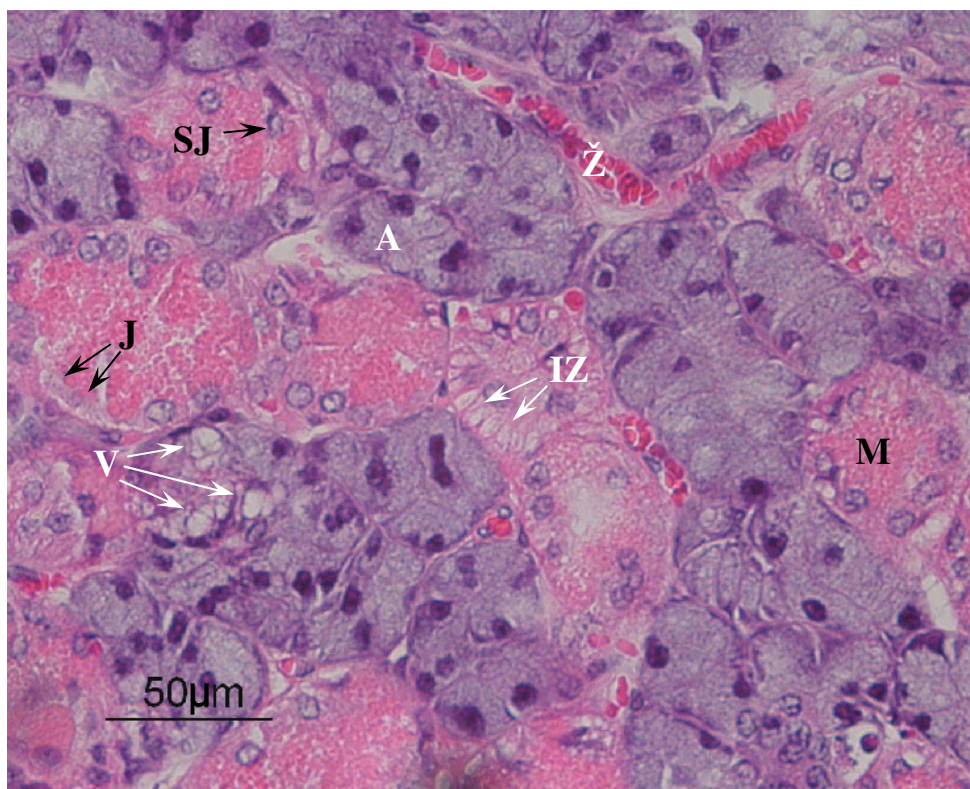
4.3.1 Slinavka

Tkivo slinavke podgane iz kontrolne skupine je intaktno, brez opaznih strukturnih posebnosti in sprememb (Slika 4.8).



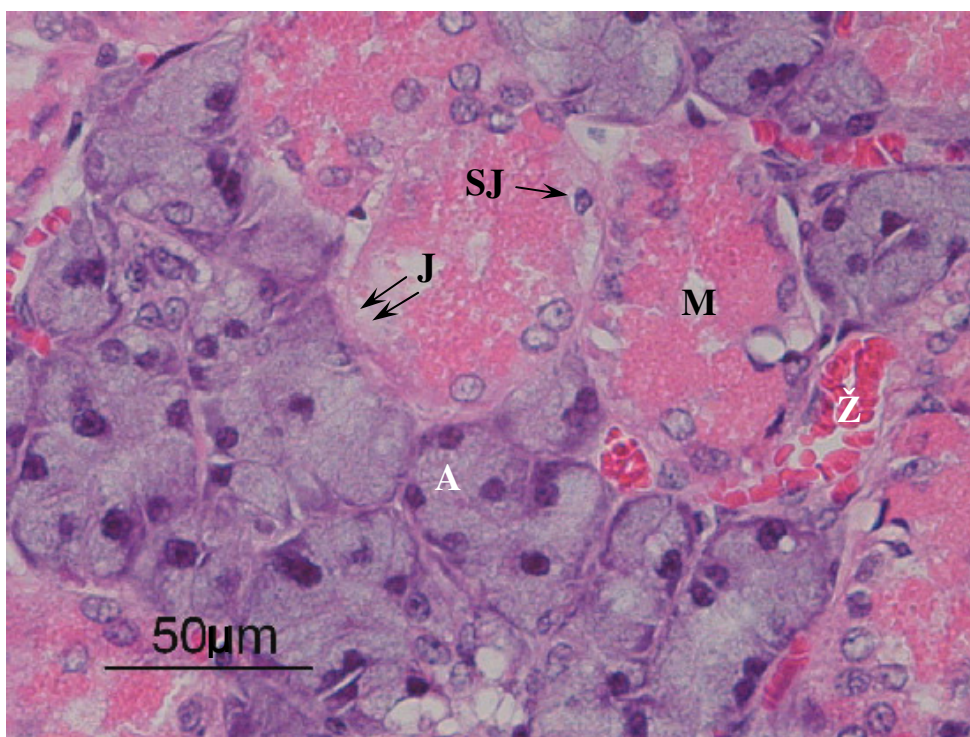
Slika 4.8: Histološki preparat slinavke podgane iz kontrolne skupine. Vidni so svetli mukozni tubuli (M) in številnejši albuminozni tubuli (A). (barvanje hematoksilin eozin – HE)

V tkivu slinavke podgane tretirane s histaminom (125 $\mu\text{g}/\text{kg}$) je bilo v pregledanem vzorcu število celic manjše. V primerjavi s podgano iz kontrolne skupine so celice izgubile zrnčavost in imajo skrčena jedra. Struktura mukoznih delov je rahla, citoplazma prazna (Slika 4.9). Ponekod na preparatu je bilo videti, kot da bi mukozne celice množično propadle. Vzrok bi lahko bila apoptoza. Slika je v dvakrat manjšem merilu, da se spremembe bolje vidijo.



Slika 4.9: Histološki preparat slinavke podgane tretirane s histaminom (125 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Mukozni tubul – M; albuminozni tubul – A; vakuolizirana citoplazma albuminoznih celic – V; izguba zrnčavosti mukoznih celic – IZ; izguba jeder mukoznih celic – J; pilnotično, skrčeno jedro mukozne celice – SJ; žila - Ž. (barvanje hematoksilin eozin – HE)

Čprav so ponekod še vedno vidne enake strukturne spremembe kot pri podgani, ki je dobila samo histamin, je tkivo slinavke podgane tretirane s citalopramom (1 mg/kg) in histaminom (125 $\mu\text{g}/\text{kg}$) zopet bolj podobno tkivu podgane iz kontrolne skupine. Citoplazme so ohranjene in tudi zrnčavost se lepo vidi (Slika 4.10).



Slika 4.10: Histološki preparat slinavke podgane tretirane s citalopramom (1 mg/kg) in histaminom (125 μg/kg). Mukozni tubul – M; albuminozni tubul – A; pilnotično, skrčeno jedro mukozne celice – SJ; izguba jeder mukoznih celic – J; žila - Ž. (barvanje hematoksilin eozin – HE)

4.3.2 Jetra

Pri kontrolni podgani je bilo jetrno tkivo intaktno.

Pri tkivu jeter podgane tretirane s histaminom (125 μg/g) je bilo opaziti simptome vnetja (vnetnice).

Tkivo slinavke podgane tretirane s citalopramom (1 mg/kg) in histaminom (125 μg/kg) kaže zelo majhne spremembe v primerjavi s kontrolo. Opaziti je bilo nekaj vnetnic, rahla pomnožitev žolčnih vodov in manjša vakuolizacija jedra.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Ker smo poskuse izvedli *in vivo*, smo morali zagotoviti čimbolj podobne razmere, kar se tiče samih poskusov in stanja živali. Fiziološka stanja živali in s tem odzivi na poskuse se tekom leta spreminjajo zaradi sprememb različnih okoljskih dejavnikov in seveda zaradi staranja živali. Kljub različnim starostim živali ob preparaciji in različnim datumom poskusov so koncentracije histamina v tkivih znotraj posameznih poskusnih skupin dokaj podobne in nobena vrednost bistveno ne izstopa. Ker so bile vse živali samčki, lahko izključimo tudi spolno razliko. Pri sapnici so vrednosti orientacijske, vendar so v diskusiji ravno tako omenjane, saj nam dajo vseeno nek vpogled na dogajanje s histaminom pri različnih poskusih.

Povišanje koncentracije histamina je pri primerjavi med kontrolno skupino in skupino podgan tretiranih s histaminom (125 µg/kg) prisotno pri vseh tkivih. Pri slinavki, pljučih, srcu in ledvicah je porast koncentracije histamina statistično značilen. Edino pri jetrih sta si koncentraciji histamina pri teh dveh skupinah podgan zelo podobni, kar bi lahko razložili z biotransformacijsko vlogo jeter v organizmu. Glede na to, da je v jetrih raziskanih tkiv $t_{1/2}$ histamina najmanjši (Erjavec in Irman Florjanc, 1986), je možen vzrok za tako majhno povišanje koncentracije histamina v njegovi hitri razgradnji.

Pri primerjavi tkiv skupine podgan tretiranih s histaminom (125 µg/kg) ter skupine podgan tretiranih s citalopramom (1 mg/kg) in histaminom (125 µg/kg) je pri večini tkiv opaziti tendenco k upadanju koncentracije histamina, če so bile živali tretirane s citalopramom. Statistično značilna ($p < 0,05$) je razlika samo pri jetrih. Pri pljučih, srcu in ledvicah je vrednost p 0,06. Pri slinavki spremembe ni bilo. Pri aorti in sapnici rezultati kažejo na velik upad koncentracije histamina pri živalih tretiranih s citalopramom, vendar je bilo živali premalo za statistično obdelavo. Pri sapnici in jetrih znaša koncentracija histamina pri živalih, ki so dobile citalopram, celo manj kot pri kontrolni skupini.

Če primerjamo kontrolno skupino in skupino podgan tretiranih s citalopramom (1 mg/kg) in histaminom (125 µg/kg), pri večini tkiv opazimo porast koncentracije histamina (aorta, slinavka, pljuča, srce in ledvice), pri jetrih in sapnici pa upad koncentracije histamina. Razlike v koncentracijah so statistično značilne pri slinavki, srcu in pri jetrih; pri pljučih in ledvici znaša vrednost $p < 0,06$.

Živali 2. in 3. skupine smo tretirali z dokaj visoko koncentracijo histamina (125 µg/kg). Možno je, da je eksogeni histamin pri poskusnih živalih povzročil motnje v delovanju kardiovaskularnega sistema in dihal, zato bi te motnje lahko vplivale na porazdelitev histamina. Če bi bila znatno motena preskrba s krvjo, bi to opazili že pri 2. skupini. Izključeno je, da bi te motnje vplivale na porazdelitev citaloprama, saj je bil apliciran 1 uro pred aplikacijo histamina. Prav tako citalopram ne vpliva na delovanje histaminskih receptorjev. Poskusa pri 2. in 3. skupini se razlikujeta samo v aplikaciji citaloprama pri 3. skupini. Če citalopram ne bi vplival na privzem histamina, bi bile vsebnosti histamina v tkivih 3. skupine podgan podobne tistim iz 2. skupine. Ker kažejo vsebnosti histamina večine tkiv 3. skupine podgan upad glede na vsebnosti histamina v tkivih 2. skupine, lahko trdimo, da citalopram vpliva na spremembe koncentracij histamina v izoliranih tkivih.

Raziskave vpliva antidepresivov (amitriptilin – TCA, sertralin – SSRI) na privzem eksogenega histamina *in vitro* so pokazale, da oba antidepresiva povečata privzem eksogenega histamina v krvničke mačke s tem, da je učinek sertralina večji od učinka amitriptilina (Rajtar, 2004). Doslej opravljene raziskave o vplivu antidepresiva citaloprama (spada med SSRI) na kinetiko in privzem eksogenega histamina v krvi so tako pri mački (Arko, 2004) kot pri podgani (Irman Florjanc in sod., 2004) pokazale, da je delovanje citaloprama povezano s spremembami bazalne ravni endogenega histamina v plazmi ter preprečitvijo porasta prostega histamina v plazmi po aplikaciji eksogenega histamina. Nadaljnje raziskave so pokazale, da citalopram tako spremeni značilnosti membrane eritrocitov pri mački, da postane bolj prepustna, zaradi česar se v celicah lahko poveča koncentracija histamina in se tako prepreči porast v plazmi (Arko, 2004).

Glede na rezultate poskusov na krvi bi pričakovali, da bodo koncentracije histamina v tkivih podgan tretiranih s citalopramom in histaminom bistveno višje kot v tkivih podgan tretiranih

samo s histaminom, saj naj bi citalopram povečal prepustnost membran in tako povzročil večji privzem histamina v tkiva. Vendar pa so naši rezultati v nasprotju s pričakovanji (delovno hipotezo), saj so pri večini tkiv 3. skupine koncentracije histamina v tkivih nižje kot pri 2. skupini, pri jetrih in sapnici pa celo nižje od kontrolnih koncentracij.

Glede na rezultate bi lahko sklepali, da citalopram zmanjša privzem eksogenega histamina v tkiva, vendar pri tem ne upoštevamo možnega vpliva antidepresiva na metabolizem eksogenega histamina. Drugi argument, ki zelo zmanjša verjetnost te razlage, so rezultati tistih tkiv 3. skupine, kjer smo izmerili nižje vsebnosti histamina kot pri kontrolni skupini (jetra in sapnica), kar bi pomenilo, da bi moral citalopram membrane narediti malodane neprepustne oz. manj prepustne kot pri kontrolni skupini in bi v celicah potekala samo intenzivna razgradnja histamina.

Delovno hipotezo smo postavili na podlagi raziskav delovanja citaloprama na membrane eritrocitov. Predpostavljali smo, da na plazmaleme celic v tkivih antidepresiv deluje podobno kot na membrane eritrocitov. Ena izmed možnih razlag za dobljene rezultate bi lahko bilo drugačno delovanje citaloprama na celice izoliranih tkiv zaradi drugačnih lastnosti membrane. Ta razlaga se zdi zelo malo verjetna. Membrane se v večini osnovnih gradnikov ujemajo, zelo raznoliki so samo membranski vključki (proteini, proteoglikani, glikoproteini idr.). Lahko bi pričakovali velike razlike v vplivu citaloprama na privzem histamina v posameznih tkivih, saj se tudi med tkivi s tako raznolikimi funkcijami plazmaleme zelo razlikujejo. Vendar pa je pri našem delu večina tkiv pokazala enako tendenco k zmanjšanju vsebnosti histamina.

Lahko sklepamo, da ima citalopram poleg povečanja prepustnosti membran najverjetneje še nek dodaten učinek. Poskusi *in vitro* pri podgani so pokazali, da antidepresivi (amitriptilin – TCA, sertralin – SSRI) vplivajo na sproščanje DAO iz tkiv pod vplivom heparina in lahko povečajo ali zmanjšajo aktivnost encimov za razgradno histamina v odvisnosti od koncentracije antidepresiva (Rajtar in Irman Florjanc, 2006). Zaradi ugotovljenega upada koncentracije histamina pri živalih tretiranih s citalopramom in histaminom v primerjavi z živalmi, ki so dobile samo histamin, sklepamo, da je najverjetneje prišlo do pospešene razgradnje histamina. Ta domneva se ujema z do sedaj opravljenimi raziskavami o vplivu

citaloprama na prepustnost membrane, razloži pa tudi pojav manjših koncentracij histamina v tkivih pri skupini tretirani s citalopramom in histaminom v primerjavi s skupino tretirano s histaminom in pri sapnici ter jetrih celo v primerjavi s kontrolno skupino.

Našo domnevo, da citalopram vpliva na privzem eksogenega histamina v tkiva, potrjujejo tudi histološke preiskave, ki so pokazale, da pri živali tretirani s histaminom v primerjavi s kontrolo nastopijo dobro vidne strukturne spremembe v tkivih. Glede na to, da se ti dve živali razlikujeta samo v aplikaciji histamina, so spremembe v tkivih rezultat delovanja histamina. V tkivih podgane tretirane s citalopramom in histaminom sta pregledani tkivi zopet bolj podobna tkivom kontrolne živali.

Da histamin izzove biološki odgovor, se mora vezati na receptorje, ki so na površini membran tarčnih celic. Histamin, ki je privzet v celice, torej ne more aktivirati receptorjev in izzvati fiziološkega odziva. Citalopram skoraj nima učinka na histaminske receptorje, vendar je njegov protivnetni učinek v tem, da gre preko bolj prepustne plazmaleme zaradi koncentracijskega gradienta več histamina v celice in ga je manj v medceličnini. Če bi citalopram zmanjšal prepustnost plazmalem celic slinavke in jeter, bi moralo biti v medceličnini veliko histamina in bi bili učinki na tkiva živali tretirane s citalopramom in histaminom podobni učinkom na tkiva živali tretirane le s histaminom. Histološke preiskave potrjujejo, da je eksogeni histamin pri tkivih živali 3. skupine zaradi predhodne aplikacije citaloprama iz medceličnine izginil in tako ni mogel povzročiti bioloških učinkov oz. je bil obseg le-teh veliko manjši kot pri živali iz 2. skupine.

Da bi lahko z večjo gotovostjo rekli, kaj se je dejansko zgodilo z eksogenim histaminom, bi morali poleg koncentracije samega histamina v tkivih spremljati tudi koncentracije njegovih metabolitov. Smiselno bi bilo tudi preveriti vpliv citaloprama na delovanje encimov za razgradnjo histamina, kar bi lahko storili z blokatorji obeh poti razgradnje histamina. Če bi se pokazalo, da bi bil porast pri podganah tretiranih s citalopramom in histaminom večji kot pri podganah tretiranih samo s histaminom, bi lahko dodatno preverili specifičnost citaloprama z blokatorjem specifičnim za eno izmed metabolnih poti.

5.2 SKLEPI

1. Citalopram vpliva na porazdelitev histamina v tkivih podgane.
2. Zelo verjetno ima citalopram poleg predhodno dokazanega vpliva na prepustnost membran še dodaten učinek na metabolizem histamina.

6 POVZETEK

Histamin je fiziološko aktivni biogeni amin in ima pomembno vlogo pri alergijskih reakcijah, uravnavanju izločanja želodčne kisline ter kot živčni prenašalec in tudi kot modulator izločanja ostalih živčnih prenašalcev. Ker novejša dognanja o depresivnih motnjah kažejo na pomembno vlogo histamina pri nastanku depresije, je poznavanje vpliva antidepressivov na farmakokinetiko histamina pomembno. Raziskave so pokazale, da antidepressivi lahko spremenijo farmakokinetiko histamina, med njimi tudi citalopram, ki se kot antidepressiv uporablja v humani medicini in po delovanju spada med selektivne zaviralce privzema serotonina. Poskusne živali (mačka, podgana), ki so pred intravensko injekcijo histamina dobile citalopram, po aplikaciji histamina niso pokazale porasta koncentracije histamina v plazmi, opazili pa so porast koncentracije histamina v celokupni krvi, kar kaže na večji privzem histamina v krvničke. Meritve z elektroparamagnetno resonanco so pokazale, da citalopram spremeni fluidnost membrane eritrocitov mačke, kar bi lahko vplivalo na privzem histamina v celice. Pri našem delu smo želeli preveriti vpliv citaloprama na porazdelitev apliciranega histamina v različnih tkivih podgane. Poskusne živali smo razdelili na 3 skupine: na kontrolne podgane, podgane tretirane s histaminom (intravensko, 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ter podgane tretirane najprej s citalopramom (intraperitonealno, 1 mg/kg) in po eni uri s histaminom (intravensko, 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Iz vseh živali smo izolirali 6 dobro prekrvljenih tkiv (aorta, slinavka - g. submandibularis, pljuča, srce, jetra in ledvice) ter pri eni podgani iz vsake skupine še sapnico. Vzorce smo nato homogenizirali, z ekstrakcijo z organskimi topili izolirali histamin in s spektrofotometrično metodo določili koncentracije histamina v tkivih. Naše meritve smo dopolnili tudi s histološkimi preiskavami vzorcev jeter in slinavk iz vseh poskusnih skupin. Pri vseh tkivih skupine tretirane s histaminom, razen pri jetrih, smo opazili močan porast koncentracije histamina v primerjavi s kontrolno skupino. Pri skupini tretirani s citalopramom in histaminom je v primerjavi s kontrolno skupino prišlo do porasta histamina pri vseh tkivih razen pri jetrih in sapnici. Koncentracije histamina v večini tkiv podgan tretiranih s citalopramom in histaminom so bile nižje kot pri skupini, ki je dobila samo histamin. Naši rezultati so pokazali, da citalopram vpliva na farmakokinetiko apliciranega histamina in s tem na koncentracije histamina v različnih tkivih pri podgani. Znižanje koncentracije histamina v tkivih živali, ki so dobile citalopram in histamin, v primerjavi z živalmi tretiranimi samo s histaminom kažejo, da ima citalopram poleg učinka na farmakokinetiko apliciranega histamina najverjetneje tudi učinek na biotransformacijo histamina, česar pa pri našem delu nismo dokazovali.

7 VIRI

Arko M. Učinki nekaterih psihotropnih snovi na farmakokinetiko histamina pri mački. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani. Medicinska fakulteta. Ljubljana, 2004.

Baenziger L.N., Mack P., Jong I. Yuh-Jiin, Dalermar R.L., Perez N., Lendberg C, Wilhelm B., Haddck C.R. 1994. An environmentally regulated receptor for diaraïne oxidese modulates human endothelial cell/fibroblast histamine degradative uptake. *J Biol Chem* 269, 21: 14892-98.

Baumann P. 1996. Pharmacology and pharmacokinetics of citalopram and other SSRIs. *Int Clin Psychopharmacol* 11: 5-11.

Beaven M. A., 1982 V: The pharmacology of Histamine Receptors. Ganellin C. R., Pearson M.E. PSG Publishing Co.,Inc.,Littelon, MA.

Benjamini E., Coico R., Sunshine G. 2000. Immunology, A short course. 4th edition. New York, John Wiley & sons, Inc, USA: 498.

Best C.H., Dale H.H., Dudley J.W., Thorpe W.V. 1927. The nature of the vasodilator constituents of sertain tissue extract. *J Physiol* 62: 397-417 .

Contran R.S., Kumar V., Robbins S.L. 3994. Robbin's Pathologic basis of disease, 5 th ed. Philadelphia, Saunders: 64-75.

Corbel S., Dy M. 1996. Evidence for bidirectional histamine transport by murine hematopoietic progenitor cells. *FEBS Lett* 391, 3: 279-81.

Cross L.J., Heaney L.G., Ennis M. 1997. Histamine release from human bronchoalveolar lavage mast cells by neurokinin A and bradykinin. *Inflamm Res* 46: 306-9

Dale H.H., Laidlaw P.P. 1910. The physiological action of β -imidazolethylamine. *J physiol* 41: 318-344.

Dvorak A.M., MacGlashan D.W. Jr, Morgan E.S., Lechenstein L.M. 1995. Histamine distribution in human basophil secretory granules undergoing FMLP-stimulated secretion and recovery. *Blood* 86:3560-6.

Erjavec F., Irman Florjanc T. 1986. The degradation of histamine in some animal species. *Agents Actions* 18, 1-2: 30-3

Ferjan I., Erjavec F. 1996. Changes in histamine and serotonin secretion from rat peritoneal mast cells caused by antidepressants. *Inflamm Res* 45: 141-144.

Fukami M.H., Holmes H., Ugurbil K., 1984. Histamine uptake in pig platelets and isolated dense granules. *Biochem Pharmacol* 33: 3869-74.

Galli S.J. 1993. New concepts about the mast cell. *N Engl J Med* 328: 257-265.

Hofstra C. L., Desai P. J., Thurmond R. L., Fung-Leung. W.P. 2003. Histamine H₄ receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J Pharmacol Exp Ther* 305(3):1212-21.

Holcslaw T., Wilson C, Nichols G. 1984. Histamine uptake and metabolism in the blood vessel of rats. *Agents Actions* 15: 202-210.

Horvat M. 1998. Anafilaktični šok. V: Kocjančič A., Mrevlje F. in sod. *Interna medicina*. Ljubljana, EWO&DZS : 126-7.

Irman F.T. 2002. Amitriptylin changes the pharmacokinetic profile of histamine in rat blood, *Inflamm Res* 51; Supp 1 S23-S24.

Irman F.T., Erjavec F. 1992. Histamine, tele-metbylhistamine ratios in rat blood as a function of time after i.v. injection of compound 48/80 or histamine. *Agents Actions*, Special Conference Issue: C394-C397.

Irman Florjanc T., Jochem J., Zwirska-Korczala K. 2004. Amitriptyline and citalopram inhibit histamine-induced cardiovascular effects in rats. *Inflamm Res* 53: Suppl: 97-98.

Irman F.T., Stanovnik L. 1998. Tricyclic antidepressants change plasma histamine kinetics after its secretion induced by compound 48/80 in the rat. *Inflamm Res* 47; Supp 1: 26-27.

Kassel O., Amrani Y., Landri Y., Bronnet C. 1995. Mast cell activation involves plasma membrane potential and tapsigargin-sensitive calcium pools. *Fundam Clin Pharmacol* 9: 531-539.

Knudsen T., Ferjan I., Johansen T. 1993. Activation of the Na⁺-K⁺-ATPase in rat peritoneal mast cells following histamine release: a possible role in cell recovery. *Br J Pharmacol* 108:120-5.

Kumbar M., 1975. Stable conformations of histamine by empirical method. *J theor Biol* 53: 333-340.

MacDonald S.M., Langdon J.M., Greenlee B.M., Kagey-Sobotka A., Lichtenstein L.M. 1991. IgE-dependent histamine releasing factors. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 94:144-147.

Melander A., Westgren U., Sundler F., Ericson L.E. 1975. Influence of histamine- and 5-hydroxytryptamine-containing thyroid mast cells on thyroid blood flow and permeability in the rat. *Endocrinology*, 97, 5: 1130-7.

Noskova V., Bottalico B., Olsson H., Ehinger A., Pilka R., Casslen B., Hansson S. R. 2006. Histamine uptake by human endometrial cells expressing the organic cation transporter EMT and the vesicular monoamine transporter-2. *Mol Hum Reprod*, 12, 8: 483-9

Neugebauer E., Rixen D., Garcia CM., Scheid B., Lorenc W. 1994. Time sequence of histamine release and formation in rat endotoxic shock. *Schock* 1: 299-306.

Rajtar S. 2004. Vpliv amitriptilina in sertralina na kinetiko eksogenega histamina v krvi mačke v *in vitro* poskusih. *Med razgl* 43: 339-349.

Rajtar S., Irman Florjanc T. 2006. Amitriptilin and sertralin differently affect the activity of diaminoxidase and histamine-N-methyltransferase in rat and guinea-pig tissues. (v tisku).

Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M. 1999. *Pharmacology*. 4th ed. London. Churchill Livingstone: 198-247, 539-565.

Reeves H.P., Jones C.A., Sheehan M.J., Vardey C.J., Whelan C.J. 1997. Adenosine A3 receptors promote degranulation of rat mast cells both *in vitro* and *in vivo*. *Inflamm Res* 46: 180-4.

Schildkraut J.J. 1965. The catecholamine hypothesis of affective disorders: A review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122: 509-522.

Schneider E., Machavoine F., Pléau J.M., Bertron A.F., Thurmond R. L., Ohtsu H., Watanabe T., Schinkel A. H., Dy M. 2005. Organic cation transporter 3 modulates murine basophil functions by controlling intracellular histamine levels. *JEM*, 202, 3: 387-393

Schwartz J.C., Pollard H., Bischoff S., Rehault M., Verdiere S. M. 1971. Catabolism of ³H-histamine in the rat brain after intracisertal administration. *Eur J Pharmacol* 16: 326-336.

Schwartz L.B. 1994. Mast cells: function and contents. *Curr Opin Immunol* 6: 91-97.

Serafin W.E., Austen K.F. 1987. Mediators of immediate hypersensitivity reactions. *N Engl J Med* 317: 30-34.

Shore P.A., Burkhalter A., Cohen V.H. 1959. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 127: 138-41.

Thomas B., Prell G. 1995. Imidazolacetic acid, a g-aminobutyric acid receptor agonist can be formed in rat brain by oxidation of histamine. *J Neurochem* 65: 818-826.

Voet D., Voet G.J., 1995. *Biochemistry*. 2nd edition. New York, John Wiley & sons, inc, USA.

Zucker M., Weizman A., Rehavi M. 2001. Characterization of high-affinity [³H]TBZOH binding to the human platelet vesicular monoamine transporter. *Life Sci* 28, 69: 2311-7.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Tatjani Irman Florjanc, ki mi je bila vedno pripravljena pomagati, svetovati in me usmerjati pri raziskovanju in nastajanju tega dela.

Neni Dolžan in Mojci Kranjec se zahvaljujem za uvajanje v laboratorijsko delo in vso pomoč pri raziskovanju.

Za pregled diplomske naloge in konstruktivne popravke se zahvaljujem recenzentu prof. dr. Lovru Stanovniku.

Za opravljene histološke preiskave se zahvaljujem ge. Andreji Lesar in prof. dr. Andreju Cöru.

Zahvaljujem se mami in bratu za vso podporo ter vsem prijateljem, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku mojega diplomskega dela.