

Vpliv fluvoksamina in maprotilina na sproščanje in farmakokinetiko histamina pri podgani *in vivo**

The influence of fluvoxamine and maprotiline on the release and kinetics of histamine in the rat *in vivo**

Borut Jug**

Ključne besede
histamin sproščanje – učinki zdravil
fluvoksamin
maprotilin
podgane

Key words
histamine release – drug therapy
fluvoxamine
maprotiline
rats

Izvleček. Antidepresivi prizadenejo farmakokinetiko histamina. Namen naše raziskave je bil natančneje oceniti vpliv različnih odmerkov antidepresivov fluvoksamina in maprotilina na inducirano sproščanje histamina in njegovo nadaljnjo eliminacijo ter opredeliti, ali na eliminacijo vpliva prerazporeditev histamina iz plazme v krvne elemente.

Podganam ($n = 24$) smo vbrizgali po dva enaka odmerka antidepresiva v časovnem razdobju 24 ur. Uro po drugem odmerku antidepresiva smo i. v. vbrizgali sproščevalca histamina – spojino 48/80 ($0,05 \mu\text{g/g}$) ali eksogeni histamin ($10 \mu\text{g/g}$). Zatem smo iz skupne karotidne arterije odvzeli vzorce krvi 5 in 15 minut po dodaku sproščevalca, da bi v njih izmerili plazemske ravni histamina, oziroma 2 minuti po vbrizgu histamina, da bi lahko ločeno analizirali koncentracijo histamina v plazmi in krvi. Koncentracije histamina v vzorcih smo po dvostopenjskem prečiščevanju določili spektrofotometrično.

Oba antidepresiva sta zavrla povišanje plazemske ravni histamina zaradi delovanja sproščevalca. Povečale so se vrednosti hitrostnih konstant eliminacije histamina. Po vbrizgu eksogenega histamina so bile njegove koncentracije v plazmi in krvi podgan z antidepresivom nižje kot pri kontrolnih podganah, ni pa se spremenilo razmerje histamin v plazmi: histamin v krvi.

Sklepamo, da antidepresiva zavirata inducirano sproščanje histamina in pospešita njegovo eliminacijo. Domnevamo tudi, da pospešena eliminacija histamina ni posledica njegovega prerazporejanja iz plazme v krvne elemente, pač pa ji verjetneje botrujeta pospešeno presnavljanje in/ali vezava histamina v druga tkiva. S tem lahko delno pojasnimo nekatere klinične učinke, ki jih imajo antidepresivi na vnetne in alergične procese.

Abstract. Antidepressants are known to influence the kinetics of histamine. The purpose of this study was twofold: to determine the influence of various doses of antidepressants fluvoxamine and maprotiline on induced histamine liberation and its further elimination and to find out whether histamine elimination is influenced by its redistribution from plasma to blood.

Rats ($n = 24$) were pre-treated with two doses of antidepressant at an interval of 24 hours. One hour after the administration of the second dose of antidepressants, the rats received histamine liberator – compound 48/80 ($0.05 \mu\text{g/g}$) or exogenous histamine ($10 \mu\text{g/g}$). Blood samples were taken from the carotid artery at 5 and 15 minutes after the injection of the histamine liberator – for measurements of plasma histamine levels, and at 2 minutes after the injection of exogenous histamine – for separate determinations of plasma and blood histamine levels. After a two-step purification procedure, histamine levels were measured by spectrofluorometry. Both antidepressants inhibited the rise of plasma histamine because of the effects of compound 48/80. The study animals showed significantly higher values of elimination constants than controls. It is assumed that antidepressants inhibit histamine liberation and promote its elimination. Rats pre-treated with antidepressants had lower plasma and blood histamine levels after exogenous histamine injection than control animals, while their plasma histamine/blood histamine ratio did not change significantly.

We suppose that accelerated elimination of histamine is not the result of its redistribution from plasma to blood and blood elements but is rather the consequence of increased metabolism of histamine and/or its binding in other tissues.

*Objavljeno delo je bilo nagrajeno s Krkinovo nagrado za študente v letu 1998.

**Borut Jug, štud. med., Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, Medicinska fakulteta, Korytkova 2, 1000 Ljubljana.

Uvod

Histamin

Biosinteza, razgradnja in farmakokinetika histamina

Histamin (Hi, *4(5)-(2-aminoetil)imidazol*) je biogeni amin. Nastane z dekarboksilacijo L-histidina, pretežno pod katalitičnim vplivom encima dekarboksilaze histidina (EC 4.1.1.22), potreben pa je tudi koencim piridoksal-5'-fosfat (slika 1a) (1).

Hi se iz plazme eliminira zelo hitro, očiščevanje plazme poteka v dveh fazah – v prvi (hitri) se Hi prerazporedi iz plazme (osrednji farmakokinetični prostor) v tkiva (obrobni farmakokinetični prostor), v drugi (počasnejši) fazi pa se Hi v perifernih tkivih razkroji (2, 3). Njegova razgradnja poteka po dveh presnovnih poteh (slika 1b):

- oksidativno deaminiranje, ki ga katalizira diaminooksidaza (EC 1.4.3.6) in vodi v nastanek imidazolocetne kisline, ki se z ribozo konjugira v 1-ribozil-imidazol-4-acetat ter v takšni obliki izloči s sečem;
- metiliranje dušika N₃ na imidazolovem obroču, ki ga katalizira histamin-N-metiltransferaza (EC 2.1.1.8); produkt reakcije je tele-metilhistamin, ki se z monoaminsko oksidazo nadaljnje oksidira v metilimidazolocetno kislino in nato izloči s sečem.

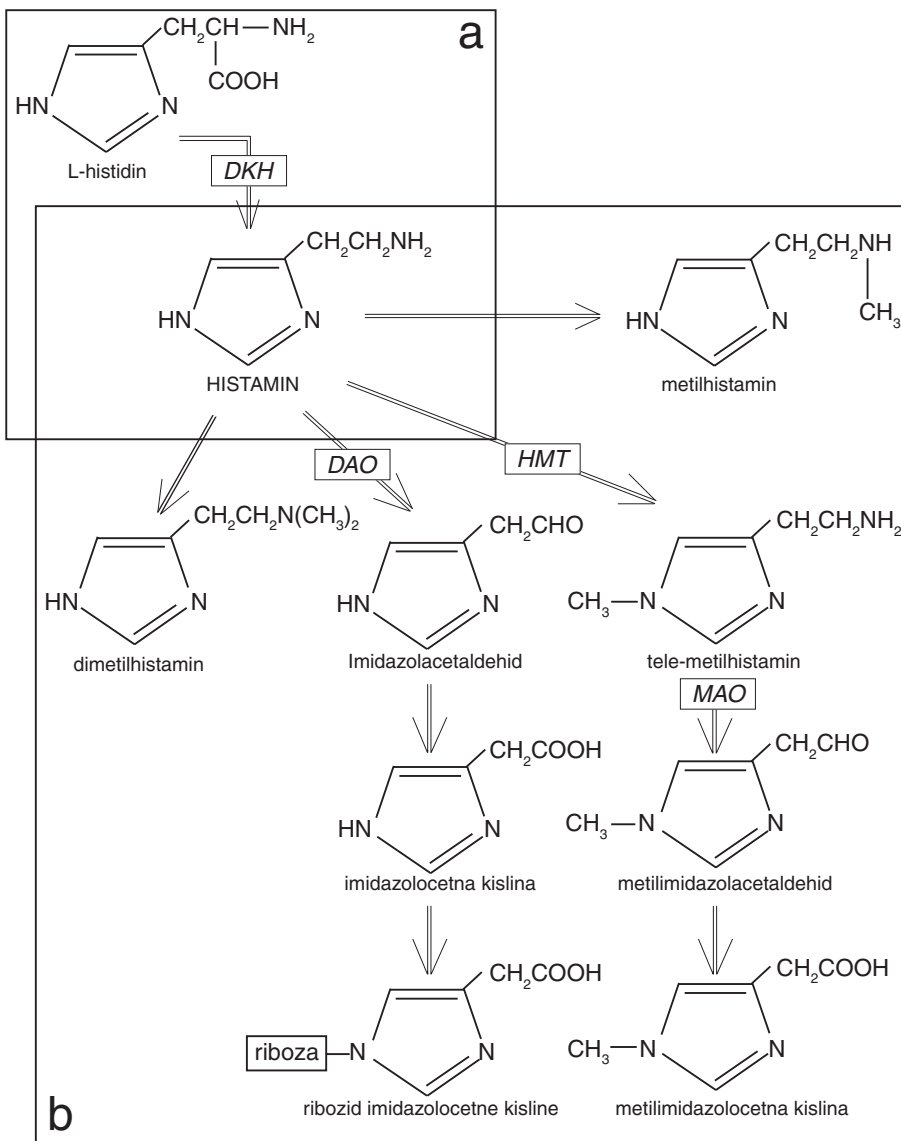
Porazdelitev histamina v organizmu

Hi je evolucijsko zelo ohranjen – zasledimo ga praktično pri vseh živalskih vrstah. V posameznih tkivih je različno porazdeljen, kar je povezano z njegovimi fiziološkimi in patofiziološkimi funkcijami; največ ga zasledimo v koži, pljučih in želodcu (tabela 1).

V telesu vretenčarjev se Hi nahaja pretežno v mastocitih (tkivni bazofilci), pa tudi v gibljivih krvnih bazofilcih, ki so sicer maloštevilni, a vsebujejo v fizioloških pogojih 88–94 % vsega Hi v krvi. Obe vrsti celic vsebujeta bazofilna metakromatska sekretorna zrnca, v katerih je Hi ionsko vezan s heparini visoke molekulske mase (makroheparini; v mastocitih vezivnega tkiva) ali redkeje hondroitinsulfatom (mastociti sluznic). Zrnca lahko vsebujejo tudi beljakovine (npr. kemotaktične dejavnike za eozinofilce in nevtrofilce, encime, kot sta triptaza in himotriptaza ipd.) ali druge biogene amine – serotonin (5-HT) pri glodalcih ali dopamin. Molarno razmerje Hi, heparina in drugih sestavin zrnca je 1 : 3 : 6. Posamezen mastociti vsebuje 0,1–0,2 pmol Hi, posamezen bazofilec pa okoli 0,01 pmol Hi (11–14). Mastocitni Hi je vpleten predvsem v patološke procese.

Tabela 1. Koncentracije histamina v posameznih tkivih; primerjava med podgano in človekom (4–10).

Tkivo	Konc. pri podgani	Konc. pri človeku
Koža	27,4 µg/g	4,2–30,4 µg/g
Pljuča	5,4 µg/g	33,0 µg/g
Želodec	19,4 µg/g	17,0 µg/g
Kri	49,0 ng/ml	50,0 ng/ml
Plazma	17,0 ng/ml	0,35 ng/ml



Slika 1. Presnova histamina – (a) biosinteza in (b) razgradnja; DKH – dekarboksilaza histidina, HMT – histaminska metiltransferaza; DAO – diaminooksidaza; MAO – monoaminska oksidaza.

V nekaterih tkivih (vrhnjica kože, sluznica želodca, osrednje živčevje, celice obnavljajočega se ali hitro rastočega tkiva itd.) nastaja Hi izven mastocitov (izvenmastocitni histamin). V sluznici želodca nastaja Hi v celicah, ki so podobne enterokromafinim celicam, v osrednjem živčevju pa v histaminergičnih živčnih celicah. Izvenmastocitni Hi je rahlo vezan in se neprestano sprošča, zato je njegovo presnovno obračanje hitro. Ima fiziološko vlogo.

Sproščanje histamina

Hi se iz mastocitov in bazofilcev reaktivno sprosti zaradi različnih imunoloških in neimunoloških spodbud:

- fizikalnih dejavnikov (poškodbe, spremembe temperature ipd.),
- vezave alergenov na predhodno senzibilizirani mastocit (prekrit s protitelesi IgE),
- delovanja anafilatoksinov (sestavin komplementa C3a in C5a),
- nevrokinih beljakovin (npr. snovi P, bradikina, nevrokinina A),
- sprostitvenega hormona za kortikotropin (CRH),
- citokinov (npr. interleukinov 1 in 8),
- nekaterih učinkovin – npr. opioidov, d-tubokurarina, sestavin v strupih žuželk (npr. melitina iz čebeljega strupa), anestetikov idr.,
- adenoзина,
- prostih kisikovih radikalov, ki se sproščajo med razgradnjo nekaterih učinkovin v mastocitu,
- spojine 48/80, ki smo jo uporabili tudi pri naših poskusih za sproščanje Hi iz mastocitnih zalog (15–21).

Redkeje se Hi sprošča iz mastocitnih zalog počasi in kontinuirano – takšno obliko praznjenja zrnca opazimo pri vnetnih spremembah in zločestih procesih. Dejavniki, ki spodbujajo sproščanje Hi iz mastocitov, ne vplivajo na obračanje izvenmastocitnega Hi (22).

Protitelesa IgE, ki nastanejo v sklopu humoralnega imunskega odziva na alergene, se vežejo na receptorje za IgE, ki so na površini mastocitov (in bazofilcev) izjemno številni (10^5) – mastocit postane senzibiliziran. Zaradi ponovne izpostavitve alergenom in njihove vezave na protitelesa IgE na senzibiliziranem mastocitu pride do prečne povezave protiteles na površju mastocitov, kar vodi v zvečano prepustnost celične opne mastocita za kalcijeve ione (Ca^{++}). Spojina 48/80 tudi zviša koncentracijo Ca^{++} v citosolu mastocita, vendar tako, da sprosti Ca^{++} iz znotrajceličnih zalog (najverjetneje endoplazemskega retikuluma) (11, 12, 23).

Zvišana raven Ca^{++} v citoplazmi vodi v degranulacijo mastocita – eksocitotično zlitje zrnca s celično opno in posledično sprostitvev predhodno sintetiziranih molekularnih posrednikov (Hi, 5-HT, kemotaktičnih dejavnikov). Ca^{++} naj bi v celici sprožil plaz reakcij, ki vodijo v aktivacijo beljakovinskih kinaz in fosforilacijo beljakovin, ki so ključne za zlitje zrnca s celično opno (mikrotubuli, mikrofilamenti, intermediarni filament vimentin ter nekatere sestavine citoskeleta, kot so fodrine α in β , ankirin ter aktin) (24, 25).

Aktivacija receptorjev s protitelesi IgE spodbudi tudi presnovo arahidonske kisline; njeni presnovki (prostaglandini, levkotrieni, aktivacijski dejavnik za trombocite, številni citokini)

so pomembni molekularni posredniki, ki skupaj s Hi delujejo na krvožilje in gladko mišičnino ter s tem vzdržujejo vnetje (26).

Farmakološki učinki histamina

Histamin je avtakoid – biokemični posrednik, ki za razliko od hormonov deluje parakrino, svojega farmakološkega prijemališča pa ne doseže po krvi, pač pa je njegovo delovanje običajno omejeno na lokalno tkivo (npr. vnetišče). Svoje učinke sproža z vezavo na receptorje za Hi. Trenutno so poznane tri podvrste receptorjev za Hi: H_1 , H_2 in H_3 (11, 12), novejša raziskava pa predpostavljajo tudi obstoj znotrajceličnih vezavnih mest za Hi (27). Vse tri podvrste membranskih receptorjev za Hi so sklopljene z beljakovino G: aktivacija receptorja in posledična aktivacija beljakovine G vodita v plaz znotrajceličnih reakcij, ki jim sledijo specifični biološki odzivi.

Receptorji H_1 se nahajajo v gladkih mišicah črevesja in dihalnih poti, v steni žil in v osrednjem živčevju. Ob vezavi Hi na receptor H_1 se sproži znotrajcelična obveščevalna pot fosforiliranih derivatov inozitola, ki preko specifičnih reakcij (mobilizacija znotrajceličnih zalog Ca^{++} , aktivacija specifičnih encimov, npr. beljakovinske kinaze C itd.) pripelje do biološkega odgovora – krčenja gladkega mišičja v črevesju in maternici, zoženja dihalnih poti in sprememb v mikrocirkulaciji (razširitev arteriol in skrčenje endotela venul, ki vodi v zvečano prepustnost žilja in edem), ki so odgovorne za vlogo Hi v zgodnji fazi akutnega vnetja.

Receptorji H_2 se nahajajo na parietalnih celicah želodčne sluznice, v gladki mišičnini stene žil, mišičju srca, glomerulih in osrednjem živčevju. Z vezavo agonista na receptor H_2 se aktivira beljakovina G in z njo adenilatna ciklaza, zaradi česar se zviša znotrajcelična raven cAMP. Biološki odgovor se kaže kot povečano izločanje želodčnega soka, sprostitvev gladkih mišičnih celic (razširitev žilja) oziroma povečano krčenje srčne mišice (ki utegne biti delno kompenzatorna posledica padca krvega tlaka zaradi vazodilatacije, povzročene prav z učinkovanjem Hi). Hi preko receptorjev H_2 uravnava presnovo maščob in povratno zavira sproščanje Hi iz bazofilcev.

Receptorji H_3 so značilni zlasti za osrednje živčevje, kjer se nahajajo presinaptično. Njihova vloga je povratno zaviranje proženja histaminergičnih nevronov in sproščanja Hi kot živčnega prenašalca v sinaptično špranjo, pa tudi uravnavanje sinteze Hi.

Hi je vpleten v številne patofiziološke procese: ključno vlogo ima v zgodnji fazi akutnega vnetja in pri imunskih preobčutljivostih tipa I po Coombesu (atopijah), kot so alergična astma, seneni nahod in koprivnica. Hi je endogeni algogen, saj zniža prag za proženje bolečinskih živčnih končičev. Zvišane ravni Hi beležimo pri mastocitozi, histidinemiji, pravi policitemiji, kroničnih mieloičnih levkemijah in drugih tumorskih raščah. Zvišana raven Hi v telesnih tekočinah povzroča značilne spremembe, ki segajo od kožnih reakcij (rdečina, koprivke, srbež) in sistemskih sprememb (povečano izločanje želodčnega soka, povečanje srčne frekvence z nevarnostjo fibrilacije prekatov, padec arterijskega krvnega tlaka, anafilaktični šok) do smrti zaradi zastoja srca (28).

Tabela 2. Farmakološki učinki histamina (Hi) glede na podvrsto receptorja za Hi in nahajališče le-tega (GMC – gladkomišična celica) (4, 11, 12).

Receptor	Nahajališče	Biološki odziv
H ₁	GMC v steni žilja endotelij venul GMC maternice GMC črevesja GMC dihalnih poti osrednje živčevje	razširitev arteriol, zoženje večjih žil zvečana prepustnost žilja krčenje maternice krčenje črevesja zoženje dihalnih poti posinaptična aktivacija
H ₂	parietalne celice želodca GMC stene žil glomeruli srčna mišica maščobne celice osrednje živčevje	zvečano izločanje želodčnega soka razširitev žil glomerulna filtracija zvečana kontraktilnost srca uravnava presnovo maščob posinaptična aktivacija
H ₃	osrednje živčevje	predsinaptično zaviranje

Fluvoksamin in maprotilin

Nevrofarmakološka razlaga depresivnih motenj

Fluvoksamin in maprotilin sta antidepresiva (AD), ki se uporabljata pri zdravljenju depresivnih motenj razpoloženja in drugih psihiatričnih stanj (tesnobnosti, stresnih in somatoformnih motenj, osebnostnih motenj, motenj hranjenja, migren, kroničnih bolečin idr.). Po nekajtedenskem jemanju AD se stanje izboljša 70–85 % bolnikom, kar je v primerjavi z bolniki, ki so jemali placebo (15–40 %), pomenljivo (29). Kmalu po odkritju zdravilnega učinka AD, so njihovo sposobnost izboljšati razpoloženje pri osebah z depresijo vzporedili s sposobnostjo AD, da zvišajo raven nekaterih živčnih prenašalcev v tistih področjih osrednjega živčevja, ki so odgovorna za čustvovanje in razpoloženje (30).

Depresijo z nevrobiološkega vidika danes razlagamo kot neravnovesje živčnega prenosa v osrednjem živčevju. V ospredju je izravnovešenje monoaminskih živčnih prenašalcev (monoaminska hipoteza depresije), zlasti naj bi bila motena dejavnost noradrenalina (NA) in 5-HT (31), čeprav se v strokovni literaturi pojavlja vse več domnev, da so v nastanek in razvoj motenj razpoloženja vključene tudi spremembe v delovanju dopamina, acetilholina, γ -aminomaslene kisline ter nekaterih neuropeptidov (npr. CRH) (11, 32–34). V zadnjem času se uveljavlja tudi hipoteza, da motene ravni Hi v osrednjem živčevju tehtno prispevajo k razvoju depresije; Hi sam naj bi imel antidepresivne učinke (35), dokazana je tudi povezava med delovanjem serotoninergičnega sistema in ravno Hi v osrednjem živčevju (36–38). Hi je pomemben biogeni amin, ki utegne biti soudeležen v nastanku depresije, zato je poznavanje vpliva AD nanj tudi s tega vidika pomembno.

Monoaminska hipoteza že dolgo ni več zadovoljiva za razlago depresivnih motenj; nje- no trdnost majeta časovni zamik med začetkom zdravljenja in pojavom zdravljalnih učinkov AD (2–4 tedni) ter obstoj atipičnih AD, katerih mehanizem delovanja še ni docela pojasnjen (39).

Farmakološko delovanje antidepresivov

Farmakološko prijemališče AD je sinaptična špranja; AD zvišajo raven živčnih prenašalcev v sinaptičnem prostoru, in sicer tako, da

- zavrejo njihovo razgradnjo (npr. zaviralci monoaminske oksidaze – IMAO),
- zavrejo njihov ponovni prevzem (npr. maprotilin zavre ponovni privzem NA, fluvoksamin pa 5-HT),
- spremenijo občutljivost in število posinaptičnih in predsinaptičnih receptorjev in
- agonistično delujejo skupaj s posameznimi amini (40).

Prve izboljšave kliničnega stanja bolnikov opazimo šele po 2–4 tednih, za ta časovni zamik pa še ni ustrezne razlage; domnevajo, da je zakasnen antidepresivni učinek posledica dolgotrajnega prilagajanja pred- in posinaptičnih receptorjev na spremenjene ravni živčnih prenašalcev (»uravnavanje navzdol« adrenergičnih receptorjev α_2 in β ter serotoninergičnih receptorjev 5-HT₂) (11, 29, 30, 32).

Obstaja več razdelitev AD (tabela 3), v farmakologiji pa je najbolj uporabljena delitev glede na farmakološko prijemališče zdravila, in sicer na:

- AD tricikličnega tipa (TCA; mednje sodi tudi maprotilin),
- selektivne zaviralce ponovnega privzema serotonina (angl. *serotonin selective reuptake inhibitors*, SSRI; mednje sodi fluvoksamin),
- IMAO in
- ostale AD.

V klinični praksi se čedalje bolj uveljavljajo SSRI (42). Medtem ko je bil leta 1992 v Sloveniji najpogosteje predpisan AD maprotilin in so imeli ostali AD zanemarljivo vlogo, so postali že leta 1995 opazni SSRI (zlasti fluoksetin, pa tudi fluvoksamin), čeprav je bil maprotilin še vedno najpogosteje predpisan AD (43). Novejši podatki, ki bi nam služili za bolj tehtno oceno, nam niso dostopni.

Čedalje bolj poudarjeno vlogo SSRI v psihiatriji gre pripisati dejstvu, da imajo SSRI manj stranskih učinkov kot starejši TCA. Med stranskimi učinki, ki jih navajajo bolniki, zdravljeni s fluvoksaminom, so zlasti prehodna slabost, neješčnost, vznemirjenost in nespečnost, ni pa motenj uravnavanja dejavnosti srca in ožilja (aritmije, hiper- ali hipotenzije), antiholinergičnih učinkov ali pretirane ješčnosti, ki jih zasledimo pri uporabi TCA; fluvoksamin ima tudi večjo terapevtsko širino (44, 45). Maprotilin povzroča antiholinergične učinke, sedacijo, njegova terapevtska širina je primerljiva s terapevtsko širino TCA, lahko povzroča alergične izpuščaje in konvulzije. Je zelo dolgo delujoč AD (njegov razpolovni čas je okoli 40 ur); maprotilin je tudi učinkovitejši od fluvoksamina pri zdravljenju depresivnega sindroma, ki mu je pridružena tesnoba (46, 47) (tabela 4).

Tabela 3. Razdelitve antidepressivov (AD). SSRI – selektivni zaviralci ponovnega privzema serotonina (angl. selective serotoninine reuptake inhibitors), IMAO – zaviralci monoaminske oksidaze, NA – noradrenalin, 5-HT – serotonin (5-hidroksitriptamin) (11, 29, 30, 40, 41).

Merilo za razdelitev	Razdelitev	Primeri
Farmakološko prijemališče	AD tricikličnega tipa	amitriptilin, doksepin, klomipramin maprotilin
	SSRI	fluoksetin, fluvoksamin, sertralín
	IMAO ostali AD	moklobemid trazodon, mianserin, viloksazin
Mehanizem delovanja (podrobnejši farmakološki)	zaviralci ponovnega privzema NA	maprotilin
	SSRI	fluoksetin, fluvoksamin
	zaviralci ponovnega privzema NA in 5-HT	klomipramin, amitriptilin, trazodon, doksepin
	AD, ki večajo sintezo NA	mianserin
	AD, ki zavirajo razgradnjo NA	moklobemid
	AD, ki krepijo delovanje NA	bupropion
Kemična struktura	monociklični	fluvoksamin, fluoksetin, bupropion
	biciklični	trazodon, paroksetin
	triciklični	amitriptilin, desipramin, klomipramin
	tetraciklični	maprotilin, mianserin
Klinično učinkovanje	amitriptilinski tip (sedativni AD)	amitriptilin, doksepin
	dezipraminski tip (timeretiki)	dezipramin, nortriptilin
	imipraminski tip (timoleptiki)	imipramin, klomipramin
Zgodovinska	AD prve generacije	triciklični AD, nereverzibilni IMAO
	AD druge in naslednjih generacij	tertraciklični AD, reverzibilni IMAO, SSRI

Tabela 4. Primerjava fluvoksamina in maprotilina: delovanje, odmerjanje in stranski učinki (30, 40).

Generično	Fluvoksamin	Maprotilin
Tovarniško ime	Avoksin®	Ladiomil®
Molekulska masa	434,4	313,9
Običajni dnevni odmerek (mg)	100–200	100–150
Ekstremni odmerek (mg)	50–300	25–225
Oblika dajanja zdravila	oralno	oralno
Amin, na katerega vpliva	serotonin	noradrenalin
Afiniteta do receptorjev H₁ (Km)	> 10.000 nM	2 nM
Sedacija	0/+	++
Antiholinergični učinki	0	++
Hipotenzija	0	++
Učinki na srce in ožilje	0	++
Konvulzije	0	+++
Pridobitev telesne teže	0	+

Namen raziskovalne naloge

Namen naše raziskave je bil natančneje oceniti vpliv različnih odmerkov fluvoksamina in maprotilina na inducirano sproščanje Hi iz endogenih zalog in njegovo nadaljnjo eliminacijo ter opredeliti, ali na eliminacijo vpliva njegova prerazporeditev iz plazme v krvne elemente.

Pri raziskavi smo preučili vplive naslednjih AD:

- fluvoksamin (Avoksin®; Krka, Novo mesto, Slovenija) in
- maprotilin (Ladiomil®; Pliva, Zagreb, Hrvaška).

Metode dela

Uporabljeni pribor, kemikalije in učinkovine

Pribor: steklovina (epruvete, čaše, buče, erlenmajerice, kolone), pipete in kapalke, drobni kirurški pribor za oftalmološke posege, trokraki ventili, plastične kanile, brizgalkе, injekcijske igle.

Kemikalije: bidestillirana voda, natrijev hidroksid (NaOH; 1 M, 2 M in 5 M), klorovodikova kislina (HCl; 0,1 M, 1 M, 2 M, 3 M in 4 M), perklorna kislina (HClO₄; 2 M in 0,4 M), fosfatni pufer (pH 6,5), n-butanol, heptan, orto-ftalaldehid (angl. *ortho-phtalaldehyde*, OPT; 0,5 % raztopina v metanolu), metanol, ionski izmenjevalec Dowex (Merk, Darmstadt, Nemčija).

Učinkovine: fiziološka raztopina (0,9 % NaCl v vodi), heparin (ampule 25.000 IE/5 ml, Krka, Novo mesto), uretan (20 % raztopina v fiziološki raztopini), spojina 40/80 (0,05 µg/µl), raztopine Hi (Sigma, St. Louis, ZDA) (iz osnovne raztopine 1 mg/ml smo pripravili nižje koncentracije – standardne raztopine 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 1,5 ng/ml, 4 ng/ml, 8 ng/ml in 12 ng/ml), antidepressiva fluvoksamin in maprotilin v fiziološki raztopini (velik odmerek

fluvoksamina – 2,7 mg/kg oz. $6,2 \times 10^{-6}$ mol/kg, majhen odmerek fluvoksamina – 1,0 mg/kg oz. $2,3 \times 10^{-6}$ mol/kg, velik odmerek maprotilina – 2,0 mg/kg oz. $6,3 \times 10^{-6}$ mol/kg, majhen odmerek maprotilina – 0,3 mg/kg oz. $9,6 \times 10^{-7}$ mol/kg).

Poskusne živali

Pri poskusih smo uporabili 24 odraslih albino podganjih samic seva Wistar, ki so bile težke od 170 g do 405 g (povprečno 229,96 g). Poskuse smo dokončali pri 21 podganah; 3 podgane so med eksperimentalnim delom poginile; iz znakov (hiperpernoe, tahipnoe in palpitacije) smo sklepali, da so poginile zaradi šokovnega stanja (bodisi anafilaktičnega zaradi nefiziološko povišanih ravni Hi bodisi hemoragičnega zaradi odvzema relativno velike količine krvi).

Živali smo stehali in jim v potrebušnično votlino vbrizgali odmerek AD, 24 ur kasneje smo podgani ponovno vbrizgali enak odmerek istega AD. Trem podganam AD nismo vbrizgali, ker smo jih uporabili za kontrolno skupino.

Živali smo nato omrtvičili z vbrizgom 20 % uretana (0,5 ml/100 g telesne teže). Čas do nastopa kirurške anestezije je bil v povprečju 7 minut, globino anestezije smo preverjali z ugotavljanjem refleksa očesne veznice. Omrtvičeno žival smo pritrdili na secirno mizico. Poseg ni potekal v aseptičnih pogojih, ker je žival ob koncu poskusa poginila. Med kirurško anestezijo smo v sprednjem vratnem predelu odprli polje podkožja in s topo preparacijo iz veziva v levem stranskem vratnem trikotniku osamili jugularno veno, v desnem pa skupno karotidno arterijo. V obe žili smo vstavili plastični kanili in ju s sukanci pritrdili. Kanila, vstavljena v levo jugularno veno, je bila s trokrakim ventilom pritrjena na brizgalki s heparinom in spojino 48/80 oziroma eksogenim Hi. Arterijo smo v zgornjem poteku prevezali s sukancem, v spodnji del smo vstavili kanilo in jo utrdili ter prehodno zapirali s stiščkom; izstopišče kanile smo usmerili v epruveto za lovljenje vzorcev.

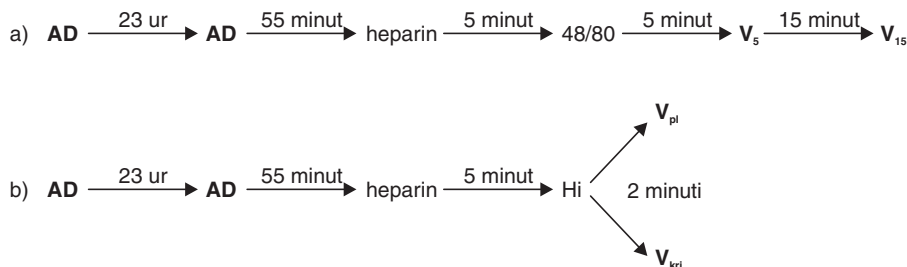
Podganam smo odvzeli po dva vzorca krvi, zato smo 55 minut po dodatku AD v vratno veno skozi kanilo vbrizgali 0,5 ml heparina (7.500 IE/kg telesne teže) in tako preprečili strjevanje krvi.

V poskusih na podganah št. 1–15, kjer smo preučevali vpliv AD na sproščanje Hi iz mastocitnih zalog in kinetiko eliminacije Hi iz plazme, smo 5 minut po dodatku heparina v veno vbrizgnili spojino 48/80 (0,05 µg/g telesne teže).

V dodatnih poskusih na podganah št. 16–24 smo hoteli podrobneje preučiti vpliv AD na prerazporejanje Hi po tkivih. Podganam smo v veno vbrizgali eksogeni Hi (10 µg/g telesne teže) (slika 2).

Zaradi eksperimentalno povzročenih patoloških ravni Hi v plazmi podgane sta živali grozili huda bronhokonstrikcija in odpoved dihanja, zato smo podgano traheotomizirali, da smo ji omogočili preživetje do odvzema zadnjega vzorca krvi.

V skladu z etičnimi priporočili za biomedicinsko preizkušanje na živalih (48) smo število poskusnih podgan omejili; če so se rezultati pri treh živalih ujemali (standardna napaka povprečja – S.E.M. < 15,0 %), poskusov nismo nadaljevali.



Slika 2. Shematski prikaz dodajanja učinkovin poskusni živali. (a) – poskusi na podganah št. 1–15, kjer smo preučevali vpliv antidepressivov (AD) na sproščanje histamina (Hi) zaradi delovanja spojine 48/80 na mastocite in kinetiko njegove eliminacije; 5 in 15 minut po indukciji sproščanja smo odvzeli vzorca krvi (V_5 in V_{15}); (b) – dodatni poskusi na podganah št. 16–21, kjer smo podrobneje preučevali vpliv AD na praznjenje Hi iz plazme v kri poskusne živali; 2 minuti po dodatku eksogenega Hi smo podganam odvzeli vzorca krvi za ločeno analizo Hi v plazmi in krvi (V_{pl} in V_{kri}).

Odvzem in priprava vzorcev

V prvem nizu poskusov smo 5 in 15 minut po dodatku sproščevalca Hi – spojine 48/80 iz skupne karotidne arterije odvzeli vzorce krvi za določitev ravni Hi v **plazmi**.

V drugem nizu smo 2 minuti po vbrizgu zunajtelesnega Hi iz skupne karotidne arterije odvzeli dva vzorca – v prvem vzorcu smo določali raven Hi v **plazmi**, v drugem vzorcu smo določali koncentracijo Hi v **krvi**; iz rezultatov smo sklepali na preporazdelitev Hi v obeh telesnih tekočinah.

Pri odvzemu vzorca smo zavrgli prvih nekaj kapljic; pri predhodnih poskusih se je namreč izkazalo, da stišček na žili najbrž poškoduje njeno steno in sprosti Hi iz bazofilcev, kar potvori rezultate meritev (4).

Priprava plazme

Za analizo vzorca smo potrebovali vsaj 2–3 ml krvi, večji odvzemi pa bi pomenljivo prizadeli hemodinamiko pri podgani, kar bi bilo za naš poskus nesprejemljivo, saj se raven Hi med hemoragičnim šokom patološko izravnovesijo (49, 50). Da bi preprečili takšno stanje, smo izgubljeno prostornino telesnih tekočin nadomeščali s sprotno počasno infuzijo fiziološke raztopine po prvem odvzemu krvi.

Vzorce smo dvakrat centrifugirali (25 minut pri 3.200 obratih in dobljeni supernatant še 10 minut pri 10.000 obratih). Plazmi iz supernatanta smo dodali polovično prostornino 2M HClO_4 , da smo oborili beljakovine. Po centrifugiranju smo supernatant shranili pri -18°C do nadaljnje analize.

Priprava krvi

Za analizo je zadostoval 1 ml krvi. Vzorcem smo takoj po odvzemu dodali enako prostornino raztopine 1M HClO_4 , da smo oborili beljakovine. Vzorce smo dobro premešali in jih zamrznili pri -18°C . Vzorce krvi smo nato odmrznili, jih centrifugirali (25 minut pri 3.200 obratih) in jih zopet zamrznili. Vzorce smo še enkrat odmrznili in centrifugirali

(25 minut pri 3.200 obratih), supernatant pa shranili pri -18°C do nadaljnje analize. Naprej smo z vzorci za analizo Hi v plazmi in krvi postopali enako.

Analiza vzorcev

Hi smo kondenzirali z OPT, vendar je kondenzacija nespecifična, saj so koncentracije Hi v plazmi podgane zelo nizke (tabela 1), OPT pa reagira tudi z drugimi amini (51). Zato je bilo pred kondenzacijo vzorce smotrno prečistiti v dveh stopnjah:

- s tekočinsko kromatografijo na kolonah,
- z izluženjem z organskimi topili (52).

Čiščenje s tekočinsko kromatografijo

Pri tekočinski kromatografiji so bili naši vzorci gibljiva faza, stacionarna faza pa je bil ionski izmenjevalec Dowex.

Stacionarno fazo smo pripravili iz 250 g Dowexa, ki smo mu primešali 2 l bidestilirane vode. Ko se je Dowex usedel, smo vodo oddekantirali. Postopek smo ponovili še enkrat.

Suhemu Dowexu smo nato dodali 1 l 2 M NaOH in 30 minut mešali z magnetnim mešalom; Dowex se je nato usedel, topilo smo oddekantirali, Dowex pa spirali z bidestilirano vodo do nevtralnega pH. Postopek smo ponovili z 1 l 2 M HCl. Tako pripravljen Dowex smo zmešali z bidestilirano vodo v razmerju 1 : 2 in shranili pri $+4^{\circ}\text{C}$.

V posamezno kolono za tekočinsko kromatografijo smo nanесли po 1 ml te mešanice. Ko se je Dowex usedel, smo v vsako kolono dodali 12 ml 0,1 M fosfatnega pufru, da smo stacionarni fazi uravnali pH na 6,5.

Ko je iz kolone odtekel fosfatni pufer, smo vanje nanесли vzorec, ki smo mu predhodno dodali 4 ml 0,4 M HClO_4 in uravnali pH na 6,5. V koloni smo vse skupaj splaknili še z 2 ml fosfatnega pufru. V kolone smo dolili 1 ml bidestilirane vode; ko je ta faza odtekla smo dolili 5 ml 1 M HCl in počakali, da je odtekla iz kolone. V kolonah je ostal Hi. S stacionarne faze smo ga sprostili s 3 ml 4 M HCl, ki smo jo ulovili v epruvete.

Izluženje z organskimi topili

Vzorcu, ki smo ga ulovili iz kolon (okoli 3 ml), smo dodali 0,4 g NaCl, 2,7 ml 5 M raztopine NaOH in 4,5 ml n-butanola. Tako pripravljeno mešanico smo stresali 5 minut in jo nato centrifugirali (5 minut pri 3.200 obratih). 3,5 ml butanolne faze smo prenesli v epruvete s 700 μl 0,1 N raztopine HCl in 3,5 ml n-heptana; mešanico smo tresli 5 minut in ponovno centrifugirali (5 minut pri 3.200 obratih) ter odsesali zgornjo fazo; v spodnji, vodni fazi je ostal Hi.

Kondenzacija in spektrofluorometrično določanje koncentracije histamina

Hi ne absorbira ali oddaja svetlobe v spektru, ki bi ga lahko uporabili za spektrofotometrično analizo, zato smo Hi kondenzirali z OPT, da je nastal produkt, ki seva fluorescentno svetlobo (izsevalna svetloba), če ga vzbudimo s svetlobo primerne valovne dolžine (vzbujna svetloba) (53).

500 μ l vzorca v 0,1 M HCl smo zmešali s 100 μ l 1 M NaOH in premešali, nato smo v enakih časovnih intervalih (5 sekund) dodajali 50 μ l 0,5 % OPT. 4 minute po začetku dodajanja OPT smo vzorcu primešali 50 μ l 3M HCl v enakih časovnih intervalih. Pripravili smo tudi standardne vzorce Hi (4, 8 in 12 ng/ml Hi za vzorce podgan št. 1–15, kjer smo določali Hi v plazmi, ter 1, 2, 6 in 10 ng/ml Hi za vzorce iz dodatnega niza poskusov na podganah št. 16–24 – analiza Hi v krvi) in jih kondenzirali z OPT. Koncentracijo Hi v vzorcih smo izmerili s spektrofluorometrom. Jakost fluorescence smo merili pri 450 nm (izsevalna valovna dolžina) z ekscitacijo pri 360 nm (vzbujna valovna dolžina).

Statistično vrednotenje rezultatov

V okviru enega niza poskusov smo eksperimentalno delo ponovili na treh podganah. Vrednost posamezne koncentracije Hi smo tako izračunali iz 3 statističnih enot in jo izrazili s povprečjem \pm standardno napako povprečja ($x \pm$ S.E.M).

Posamezne rezultate smo med seboj primerjali s testom t, ki temelji na Studentovi porazdelitvi, prilagojeni za majhne statistične vzorce (3 podgane). Za statistično pomenljivo smo vzeli vrednost $p < 0,05$ (54, 55).

Izračuni

Plazemske koncentracije Hi 5 minuti po dodatku spojine 48/80 podganam, ki so prejele AD, smo primerjali z ravno Hi v vzorcih plazme kontrolnih podgan, ki niso dobile AD. Iz te razlike smo izračunali delež zaviranja povišanja ravni Hi v plazmi (DZ) (56).

$$DZ = \frac{C_{spr} - C_5}{C_{spr}} \times 100 \%$$

DZ smo izračunali kot količnik med razliko koncentracij Hi 5 minut po sprostitvi pri podganah, ki so prejele AD (C_5) in koncentracijo Hi 5 minut po sprostitvi pri podganah, ki niso dobile AD (C_{spr}).

Kinetiko eliminacije smo ocenili iz spremembe ravni Hi v plazmi podgane med prvim in drugim vzorcem – 5 in 15 minut po indukciji sproščanja Hi s spojino 48/80. Podgana je majhna poskusna žival, zato smo ji lahko odvzeli le 2 vzorca krvi za analizo.

Hitrost eliminacije Hi smo količinsko opredelili s hitrostno konstanto eliminacije (k_{el}), ob predpostavki, da nam organizem podgane predstavlja enoten farmakokinetični prostor, kar seveda okrni vrednost naših izsledkov. Koncentracija Hi s časom pada eksponentno (2), zato smo krivulje eliminacije prikazali kot odvisnost logaritmov koncentracij Hi od časa; slika 7 prikazuje eliminacijske krivulje (premice) Hi, katerih nakloni so ustrezne k_{el} .

$$k_{el} = \frac{\log C_{15} - \log C_5}{t_2 - t_1}$$

Hitrostno konstanto eliminacije Hi izračunamo kot količnik razlike logaritmov koncentracij 5 ($\log C_5$) in 15 minut po sprostitvi Hi ($\log C_{15}$) ter razlike časov, ob katerih smo doveli vzorca (t_1 in t_2).

Pri dodatnih poskusih smo podganam vbrizgali eksogeni Hi (odmerek $10\mu\text{g/g}$ telesne teže) in jim 2 minuti zatem odvzeli vzorca krvi za ločeno analizo koncentracije Hi v plazmi in v krvi. Podgane št. 16–18 so bile kontrolna skupina, saj jim predhodno nismo dali AD, medtem ko smo podganam št. 19–24 24 ur in 1 uro pred dodatkom eksogenega Hi vbrizgali odmerek AD. Iz rezultatov smo izračunali delež kontrolne koncentracije (DKK), iz katerega smo lahko ocenili vpliv AD na spremembo ravni eksogenega Hi v plazmi oziroma krvi.

$$DKK = \frac{C_{AD}}{C_{Hi}}$$

DKK je razmerje plazemskih koncentraciji Hi v plazmi po vbrizgu eksogenega Hi pri podganah, ki so predhodno dobile antidepresiv (C_{AD}), in podganah, ki ga niso (C_{Hi}).

Izračunali smo tudi razmerje med koncentracijo Hi v plazmi in celokupno koncentracijo Hi v krvi ($R_{pl/kri}$), s čemer smo ocenili razporejanje Hi iz plazme v kri in ovrednotili vpliv, ki ga imajo AD na to prerazporeditev.

$$R_{pl/kri} = \frac{C_{pl}}{C_{kri}}$$

$R_{pl/kri}$ je razmerje koncentracij Hi v plazmi (C_{pl}) in krvi (C_{kri}) podgan 2 minuti po vbrizgu eksogenega Hi.

Rezultati

Kontrolne meritve

V predhodnih poskusih je bilo določeno, da je koncentracija Hi v plazmi podgane 5 minut po intravenskem vbrizgu heparina $2,8 \pm 0,4$ ng/ml (2); to vrednost imenujemo osnovna raven.

V drugem sklopu kontrolnih poskusov sta bili določeni koncentraciji Hi 5 in 15 po vbrizgu sproščevalca Hi – spojine 48/80. 5 minut po dodatku spojine 48/80 je bila koncentracija Hi v plazmi podgane $22,46 \pm 0,712$ ng/ml, po 15 minutah pa je raven Hi padla na $14,85 \pm 0,94$ ng/ml; k_{el} je $0,0414 \pm 0,003$ min⁻¹ (57).

Te vrednosti smo uporabili za primerjavo z vrednostmi, ki smo jih dobili pri analizi vzorcev krvi podgan, ki so predhodno prejele AD; koncentracijo Hi v plazmi podgane 5 minut po sprostitvi Hi s spojino 48/80 (konc. Hi = $22,46 \pm 0,712$ ng/ml) smo določili za 100 % (DZ je 0 %). S tem smo tudi količinsko opredelili vlogo AD pri zaviranju sproščanja Hi in pri spremembi kinetike eliminacije Hi iz plazme podgane.

Tabela 5. Ravni histamina (H_i) v plazmi kontrolnih skupin podgan, ki predhodno niso prejele antidepresivov (AD). (A) osnovne ravni H_i pri podgani. (B) koncentracije H_i 5 in 15 minut po dodatku spojine 48/80. C_5 in C_{15} – koncentraciji H_i v plazmi 5 in 15 minut po dodatku učinkovin; k_{el} – hitrostna konstanta eliminacije. Vrednosti so podane kot povprečje \pm standardna napaka povprečja.

Kontrolna skupina	Učinkovine	C_5 (ng/ml)	C_{15} (ng/ml)	k_{el} (min^{-1})
(A) Brez AD in sproščevalca	heparin	2,8 \pm 0,4	–	–
(B) Brez AD, s sproščevalcem	heparin, 48/80	22,46 \pm 0,712	14,85 \pm 0,9	0,0414 \pm 0,003

Za sklop dodatnih poskusov, pri katerem smo podganam vbrizgali eksogeni H_i (10 $\mu\text{g/g}$ telesne teže), smo izvedli kontrolni poskus na treh podganah, ki predhodno niso prejele AD. Plazemska koncentracija H_i je bila 2 minuti po vbrizgu H_i 62,97 \pm 8,99 ng/ml, raven H_i v krvi pa 118,75 \pm 27,48 ng/ml. Obe koncentraciji sta nam služili kot kontroli, s katerima smo primerjali izmerjene vrednosti H_i v plazmi oziroma krvi tistih podgan, ki so pred dodatkom eksogenega H_i prejele AD.

Spremembe v koncentracijah histamina 5 in 15 minut po dodatku spojine 48/80 pri podganah, ki so prejele antidepresiv

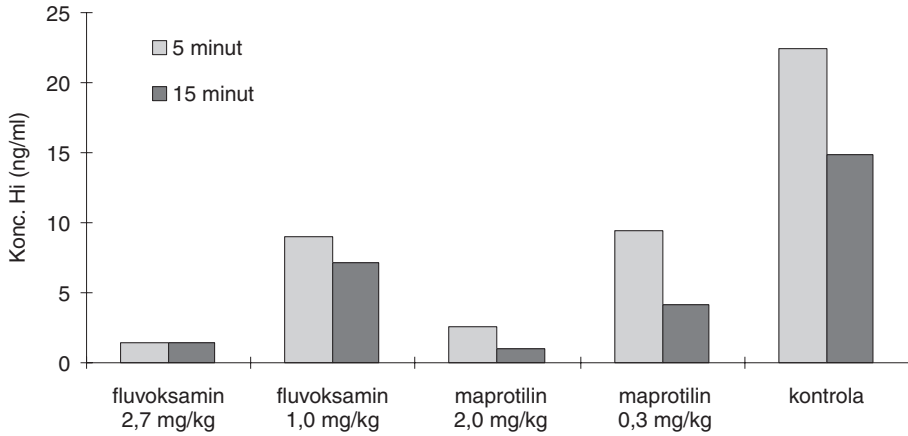
Pri podganah, ki so prejele fluvoksamin tako v velikem kot tudi v majhnem odmerku, je bila raven H_i 5 minut po dodatku sproščevalca (1,46 \pm 0,09 ng/ml oz. 8,96 \pm 0,75 ng/ml) pomenljivo nižja kot pri kontrolni skupini podgan (22,46 \pm 0,712 ng/ml). DZ povišanja koncentracije je bil 93,75 \pm 0,42 % pri višjem oz. 60,27 \pm 3,36 % pri manjšem odmerku (slika 3).

Tudi koncentracije H_i 15 minut po dodatku spojine 48/80 so bile pomenljivo nižje kot pri kontrolni skupini podgan: 1,36 \pm 0,06 ng/ml pri velikem odmerku ter 7,21 \pm 0,89 ng/ml pri nizkem. Pri podganah, ki so prejele velik odmerek fluvoksamina in pri katerih smo nato inducirali sprostitvev H_i , je bila njegova raven v obeh vzorcih celo nižja od osnovne ravni H_i v plazmi (2,8 ng/ml) (tabela 6).

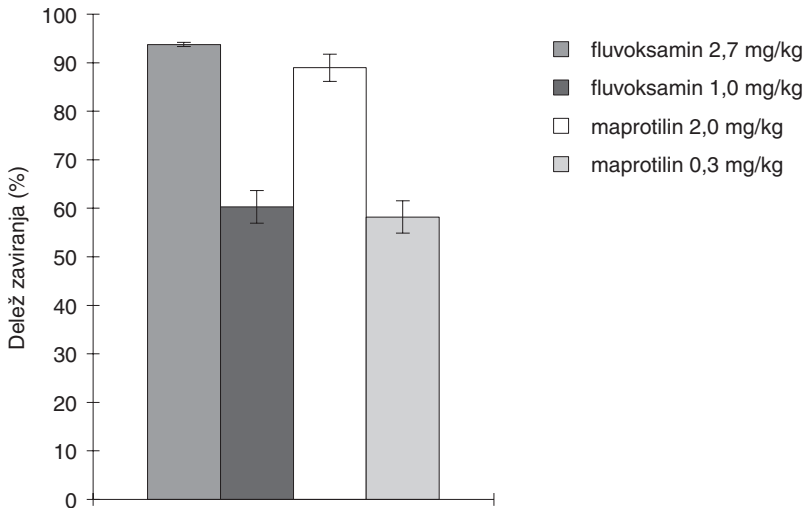
Konstanti eliminacije H_i iz plazme sta bili 0,0071 \pm 0,002 min^{-1} za velik odmerek fluvoksamina in 0,0220 \pm 0,005 min^{-1} za majhen odmerek.

Tabela 6. Rezultati poskusov pri podganah, ki so 24 ur in 1 uro pred dodatkom sproščevalca histamina – spojine 48/80 prejele odmerek antidepresiva (AD). Podganam smo 5 in 15 minut po dodatku spojine 48/80 odvzeli vzorce krvi in v njih določili koncentracije plazemskega H_i (C_5 in C_{15}); v tabeli so koncentracije podane s povprečjem \pm standardnim odklonom povprečja. DZ – delež zaviranja sproščanja H_i ; K_{el} – konstanta eliminacije H_i iz plazme poskusne živali

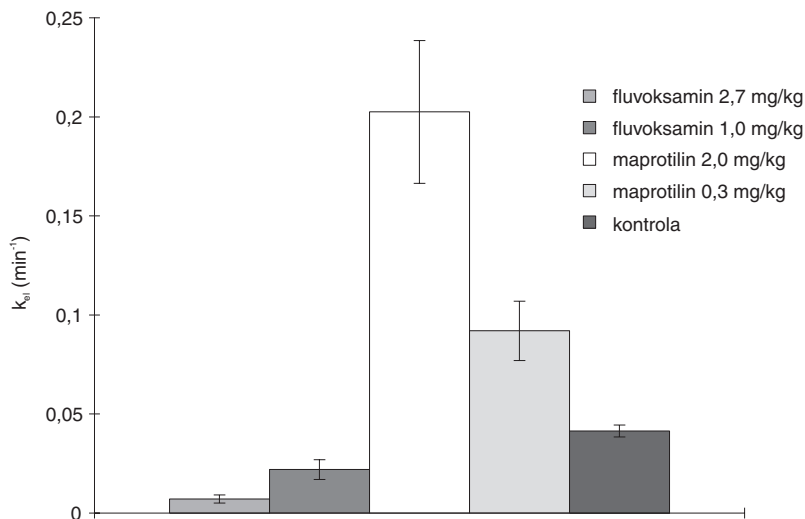
AD / odmerek	C_5 (ng/ml)	C_{15} (ng/ml)	DZ (%)	K_{el} (min^{-1})
Fluvoksamin 2,7 mg/kg	1,46 \pm 0,09	1,36 \pm 0,06	93,75 \pm 0,42	0,0071 \pm 0,002
Fluvoksamin 1 mg/kg	8,96 \pm 0,75	7,21 \pm 0,89	60,27 \pm 3,36	0,0220 \pm 0,005
Maprotilin 2 mg/kg	2,53 \pm 0,49	1,02 \pm 0,26	88,97 \pm 2,18	0,0920 \pm 0,015
Maprotilin 0,3 mg/kg	9,42 \pm 0,74	4,14 \pm 1,23	58,21 \pm 3,32	0,0848 \pm 0,026



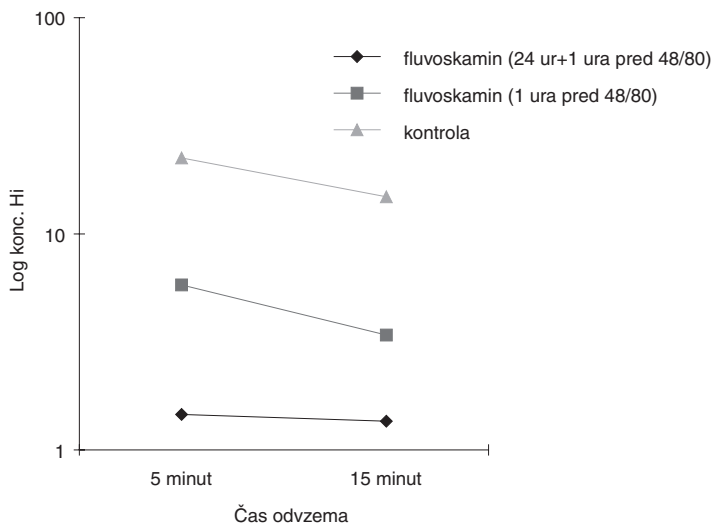
Slika 3. Primerjava koncentracij histamina (Hi) 5 in 15 minut po dodatku spojine 48/80 pri kontrolni skupini podgan, ki niso prejele AD, in podganah, ki so 24 ur in 1 uro pred dodatkom sproščevalca Hi prejele odmerek antidepressiva (AD) – 2,7 mg/kg ($6,2 \times 10^{-6}$ mol/kg) ali 1,0 mg/kg ($2,3 \times 10^{-6}$ mol/kg) fluvoksamina ter 2,0 mg/kg ($6,3 \times 10^{-6}$ mol/kg) ali 0,3 mg/kg ($9,6 \times 10^{-7}$ mol/kg) maprotilina. Prikazane so povprečne vrednosti ($n = 3$).



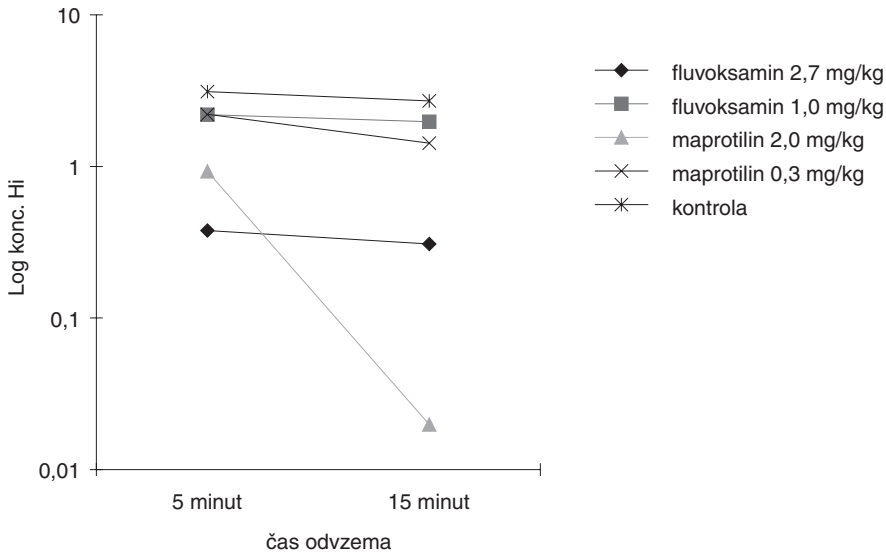
Slika 4. Deleži zaviranja (DZ) porasta koncentracije histamina (Hi) pri podganah, ki so 24 ur in 1 uro pred dodatkom sproščevalca Hi – spojine 48/80 prejele odmerek antidepressiva (AD) – 2,7 mg/kg ($6,2 \times 10^{-6}$ mol/kg) ali 1,0 mg/kg ($2,3 \times 10^{-6}$ mol/kg) fluvoksamina oziroma 2,0 mg/kg ($6,3 \times 10^{-6}$ mol/kg) ali 0,3 mg/kg ($9,6 \times 10^{-7}$ mol/kg) maprotilina. Rezultati so predstavljeni kot povprečje \pm standardna napaka povprečja ($n = 3$).



Slika 5. Hitrostne konstante eliminacije (k_e) histamina (Hi), sproščene s spojino 48/80 pri kontrolni skupini podgan, ki niso prejele antidepresiva (AD), in podganah, ki so 24 ur in 1 uro pred dodatkom sproščevalca Hi prejele odmerke AD – 2,7 mg/kg ($6,2 \times 10^{-6}$ mol/kg) ali 1,0 mg/kg ($2,3 \times 10^{-6}$ mol/kg) fluvoksamina ter 2,0 mg/kg ($6,3 \times 10^{-6}$ mol/kg) ali 0,3 mg/kg ($9,6 \times 10^{-7}$ mol/kg) maprotilina. Rezultati so predstavljeni kot povprečje \pm standardna napaka povprečja ($n = 3$).



Slika 6. Upadanje plazemskih koncentracij histamina (Hi), sproščene s spojino 48/80 pri (a) kontrolni skupini podgan, ki niso prejele antidepresiva (AD), (b) pri podganah, ki so 1 uro pred dodatkom sproščevalca Hi prejele en odmerek 2,7 mg/kg fluvoksamina (57), ter (c) pri podganah, ki so odmerek 2,7 mg/kg fluvoksamina prejele dvakrat, 24 ur in 1 uro pred indukcijo sproščanja Hi. Podane so srednje vrednosti ($n = 3$).



Slika 7. Primerjava eliminacije histamina (H_i). Časovna odvisnost koncentracij histamina (H_i) po dodatku spojine 48/80 pri kontrolni skupini podgan, ki niso prejele antidepresiva (AD), in podganah, ki so 24 ur in 1 uro pred dodatkom sproščevalca H_i prejele odmerek AD – 2,7 mg/kg ($6,2 \times 10^{-6}$ mol/kg) ali 1,0 mg/kg ($2,3 \times 10^{-6}$ mol/kg) fluvoksamina oziroma 2,0 mg/kg ($6,3 \times 10^{-6}$ mol/kg) ali 0,3 mg/kg ($9,6 \times 10^{-7}$ mol/kg) maprotilina. Podane so srednje vrednosti ($n = 3$).

Tudi maprotilin je tehtno vplival na ravni H_i . Velik odmerek maprotilina je povzročil $88,97 \pm 2,18\%$ zaviranje povišanja koncentracije H_i v plazmi podgane 5 minut po dodatku spojine 48/80, saj je bila raven H_i v plazmi tedaj $2,53 \pm 0,49$ ng/ml. 15 minut po sprostitvi H_i je bila njegova raven v plazmi $1,02 \pm 0,26$ ng/ml. Obe koncentraciji sta tudi nižji od osnovne ravni H_i . Konstanta eliminacije je bila pri tem odmerku maprotilina $0,0920 \pm 0,015$ min $^{-1}$.

Majhen odmerek maprotilina je povzročil $58,21 \pm 3,32\%$ zavrtje povišanja koncentracije H_i po sprostitvi s spojino 48/80; koncentracija 5 minut po sprostitvi je bila $9,42 \pm 0,74$ ng/ml, 15 minut po sprostitvi pa $4,14 \pm 1,23$ ng/ml. Konstanta eliminacije H_i je pri podganah, ki so dobile majhen odmerek maprotilina, $0,0848 \pm 0,026$ min $^{-1}$ (tabela 6). Izsledki so grafično ponazorjeni na slikah 3–7.

Spremembe v koncentracijah histamina v plazmi in krvi po dodatku eksogenega histamina podganam, ki so prejele antidepresiv

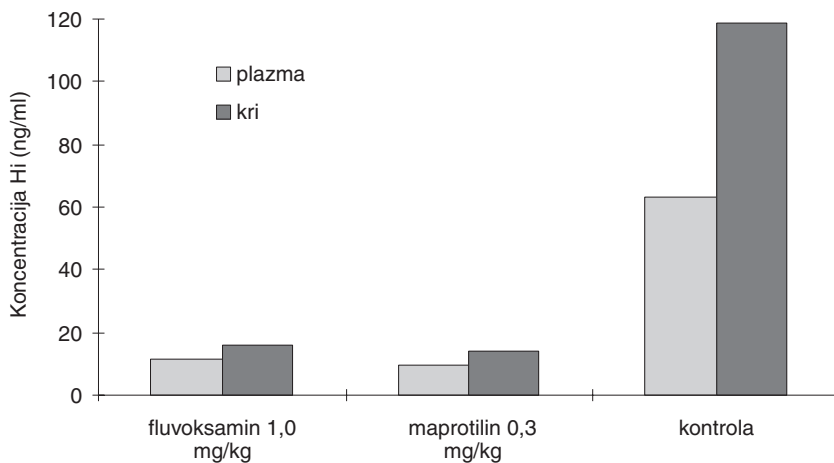
V tabeli 7 so povzete koncentracije, izmerjene v krvi in plazmi 2 minuti po vbizvigu eksogenega H_i (10 μ g/g) podganam, ki so 24 ur in 1 uro pred tem prejele odmerka 0,1 mg/kg fluvoksamina in 0,3 mg/kg maprotilina.

Tabela 7. Rezultati poskusov, opravljenih na podganah, ki so 24 ur in 1 uro pred vbizgrom eksogenega histamina (Hi) prejele antidepresiv (AD) – odmerek 1,0 mg/kg ($2,3 \times 10^{-6}$ mol/kg) fluvoksamina oziroma odmerek 0,3 mg/kg ($9,6 \times 10^{-7}$ mol/kg) maprotilina. Podganam smo 2 minuti po dodatku Hi odvzeli vzorce krvi in v njih določili koncentracije Hi v plazmi (C_{pl}) in krvi (C_{kri}). Rezultati so podani kot povprečje \pm standardna napaka povprečja ($n = 3$). DKK_{pl} – delež kontrolne koncentracije Hi v plazmi; DKK_{kri} – delež kontrolne koncentracije Hi v krvi; $R_{pl/kri}$ – razmerje koncentracij Hi v plazmi in krvi (delež plazemskega Hi glede na celokupni Hi v krvi).

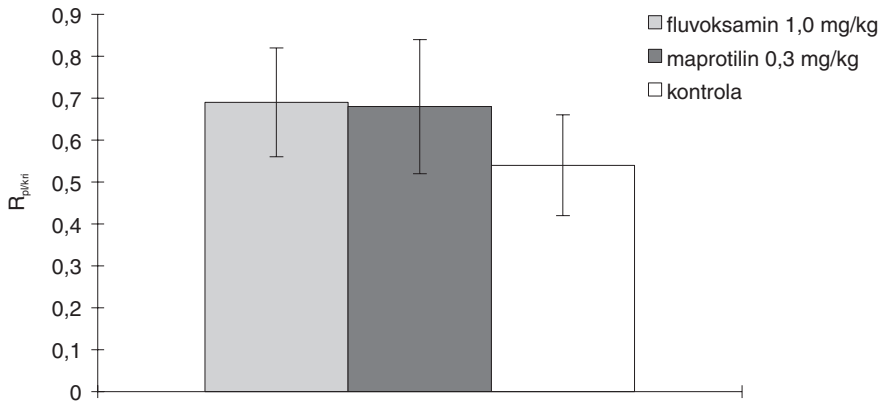
AD	C_{pl} (ng/ml)	DKK_{pl} (%)	C_{kri} (ng/ml)	DKK_{kri} (%)	$R_{pl/kri}$
Fluvoksamin 1,0 mg	11,26 \pm 3,64	17,88 \pm 5,78	16,26 \pm 4,02	13,70 \pm 3,38	0,69 \pm 0,13
Maprotilin 0,3 mg	9,80 \pm 3,33	15,56 \pm 5,28	14,17 \pm 1,77	11,94 \pm 1,49	0,68 \pm 0,16

Tako pri podganah, ki so prejele fluvoksamin, kot pri podganah, ki so bile podvržene odmerku maprotilina, je bila plazemska koncentracija Hi pomenljivo nižja kot pri kontrolni skupini (62,97 \pm 8,99 ng/ml). Plazemska raven Hi je bila pri podganah, ki so prejele fluvoksamin, 11,26 \pm 3,64 ng/ml ($DKK = 17,88 \pm 5,78\%$), pri podganah, ki so prejele maprotilin, pa smo izmerili 9,8 \pm 3,33 ng/ml ($DKK = 15,56 \pm 5,28\%$) (tabela 7).

Tudi raven Hi v krvi je bila pomenljivo nižja kot pri kontrolnih podganah (118,75 \pm 27,48 ng/ml): fluvoksamin je koncentracijo Hi znižal na 13,70 \pm 3,38 % kontrolne ravni, maprotilin pa na 11,94 \pm 1,49 % kontrolne ravni. Koncentraciji Hi v krvi sta bili 16,26 \pm 4,02 ng/ml pri fluvoksaminu in 14,17 \pm 1,77 ng/ml pri maprotilinu. Razmerje med plazemskim Hi in celokupnim Hi v krvi je bilo pri podganah, ki so dobile fluvoksamin, 0,69 \pm 0,13, pri podganah z maprotilinom pa 0,68 \pm 0,16 (tabela 7). Razlika med razmerjema je statistično



Slika 8. Primerjava koncentracije histamina (Hi) v plazmi in krvi 2 minuti po dodatku eksogenega Hi (10 μ g/g) pri kontrolni skupini podgan, ki ni prejela antidepresiva (AD), pri skupini, ki je prejela odmerek 1,0 mg/kg ($2,3 \times 10^{-6}$ mol/kg) fluvoksamina, in pri skupini, ki je prejela 0,3 mg/kg ($9,6 \times 10^{-7}$ mol/kg) maprotilina. Ponorzjene so povprečne vrednosti meritev ($n = 3$).



Slika 9. Primerjava razmerij med koncentracijo histamina (Hi) v plazmi in celokupno koncentracijo Hi v krvi 2 minuti po dodatku eksogenega Hi ($10 \mu\text{g/g}$) pri kontrolni skupini podgan, ki ni prejela antidepressiva (AD), pri skupini, ki je prejela odmerek $1,0 \text{ mg/kg}$ ($2,3 \times 10^{-6} \text{ mol/kg}$) fluvoksamina, in pri skupini, ki je prejela $0,3 \text{ mg/kg}$ ($9,6 \times 10^{-7} \text{ mol/kg}$) maprotilin. Ponazorjene so srednje vrednosti \pm standardne napake povprečja.

nepomembna ($p > 0,05$), njuna razlika z razmerjem pri podganah kontrolne skupine, ki predhodno niso dobile AD ($R_{pl/kri} = 0,54 \pm 0,12$), pa je zelo majhna. Izsledke smo grafično povzeli na slikah 8 in 9.

Razpravljanje

V raziskavi smo poskušali oceniti vpliv, ki ga imata AD fluvoksamin in maprotilin na sproščanje in kinetiko eliminacije Hi pri podganah *in vivo*. Poskusi *in vivo* omogočajo razčlenbo farmakokinetičnih parametrov in medsebojnega vpliva posameznih učinkovin (AD in Hi), kar je bil tudi namen naše raziskave. Res pa je, da homeostatski mehanizmi delno popačijo farmakološke interakcije, zaradi motečega vpliva homeostaze tudi ne moremo zanesljivo opredeliti, kako je do takšnih interakcij med zdravili prišlo. Poskusi *in vitro* ponujajo natančnejši vpogled v celične in molekularne mehanizme takšnih interakcij, vendar je projiciranje izsledkov iz strokovne literature, ki so bili dobljeni pri poskusih *in vitro*, v dognanja naših študij zapleten.

Pri naših poskusih smo uporabili premedikacijo (antikoagulacijsko zaščito – heparin, ommrtvičenje – uretan), ki pomenljivo vpliva na ravni Hi v organizmu poskusne živali. Heparin naj bi zavrl inducirano sproščanje Hi (58, 59), sam pa povzroča sproščanje Hi (60). Tudi uretan spodbuja sproščanje Hi (61, 62), zato smo bili pri vrednotenju izsledkov previdni in smo pri vseh podganah postopali enako, da bi se izognili morebitnim potvorbam rezultatov. Pazljivi smo bili tudi pri laboratorijskem delu; najbolj kočljiva faza je bil odvzem vzorcev, saj bi s fizično poškodbo žile lahko sprostili mastocitni Hi in izkazali izsledke raziskave.

Na raven Hi vplivajo tudi pogoji poskusnega dela – koncentracije Hi so odvisne od temperature, plazemske ravni Hi cirkadiano nihajo, spreminjajo se tudi z letnimi časi. Zunanje

pogoje poskusov smo poskusili čim bolj poenotiti: vzorce smo vedno odvzeli ob istem času dneva (9–10 ura zjutraj), temperatura okolja je bila dokaj stalna ($T = 22 \pm 4^\circ\text{C}$). Na koncentracije Hi vplivajo tudi razlike med posameznimi poskusnimi živalmi – razlike v aktivnosti encimskih sistemov za razgradnjo Hi (histaminska metiltransferaza, diaminska oksidaza, monoaminska oksidaza), prisotnost morebitnih preobčutljivosti (atopij) in različna odzivnost posamezne podgane na stres (sproščanje CRH) so individualno pogojene.

Na farmakokinetiko AD v organizmu poskusne živali vplivajo zlasti razlike v telesni teži in zgradbi. AD se v organizmu široko porazdelijo (63), vendar je za to potrebno primerno časovno obdobje. Fluvoksamin oziroma maprotilin smo podgani vbrizgali 24 ur in 1 uro pred dodatkom spojine 48/80 oziroma eksogenega Hi. S tem smo dosegli, da se je AD prerazporedil iz osrednjega farmakokinetičnega prostora v obrobne. Učinkovine smo odmerjali glede na telesno težo podgan, pri čemer smo predpostavili, da se zdravilo prerazporedi po vsem organizmu poskusne živali enakomerno, kar pa se ne bi zgodilo, če AD ne bi imel časa, da se iz plazme razširi drugam po telesu. Podgane se v telesni teži razlikujejo predvsem zaradi deleža maščobnega tkiva – težje podgane imajo več maščevja (večji obrobni farmakokinetični prostor), prostornina osrednjega farmakokinetičnega prostora pa se pri posameznih podganah ne razlikuje pomenljivo. Ker so odmerki normirani na telesno težo, bi se AD, dodan le nekaj ur pred vbrizgom spojine 48/80 oz. eksogenega Hi, pri podganah še zadrževal v osrednjem farmakokinetičnem prostoru ne glede na telesno težo in telesno zgradbo živali. Plazemska koncentracija AD bi bila v tem primeru pri bolj zamaščениh podganah, ki so na račun večje telesne teže prejele večji odmerek zdravila, višja – preiskovani vplivi AD bi zaradi tega bili navidezno (lažno) okrepljeni, to pa bi nas zavedlo v napačno razlago izsledkov.

Vpliv antidepresivov na sproščanje histamina

Pri podganah št. 1–15 smo s spojino 48/80 sprožili sproščanje Hi; vzorce smo odvzeli 5 in 15 minut po dodatku sproščevalca. Ravni Hi so bile pri vseh podganah, ki so predhodno prejele AD, statistično pomenljivo nižje kot pri kontrolni skupini podgan ($p < 0,05$).

Fluvoksamin je v velikem odmerku zmanjšal predvideno povečanje ravni Hi za $93,75 \pm 0,42\%$, v majhnem odmerku pa za $60,27\%$; DZ maprotilina v velikem odmerku je bil $88,97 \pm 2,18\%$, v nizkem pa $58,21 \pm 3,32\%$. Pri velikih odmerkih fluvoksamina in maprotilina so bile izmerjene koncentracije celo nižje od osnovne ravni Hi ($2,80\text{ ng/ml}$).

DZ je le posredni pokazatelj zaviralnega učinka AD na sproščanje Hi iz endogenih zalog. Zaviranje sproščanja smo predpostavili, ker je bila plazemska koncentracija Hi po sprostitvi pri podgani, podvrženi AD, nižja od pričakovane (kontrolne). Ali gre res za zavirto sproščanje, bi lahko potrdili le s poskusi na osamljenih mastocitih *in vitro*, kjer bi sproščanju Hi sledili z molekulami Hi, ki bi bile predhodno označene z radioaktivnimi izotopi.

Nizke ravni Hi in visoke vrednosti DZ lahko razložimo s hipotezo, da AD zavirajo sproščanje Hi iz mastocitov, kar potrjujejo rezultati različnih raziskav, čeprav sam mehanizem zaviranja še ni natančno poznan. Ferjanova in sod. (64) so s poskusi *in vitro* pokazali,

da je zaviralni učinek AD bolj poudarjen, ko v zunajceličnem okolju ni Ca^{++} , sposobnost zaviranja pa narašča z hidrofobnostjo molekule AD. AD so amfilne spojine – imajo hidrofobni del (ciklično strukturo), ki se vključuje v celično opno, in protonirani polarni del (stransko verigo), ki naj bi tekmoval s Ca^{++} za vezavno mesto na kalmodulinu in drugih beljakovinah v celici. Potrjeno je bilo, da se nekateri AD vežejo na znotrajcelične beljakovine, ki se sicer aktivirajo ob vezavi Ca^{++} ; s tem bi AD utegnili ovirati plaz znotrajceličnih reakcij, ki vodijo v degranulacijo mastocita (65). Možno je tudi, da AD s samo vključitvijo v celično opno prizadenejo delovanje nekaterih membranskih encimov (fosfolipaze A_2 , fosfolipaze C, beljakovinske kinaze C), ki so vključeni v mehanizem sproščanja mastocitnega Hi (64).

Zaviranje sproščanja Hi bi lahko bilo tudi posledica precejšnje afinitete AD do receptorjev za Hi (66). Dokazano je bilo, da imajo nekateri AD zaradi afinitete do receptorjev za Hi podobne lastnosti kot fenotiazinski antagonisti receptorjev H_1 , ki v nizkih koncentracijah (do 1 mmol/l) zavirajo sproščanje Hi med preobčutljivostnimi reakcijami (67). Pri naših poskusih je takšna razlaga vprašljiva: fluvoskamin ima sicer precejšnjo afiniteto do receptorjev za Hi, kar pa za maprotilin ne velja.

Tudi dognanja Purcella in sod. (68) so v skladu z našimi izsledki. Potrdila so namreč, da AD prizadenejo ponovni privzem 5-HT, ne ovirajo pa privzema Hi, katerega sproščanje je zaradi delovanja AD sicer prizadeto. Da AD vplivajo na mehanizem inducirane sproščanja Hi in ne na osnovno raven Hi v plazmi, sklepamo iz rezultatov preliminarnih poskusov (69), pa tudi histomorfološka analiza sproščanja Hi iz mastocitov ni dokazala, da bi AD sami vplivali na proces degranulacije (70).

Iz podatkov o DZ za posamezne odmerke AD lahko ocenimo, da je vpliv, ki ga imata preučevana AD na (ne)sproščanje Hi, odvisen od odmerka. Večja odmerka obeh AD sta bolj zavrla povišanje plazemske koncentracije Hi. Ocenimo lahko tudi, da velik odmerek fluvoksamina bolj zavre predvideno povečanje ravni Hi kot velik odmerek maprotilina, vendar je razlika DZ majhna ($4,36 \pm 2,18\%$), čeprav statistično pomenljiva ($p < 0,05$). Primerjava zaviralnega učinka majhnih odmerkov ni mogoča; razliki nista statistično pomembni, poleg tega je v majhnem odmerku fluvoksamina $2,3 \times 10^{-6}$ mol/kg telesne teže poskusne živali, v majhnem odmerku maprotilina pa le $9,6 \times 10^{-7}$ mol/kg.

Rezultate, dobljene pri poskusih na podganah št. 1–3, ki so 24 ur in 1 uro pred sprostitvijo Hi iz mastocitnih zalog prejele velik odmerek fluvoksamina ($2,7$ mg/kg – $6,2 \times 10^{-6}$ mol/kg), smo primerjali z izsledki Majcnove (57), ki je enak odmerek Hi podganam dodala le enkrat, uro pred dodatkom spojine 48/80. 5 minut po dodatku spojine 48/80 je izmerila koncentracijo Hi $5,8 \pm 0,4$ ng/ml, 15 minut po sprostitvi pa $3,4 \pm 0,76$ ng/ml; k_{el} je $0,052 \pm 0,012$ min⁻¹, DZ pa $74,0 \pm 2,1\%$. Primerjava izsledkov je pokazala, da so bile ravni Hi v plazmi naših podganah, ki so prejele dva odmerka fluvoksamina v razmiku 24 ur, pomenljivo nižje (slika 6). Sklepamo, da se je AD uspel široko porazdeliti po organizmu in dosegel vsa tkiva, v katerih je nato delovala spojina 48/80; fluvoksamin je tudi imel možnost, da doseže svoja farmakološka prijemališča in v njih prizadene mehanizem sprostitve, privzema in morda tudi razkroja Hi. Pri podganah, ki so dobile le en odmerek fluvoksamina uro pred sprostitvijo Hi, je bil AD najverjetneje omejen

v osrednjem farmakokinetičnem prostoru (plazmi), zato pa je spojina 48/80 delovala tudi v farmakokinetičnem obrobju (posamezna tkiva) in od tu brez zaviralnega učinka AD lahko sprostita Hi, katerega raven je bila v primerjavi z našimi izsledki zato tudi višja

Vpliv antidepressivov na kinetiko eliminacije histamina iz plazme in njegovo pre-razporeditev v kri

Vrednosti k_{el} so bile pri majhnem odmerku fluvoksamina ter pri obeh odmerkih maprotilina pomenljivo večje kot pri kontrolni skupini podgan. Pri velikem odmerku fluvoksamina pa je k_{el} $0,0071 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$, torej manjša kot pri kontrolni skupini podgan ($0,0414 \pm 0,003 \text{ min}^{-1}$), vendar sta ravni Hi 5 in 15 minut po dodatku spojine 48/80 izjemno nizki ($1,46 \pm 0,09$ in $1,36 \pm 0,06 \text{ ng/ml}$), med seboj pa se ne razlikujeta pomenljivo, zato je vrednost te k_{el} kot pokazatelja eliminacije vprašljiva.

Hitrostna konstanta eliminacije Hi iz plazme podgan, ki so prejele majhen odmerek fluvoksamina oz. majhen in velik odmerek maprotilina, je pomenljivo večja kot pri podganah, ki AD niso prejele. Sklepamo, da AD vplivajo na eliminacijo Hi. Podobne izsledke so dobili pri raziskavah, ki preučevale vpliv TCA amitriptilina na eliminacijo Hi iz plazme podgane (71). Spremembe v koncentraciji Hi 5 in 15 minut po njegovi sprostitvi so nam služile zgolj za oceno očiščevanja Hi iz plazme, nismo pa iz teh poskusov mogli natančneje opredeliti, kateri procesi in v kolikšni meri doprinešajo k eliminaciji iz plazme. Raven merljivega Hi v plazmi je odraz ravnovesja med njegovima sproščanjem in eliminacijo. V naših poskusih smo sprožili eksplozivno sproščanje Hi s spojino 48/80, ki Hi iz mastocitnih zalog sprosti takoj, ko doseže ciljne celice – mastocite. Eliminacija, ki sledi sproščanju Hi s spojino 48/80, je počasnejša od eliminacije eksogenega Hi, ki je podgani vbrižgan (72). Temu botruje postopno razporejanje spojine 48/80 po tkivih; v trenutku, ko spojina 48/80 doseže tkivo, bogato z mastociti, sprosti Hi, ki se lahko *in situ* razgradi, še preden bi spojina 48/80 utegnila sprostiti večje količine Hi v tkivih, ki jih doseže kasneje. Proces eliminacije prevlada nad procesom sproščanja, zato naj bi se spremenila k_{el} . S tem smo poskušali razložiti vpliv, ki ga imata fluvoksamin in maprotilin na kinetiko eliminacije Hi. AD dosežeta tkiva, preden vbrižgamo spojino 48/80, saj jih dodamo 24 ur in 1 uro pred sproženjem sproščanja; v tem času AD že delujeta na mastocite in vzpostavita mehanizem zaviranja. Ko spojina 48/80 doseže mastocit, je mehanizem za sproščanje Hi pri njem že zavrt, količina sproščene Hi manjša, eliminacija manjših količin Hi pa zato bolj učinkovita in pospešena.

Z dodatnimi poskusi na podganah št. 16–24 smo poskušali dopolniti ali ovreči to hipotezo. Z dodatkom eksogenega Hi smo se izognili postopnemu izločanju Hi in predhodnemu vplivu AD na njegovo sproščanje. Meritve so pokazale statistično pomenljivo ($p < 0,05$) znižanje ravni Hi v primerjavi s kontrolno skupino podgan, ki AD niso prejele. Iz tega sklepamo, da AD neposredno pospešita eliminacijo Hi iz plazme. Farmakokinetika eliminacije Hi je dvostopenjska: v prvi (hitri) fazi prihaja do prerazporeditve Hi iz osrednjega farmakokinetičnega prostora v obrobje; v drugi (počasni) fazi je nižanje plazemske ravni Hi posledica njegove presnove. AD bi utegnili vplivati na drugo stopnjo, in sicer na encimski mehanizem razgradnje Hi. Trditve, ki smo jih v zvezi s to možnostjo zasledili v strokovni literaturi, si prihajajo v navzkrižje. Nowak in sod. (73) so hipotezo, da AD

prizadenejo razkroj Hi, ovrgli, medtem ko Purcell in sod. (74) takšno tezo zagovarjajo in celo predpostavljajo, da zaviralni vpliv AD na sproščanje Hi ni posledica zavrtega izločanja, pač pa izključno posekretornih mehanizmov – pospešene razgradnje in privzema Hi v tkiva.

Koncentracija Hi v plazmi kontrolne skupine podgan, ki smo jim Hi vbrizgali, ne da bi jim predhodno dali AD, je bila $62,97 \pm 8,99$ ng/ml, kar je 53,03 % celokupnega Hi v krvi ($118,75 \pm 27,48$ ng/ml). Irmanova in sod. so določili, da je v plazmi podgan, ki niso prejele eksogenega Hi, osnovna raven plazemskega Hi $18,84 \pm 1,40$ % celokupnega Hi v krvi, kar je pomenljivo manj, kot smo izmerili mi po dodatku eksogenega Hi. Ugotovili so tudi, da razmerje celokupni Hi v krvi : Hi v plazmi po vbrizgu eksogenega Hi s časom narašča (72), kar se ujema z izsledki naših kontrolnih meritev v dodatnem sklopu poskusov.

Domnevamo, da takšnim izidom botruje postopno prerazporejanje eksogenega Hi iz plazme (osrednji farmakokinetični prostor) v tkiva in celice, ki so v našem primeru kri oziroma krvni elementi (obrobni farmakokinetični prostor). Na celični ravni je vzrok lahko pospešen privzem Hi v celice (krvne elemente), bolj poudarjena razgradnja Hi ali kombinacija obojega. Na ravni organizma bi dinamiko tega prerazporejanja, ki sledi zakonom dvoprostorskega farmakokinetičnega modela, lahko natančneje opredelili le, če bi razpolagali z večjim številom vzorcev krvi, odvzetih v različnih časovnih razdobjih.

V naši raziskavi smo hoteli natančneje osvetliti vpliv AD na prerazporejanje Hi iz plazme v kri. V literaturi smo zasledili, da je privzem Hi v krvne celice zelo hiter (75, 76) in domnevali smo, da utegnejo AD pospešiti ta privzem. AD vplivajo na ločeni privzem 5-HT in Hi v celice; celo zavrto sproščanje Hi bi utegnilo biti odraz spremenjenega prevzema Hi in 5-HT v mastocit (77).

Domnevali smo, da AD prizadenejo privzem 5-HT v mastocit (kot to počnejo v osrednjem živčevju), kar potrjujejo izsledki nekaterih raziskav *in vitro*. Mastocit favorizirano privzema 5-HT pred Hi (74); zaradi oviranega privzema 5-HT bi bil povečan privzem Hi, kar bi se v naših poskusih *in vivo* odražalo v pospešeni eliminaciji Hi iz plazme. Pomankljivost takšne razlage je predvsem dejstvo, da maprotilin ne vpliva na prevzem 5-HT. Poleg tega moramo poudariti, da se 5-HT nahaja skupaj s Hi le v sekretornih zrnih mastocitov glodalcev in bi bilo zato projiciranje naših rezultatov v humano medicino vprašljivo.

Pri podganah smo 2 minuti po vbrizgu eksogenega Hi ($10 \mu\text{g/g}$) izmerili nižjo koncentracijo tako plazemskega kot tudi krvnega Hi v primerjavi z ustreznimi koncentracijami pri kontrolni skupini. Namen dodajanja eksogenega Hi je bil potrditi hipotezo, da preiskovana AD vplivata na hitrost eliminacije Hi iz plazme neodvisno od sproščanja Hi iz mastocitov. Koncentracije Hi pri podganah, ki so prejele AD, so bile v obeh primerih pomenljivo nižje kot pri kontrolni skupini, ki ni dobila AD. Sklepamo, da sta AD pospešila eliminacijo in tako izpolnila naše predpostavke.

Domnevali smo tudi, da je pospešena eliminacija posledica privzema Hi v celice in njegove vezave v tkivih. Našo domnevo bi potrdil vzpon ravni Hi v krvi na račun zmanjšane koncentracije Hi v plazmi, kar bi se kazalo v spremembi količnika $R_{\text{pl/kri}}$ – nižja vrednost

tega količnika bi bila posredni pokazatelj razporeditve Hi iz plazme v kri (krvne elemente). Eksperimentalni podatki so ta del naše hipoteze ovrgli, saj je bil $R_{pl/kri}$ pri podganah, ki so prejele fluvoksamin ($R_{pl/kri} = 0,69 \pm 0,13$) in maprotilin ($R_{pl/kri} = 0,68 \pm 0,16$), celo višji od $R_{pl/kri}$ pri kontrolni skupini podgan ($R_{pl/kri} = 0,54 \pm 0,12$). Sklepamo, da fluvoksamin in maprotilin eliminacije Hi ne pospešita tako, da bi spodbujala njegovo vezavo v krvne elemente. Domnevamo lahko, da je pospešena eliminacija Hi posledica njegove vezave v druga tkiva (jetno tkivo, mišičnina, maščevje), ki bi jo utegnili spodbuditi AD. V tkivih naj bi se Hi nadaljnje razkroji, zato je njegova raven izrazito padla tako v plazmi kot v krvi. Manj verjetno je, da Hi in AD kemično reagirata; nastala spojina bi bila v primerjavi z (bazično – polarno) molekulo Hi bolj hidrofobna in bi zato lažje prehajala v lipofilne farmakokinetične prostore (maščevje). Upoštevati moramo tudi možnost, da je AD omogočil vezavo Hi na beljakovine; ker smo jih med analizo vzorcev oborili, koncentracije tako vezanega Hi ne bi mogli izmeriti – ugotovljene nizke ravni Hi bi bile artefakt. Z nadaljnji raziskavami *in vitro* bi lahko pojasnili takšne hipoteze, ki so brez podrobnejših izsledkov zgolj na ravni špekulacij.

Preverili smo, da AD pri našem načinu določanja Hi ne vplivajo na fluorescenco končnega produkta, zato verjamemo, da preiskovana AD povzročita take farmakološke (biološke oziroma fizikalno-kemijske) spremembe v telesu, ki omogočajo hitrejšo eliminacijo Hi iz plazme.

Z izsledki naše raziskave lahko delno pojasnimo, zakaj se AD empirično priporočajo kot učinkovito zdravilo pri blaženju nekaterih oblik koprivnice nepojasnjene izvora (78–80). Prav tako lahko delno razložimo analgetični učinek AD, saj nižajo ravni Hi kot endogenega algogena (81, 82). AD zmanjšujejo eksperimentalno vnetje pri podgani (83, 84), kar utegne tudi biti povezano s sposobnostjo AD, da zavrejo sproščanje Hi in pospešijo njegovo eliminacijo, kot smo dokazali v naši raziskavi.

Zaključki

V naši raziskavi smo ugotovili, da fluvoksamin v odmerkih 2,7 mg/kg in 1,0 mg/kg ter maprotilin v odmerkih 2,0 mg/kg in 0,3 mg/kg pomenljivo vplivata na farmakokinetiko Hi pri podgani *in vivo*. AD smo podganam dali 24 ur in 1 uro pred dodatkom eksogenega Hi oziroma sproščevalca Hi iz mastocitnih zalog – spojine 48/80, s čemer smo dosegli, da se je AD široko porazdelil po organizmu in izzval maksimalne učinke.

Vsi odmerki obeh AD zavrejo predvideno povišanje koncentracije Hi po dodatku spojine 48/80. Odmerek 2,7 mg/kg fluvoksamina je v naši raziskavi pomenljivo bolj zavrl to povišanje kot enak odmerek fluvoksamina, ki je bil podgani dan le v enem odmerku uro pred indukcijo sproščanja Hi. Sposobnost zaviranja je bila odvisna tudi od odmerka AD – večji odmerki so izzvali bolj izrazito zaviranje.

Majhen odmerek fluvoksamina ter velik in majhen odmerek maprotilina so povzročili pospešeno eliminacijo Hi iz plazme poskusne živali.

Fluvoksamin in maprotilin v majhnih odmerkih pomenljivo znižata raven Hi, ki smo ga podgani dodali eksogeno, tako v krvi kot v plazmi. Nobeden od AD pa ne povzroči preazporeditve Hi iz plazemske tekočine v kri.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem svoji mentorci, doc. dr. Tatjani Irman - Florjanc, ki mi je s svojo iskrivo domiselnostjo odstrla prenekatero neznanko in me s svojim energičnim razumom popeljala v zapleteni svet znanstvenega raziskovanja.

Zahvaljujem se Mojci Kranjec in Neni Dolžan, ki sta s svojo potrpežljivostjo, delovnim elanom, spretnostjo in zanesljivostjo omogočili, da so se abstraktne zamisli udejanile v praksi.

Hvaležen sem vsem zaposlenim na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, ki so s svojo toplino in prijaznostjo omogočili, da sem preživel nepozabno leto.

Posebna zahvala gre vsem mojim, ki so mi bili vedno ob strani, ko sem jih potreboval. Nalogo posvečam Nini in Janu.

Literatura

1. Coomes MW. Amino acids metabolism. In: Devlin TM, ed. *Textbook of biochemistry with clinical correlations*. New York: Willey, 1997: 445–88.
2. Irman - Florjanc T, Erjavec F. Kinetics of histamine and tele-methylhistamine elimination from rat plasma. *Agents Actions* 1993; 38: 304–6.
3. Sheinmann BD, Devalia JL, Wylie G, Davies RJ. Histamine and N-t-methylhistamine in the circulation during intravenous infusion of histamine in normal volunteers. *Agents Actions* 1988; 25: 263–6.
4. Babe KS, Serafin WE. Histamine, bradikinin and their antagonists. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gillman A, eds. *Goodman & Gillman's the pharmacological basis of therapeutics, 9th ed*. New York: McGraw, 1996: 581–600.
5. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Pharmacology*. 3rd ed. Edinburgh: Churchill, 1996: 214–45, 576–95.
6. Kališnik M. *Oris histologije z embriologijo*. Ljubljana: DZS, 1990: 6–22.
7. Benyon RC. The human skin mast cell. *Clin Exp Allergy* 1989; 19: 375–87.
8. Irman - Florjanc T. *Prispevek k poznavanju kinetike histamina in tele-metilhistamina v organizmu pokusne živali* [doktorska disertacija]. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, 1993.
9. Irman - Florjanc T, Čarman - Kržan M, Erjavec F. A comparative study of histamine and methylhistamine levels in various species under physiological conditions. *Jugoslav Physiol Pharmacol Acta* 1978; 14: 92–4.
10. Oosting E, Neugebauer E, Keyzer JJ, Lorenz W. Determination of histamine in human plasma: the European external quality study 1988. *Clin Exp Allergy* 1990; 20: 348–57.
11. Khandelwal JK, Hough LB, Morrishow AM, Green JP. Measurement of tele-methylhistamine and histamine in human cerebrospinal fluid, urine, and plasma. *Agents Actions* 1982; 12: 583–90.
12. Brackett DJ, Hamburger SA, Lerner MR, et al. An assesment of plasma histamine concentrations during documented endotoxic shock. *Agents Actions* 1990; 31: 263–74.
13. Alam MK, Sasaki M, Watanabe T, Maeyama K. Simultaneous determinations of histamine and N-tau-methylhistamine by high-performance liquid chromatography-chemiluminescence coupled with immobilized diamine oxidase. *Analytic Biochem* 1995; 229: 26–34.
14. Keyzer JJ, Breukelman H, Wollhers BH, Richardson FJ, De Monchy JGR. Measurement of N-methylhistamine concentrations in plasma and urine as a parameter for histamine release during anaphylactoid reactions. *Agents Actions* 1985; 16: 76–9.
15. Theoharides TC, Singh LK, Boucher W, et al. Corticotropin-releasing hormone induces skin mast cell degranulation and increased vascular permeability, a possible explanation for its proinflammatory effects. *Endocrinology* 1998; 139: 403–13.
16. Kubota Y. Effects of tubocurarin on plasma histamine concentration in the rat. Corelation with the release of histamine from isolated mast cells. *Br J Anaesth* 1986; 58: 1397–403.

17. Cross LJ, Heaney LG, Ennis M. Histamine release from human bronchoalveolar lavage mast cells by neuropeptide Y and bradykinin. *Inflamm Res* 1997; 46: 306–9.
18. Fozard JR, Pfannkuche HJ, Schuurman HJ. Mast cell degranulation following adenosine A3 receptor activation in rats. *Eur J Pharmacol* 1996; 298: 293–7.
19. Di Bello MG, et al. Histamine release from rat mast cells induced by metabolic activation of drugs of abuse into free radicals. *Inflamm Res* 1998; 47: Suppl 1: 122–30.
20. Reeves JJ, Jones CA, Sheehan MJ, Vardey CJ, Whelan CJ. Adenosine A3 receptors promote degranulation of rat mast cells both *in vitro* and *in vivo*. *Inflamm Res* 1997; 46: 180–4.
21. Sakurai E, Gunji E, Iizuka Y, Hikichi N, Maeyama K, Watanabe T. In vivo measurement of histamine in rat blood effects of compound 48/80 and histamine receptor antagonists. *J Pharm Toxicol Methods* 1993; 29: 105–9.
22. Johnson HJ, Beaven FJ, Erjavec F, Brodie BB. Selective labeling and release of nonmast-cell histamine. *Life Sci* 1966; 5: 115–23.
23. Paton WDM. Compound 48/80: a potent histamine liberator. *Br J Pharmacol* 1951; 6: 499–508.
24. Kassel O, Amrani Y, Landry Y, Bronnet C. Mast cell activation involves plasma membrane potential and thapsigargin-sensitive calcium pools. *Fundam Clin Pharmacol* 1995; 9: 531–9.
25. Neugebauer E, Rixen D, Garcia - Caballero M, Scheid B, Lorenz W. Time sequence of histamine release and formation in rat endotoxic shock. *Schock* 1994; 1: 299–306.
26. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Robbin's Pathologic basis of disease, 5th ed.* Philadelphia: Saunders, 1994: 64–75.
27. Brandes LJ, Queen GM, LaBella FS. Potent interaction of histamine and polyamines at microsomal cytochrome P450, nuclei, and chromatin from rat hepatocytes. *Cell Biochem* 1998; 69: 233–43.
28. Horvat M. Anafilaktični sok. In: Kocjančič A, Mrevlje F, eds. *Interna medicina*. Ljubljana: EWO & DZS, 1998: 126–7.
29. Kaplan HI, Sadock BJ, Cancro R. *Synopsis of psychiatry: Behavioural sciences/Clinical psychiatry*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997: 933–1125.
30. Baldessarini RJ. Drugs and the treatment of psychiatric disorders: Depression and mania. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gillman A, eds. *Goodman & Gillman's the pharmacological basis of therapeutics, 9th ed.* New York: McGraw, 1996: 431–59.
31. Erjavec F. Pregled učinkov serotonina in njegovih antagonistov na osrednje živčevje. *Med Razgl* 1985; 2: 193–206.
32. Sket D. Patofiziološke osnove antidepressivnega zdravljenja. In: Romih J, Žmitek A, eds. *Zdravljenje z antidepressivi*. Begunje: Psihiatrična bolnišnica Begunje, 1996: 30–56.
33. Leonard BE. Mechanism of action of antidepressants. *CNS Drugs* 1995; 4: 1–12.
34. Leonard BE. *Fundamentals of Psychopharmacology*. New York: Wiley, 1998: 107–24.
35. 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; 123: 1331–6.
36. Jorgensen H, Knigge U, Kjaer A, Warberg J. Interactions of histaminergic and serotonergic neurons in the hypothalamic regulation of prolactin and ACTH secretion. *Neuroendocrinology* 1996; 64: 329–36.
37. Laitinen KSM, Tuomisto L, Laitinen JT. Endogenous serotonin modulates histamine release in the rat hypothalamus as measured *in vivo* microdialysis. *Eur J Pharmacol* 1995; 285: 159–64.
38. Fleckstein AE, Lookingland KJ, Moore KE. Effects of histamine on 5-hydroxytryptaminergic neuronal activity in the rat hypothalamus. *Eur J Pharmacol* 1994; 254: 35–42.
39. Leonard BE. New approaches to treatment of depression. *J Clin Psychiatry* 1996; 57: Suppl 4: 26–33.
40. Frazer A. Pharmacology of antidepressants. *J Clin Psychopharmacol* 1997; 17: Suppl 1: 1–18.
41. Jakovljević M. Klinična farmakologija antidepressivov: dileme, miti, dejstva. In: Romih J, Žmitek A, eds. *Zdravljenje z antidepressivi*. Begunje: Psihiatrična bolnišnica Begunje, 1996: 57–81.
42. Hyttel J. Pharmacological characterization of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *Int Clin Psychopharmacol* 1994; 9: Suppl 1: 19–26.
43. Lokar J. Uporaba antidepressivov v praksi. In: Romih J, Žmitek A, eds. *Zdravljenje z antidepressivi*. Begunje: Psihiatrična bolnišnica Begunje, 1996: 97–108.

44. Newhouse P. Use of serotonin selective reuptake inhibitors in geriatric depression. *J Clin Psychiatry* 1996; 57: Suppl 5: 12–22.
45. Wilde MI, Plosker GL, Benfield P. Fluvoxamine. An updated review of its pharmacology, and therapeutic use in depressive illness. *Drugs* 1993; 46: 895–924.
46. Kasper S, Dotsch M, Kick H, Vieira A, Moller HJ. Plasma concentrations of fluvoxamine and maprotiline in major depression: implications on therapeutic efficacy and side effects. *Eur Neuropsychopharmacol* 1993; 3: 13–21.
47. Hewer W, Rost W, Gattaz WF. Cardiovascular effects of fluvoxamine and maprotiline in depressed patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1995; 246: 1–6.
48. Dolenc A. Medicinska etika in deontologija. Ljubljana: Tangram, 1993: 126–7.
49. Nagy S, Nagy A, Adamicza A, Szabó I, Tárnoky K, Traub A. Histamine level changes in the plasma and tissues in hemorrhagic shock. *Circ Shock* 1986; 18: 227–39.
50. Johnson KB, Charya RV, Wiesmann WP, Pearce FJ. Plasma and tissue histamine changes during hemorrhagic shock in the rat. *Shock* 1995; 3: 343–9.
51. Izumi H, Hoshi S, Mue S, Takishima T, Sato H, Aoki T. The determination of blood histamine in asthmatic patients with a simple and sensitive method. *Tohoku J Exp Med* 1984; 143: 79–85.
52. Lorenz W, Neugebauer E. Fluorometric assays. In: Uvnas B, ed. *Histamine and histamine antagonists*. Berlin: Springer-Verlag, 1991: 9–30.
53. Shore PA, Burkhalter A, Cohen VH. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 1959; 127: 138–41.
54. Adamič Š. Temelji biostatistike. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, 1989: 44–53, 65–81.
55. Ludbrook J. Issues in biomedical statistics: comparing means under normal distribution theory. *Aust N Z J Surg* 1995; 65: 267–72.
56. Bourne DWA, Triggs EJ, Eadie MJ. *Pharmacokinetics for the non-mathematical*. Lancaster: MTB Press, 1969: 63–6.
57. Majcen M. *Vpliv antidepresivov na sproščanje histamina pri podgani* [raziskovalna naloga]. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, 1997.
58. Inase N, Schreck RE, Lazarus SC. Heparin inhibits histamine release from canine mast cells. *Am J Physiol* 1993; 264: 387–90.
59. Lucio J, D'Brot J, Guo CB, et al. Immunologic mast cell-mediated responses and histamine release are attenuated by heparin. *J Appl Physiol* 1992; 73: 1093–101.
60. Lorenz W, et al. Histamine release in man by propanidid and thiopentone: Pharmacological effects and clinical consequences. *Br J Anaesth* 1972; 44: 355–69.
61. Modrzejewski E, Bobyk A, Strobel - Kaminska T. Effect of urethane anaesthesia on histamine liberation. *Acta Physiol Pol* 1967; 18: 247–52.
62. Moss J. Histamine release in anaesthesia and surgery. *N Engl Reg Allergy Proc* 1985; 6: 28–36.
63. DeVane CL, Gill HS. Clinical pharmacokinetics of fluvoxamine: applications to dosage regimen design. *J Clin Psychiatry* 1997; 58: Suppl 5: 7–14.
64. Ferjan I, Erjavec F. Characteristics of the inhibitory effect of tricyclic antidepressants on histamine release from rat peritoneal mast cells. *Inflamm Res* 1996; 45: Suppl 1: 17–8.
65. Theoharides TC, Kops SK, Bondy PK, Askenase PW. Differential release of serotonin without comparable histamine under diverse conditions in the rat mast cell. *Biochem Pharmacol* 1985; 34: 1389–98.
66. Velasco A, Alamo C, Hervas J, Carvajal A. Effects of fluoxetine hydrochloride and fluvoxamine maleate on different preparations of isolated guinea pig and rat organ tissues. *Gen Pharmacol* 1997; 28: 509–12.
67. Lichtenstein LM, Gillespie E. The effects of the H1 and H2 antihistamines on allergic histamine release and its inhibition by histamine. *J Pharmacol Exp Ther* 1975; 192: 441–50.
68. Purcell WM, Hanahoe TH. Differential release of histamine and 5-hydroxytryptamin from rat mast cells: the contribution of amine uptake to the apparent pattern of secretion. *Agents Actions* 1990; 30: 38–40.
69. Irman - Florjanc T. Amytriptiline affects the kinetics of histamine in cat and in rat. *Inflamm Res* 1998: (v pripravi).
70. Berlin G, Enerback L. Non-differential inhibition of histamine and serotonin release from mast cells by amitriptyline. *Agents Actions* 1986; 18: 89–91.

71. Irman - Florjanc T, Stanovnik L. Tricyclic antidepressants change plasma histamine kinetics after its secretion induced by compound 48/80 in the rat. *Inflamm Res* 1998; 47: Suppl 1: 26–7.
72. Irman - Florjanc T, Erjavec F. Histamine and tele-methylhistamine ratios in rat blood as a function of time after i. v. injection of compound 48/80 or histamine. *Agents Actions* 1992; spec conf issue: 394–7.
73. Nowak JZ, Zawilska J. Histamine in the rat brain: effect of acute and chronic treatment with tricyclic antidepressants and H1-antihistaminics. *Polish J Pharmacol Pharmacy* 1985; 37: 147–62.
74. Purcell WM, Cohen DL, Hanahoe TH. Contribution of post-secretory mechanisms to the observed pattern of histamine and 5-hydroxytryptamine secretion from peritoneal rat mast cells in response to compound 48/80. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989; 90: 347–94.
75. Tasaka K. Histamine in blood. In: Uvnas B, ed. Histamine and histamine antagonists. New York: Springer-Verlag, 1991: 511–20.
76. Corbel S, Schneider E, Lemoine FM, Dy M. Murine hematopoietic progenitors are capable of both histamine synthesis and uptake. *Blood* 1995; 86: 531–9.
77. Ferjan I, Erjavec F. Changes in histamine and serotonin secretion from rat peritoneal mast cells caused by antidepressants. *Inflamm Res* 1996; 45: 141–4.
78. Omerod AD. Urticaria. Recognition, causes and treatment. *Drugs* 1994; 48: 717–39.
79. Sabroe RA, Kennedy CT, Archer CB. The effects of topical doxepin on responses to histamine, substance P and prostaglandin E2 in human skin. *Br J Dermatol* 1997; 137: 386–90.
80. Sheehan - Dare RA, Henderson MJ, Cotterill JA. Anxiety and depression in patients with chronic urticaria and generalised pruritus. *Br J Dermatol* 1990; 123: 769–74.
81. Terenius L. Biochemical mediators in pain. *Triangle* 1981; 20: 19–26.
82. Butler SH, Weil - Fugazza J, Godefroy F, Besson J. Reduction of arthritis and pain behaviour following chronic administration of amitriptyline or imipramine in rats with adjuvant-induced arthritis. *Pain* 1985; 23: 159–75.
83. Michelson D, Misiewicz - Poltorak B, Raybourne RB, Gold PW, Sernberg EM. Imipramine reduces the local inflammatory response to carrageenin. *Agents Actions* 1994; 42: 25–8.
84. Bianchi M, Rossoni G, Sacerdote P, Panerai AD, Berti F. Effects of clomipramine and fluoxetine on subcutaneous carrageenin-induced inflammation in rat. *Inflamm Res* 1995; 44: 466–9.