

Ocena wpływu wybranych jonów metali na efektywność transportu biernego i aktywnego imipraminy

The evaluation of effect of selected metal ions on the efficiency of passive and active transport of imipramine

Włodzimierz Opoka¹, Agata Kryczyk¹, Agata Krakowska¹,
Joanna Piotrowska¹, Joanna Gdula-Argasińska², Katarzyna Kała³,
Marlena Linek¹, Bożena Muszyńska³

¹ Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny,
Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej

² Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny, Zakład Radioligandów

³ Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny,
Katedra Botaniki Farmaceutycznej

Summary

Aim. The aim of the study was to evaluate the effect of zinc as well as magnesium or copper ions on the efficacy of passive transport of imipramine hydrochloride in *in vitro* model. According to results from passive transport, the next aim of the studies was to check the efficiency of active transport of imipramine hydrochloride in the presence or absence of zinc ions.

Method. The passive transport study was conducted in specially designed capsules, while CaCo-2 cell lines were used in active transport evaluation. Zinc, magnesium and copper content was determined by F-AAS method. The analysis of imipramine hydrochloride was performed using HPLC method.

Results. Mean concentrations of zinc, magnesium, and copper ions obtained in this experiment were as follows: 2.98, 1.34 and 3.52 mg/L, respectively. The presence of zinc ions increased the efficiency of active transport of imipramine hydrochloride by 39%. Furthermore, the transport of zinc ions in the presence of imipramine hydrochloride was 27% greater than that of the zinc-containing solutions without imipramine hydrochloride. The extending of the time of experiment from 30 to 60 minutes resulted in an increase in transport efficiency of more than 10% in both cases.

Conclusions. The efficiency of passive and active transport of imipramine hydrochloride is influenced by the presence of Mg, Zn and Cu ions. The passive transport of imipramine hydrochloride after 90 minutes of experiment was the most effective in the presence of copper and zinc ions. Further studies conducted on the CaCo-2 cell line indicated a clear positive interaction of imipramine – zinc.

Słowa klucze: depresja, imipramina, transport

Key words: depression, imipramine, transport

Wstęp

Na podstawie dotychczasowych badań można stwierdzić, że znaczącą rolę w patogenezie zaburzeń afektywnych odgrywa nadmierna aktywność układu glutaminergicznego. Ważnym mechanizmem działania przeciwdepresyjnego jest więc hamowanie aktywności kluczowego receptora tego układu – receptora N-metylo-D-asparaginowego (NMDA). Jest to receptor jonotropowy zbudowany z podjednostek białkowych tworzących kanał jonowy przepuszczalny dla jonów Ca^{2+} , Na^{+} i K^{+} [1]. Oprócz miejsca wiążącego agonistę (kwas glutaminowy) w kompleksie receptorowym NMDA znajdują się również miejsca wiążące dla wielu substancji modulujących jego aktywność, m.in. miejsce wiążące jony magnezu(II) warunkujące blokowanie kanału jonowego oraz miejsce wiążące jony cynku(II) odpowiedzialne za hamowanie aktywacji receptora NMDA [2]. Innym receptorem jonotropowym układu glutaminergicznego jest receptor AMPA, w którego wypadku aktywacja związana jest z działaniem przeciwdepresyjnym [3]. Modulatorem aktywności tego receptora są jony cynku(II), które w zależności od stężenia zwiększają jego aktywność lub całkowicie blokują ten kanał jonowy. W wielu badaniach patogenezę oraz leczenie depresji powiązano więc ze stężeniem takich pierwiastków, jak cynk, magnez, miedź oraz żelazo [4–9]. W modyfikacji przebiegu glutaminergicznego poprzez wpływ na receptor NMDA upatruje się szansę na poprawę skuteczności farmakoterapii depresji. Stanisławska i wsp. [10] wykazali, że kobiety z wyższym poziomem jonów Mg i Zn w surowicy miały mniej objawów depresyjnych. Wyniki badań przeprowadzonych przez Ranjbar i wsp. [11] sugerują, że jednoczesna suplementacja cynku wraz z lekami przeciwdepresyjnymi poprawia ich skuteczność w porównaniu z placebo lub standardową terapią samymi lekami. Natomiast poprzez analizę porównawczą stężeń jonów miedzi w surowicy pacjentów próbuje się wykazać związek pomiędzy stężeniem tego pierwiastka we krwi a objawami depresyjnymi i niepokojem [12–18]. Jony cynku(II) oraz magnezu(II) należą do istotnych modulatorów przebiegu glutaminergicznego, dlatego mogą odgrywać ważną rolę w patogenezie chorób afektywnych [3, 19–22].

Chlorowodorek imipraminy (IMI), lek I generacji z grupy trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych, został wybrany jako modelowy do badań wpływu wybranych metali w transporcie biernym i czynnym tego związku. Poleszak i wsp. [4] wykazali zwiększenie aktywności przeciwdepresyjnej w teście wymuszonego pływania u myszy, którym podawano jednocześnie IMI oraz magnez. Prowadzone były również badania nad wpływem terapii imipraminą na poziom magnezu oraz cynku [7, 11]. Zgodnie z badaniami przeprowadzonymi przez Siwka i wsp. [5] suplementacja cynkiem zwiększa skuteczność i szybkość początkowej reakcji terapeutycznej na leczenie IMI u pacjentów niereagujących wcześniej na farmakoterapię przeciwdepresyjną. Ponadto jony cynku występują w wysokim stężeniu w mózgu (średnio ok. 150 μM), a obszarem, w którym znajdują się największe ilości tego pierwiastka, jest hipokamp [23].

Ocena wydajności transportu substancji czynnych przez sztuczne błony oraz monowarstwę komórek jest kluczowym etapem procesu badań nad rozwojem każdego

potencjalnego leku. Badania te są szczególnie istotne w wypadku leków ulegających wchłanianiu po podaniu doustnym. W związku z tym, że suplementacja cynku podczas leczenia imipraminą ma pozytywny wpływ na terapię depresji, postanowiono zbadać ich wzajemną interakcję na etapie transportu.

Celem prezentowanej pracy była ocena oddziaływania wybranych biopierwiastków (Zn, Cu, Mg) i imipraminy na etapie transportu biernego. Badanie transportu biernego przeprowadzono w specjalnie skonstruowanych na potrzeby eksperymentu kapsułach. Ze względu na wyniki uzyskane w eksperymencie, w którym stosowano transport bierny, kolejnym celem była ocena wpływu cynku na transport aktywny chlorowodoru imipraminy w modelu *in vitro*. Zastosowano wtedy zaprojektowane na potrzeby eksperymentu termostatowane urządzenie Transcell-2017, w którym wykorzystano monowarstwę komórek epitelialnych CaCo-2.

Materialy i metody

Odczynniki

Chlorek cynku bezwodny oraz chlorek magnezu bezwodny zostały zakupione w Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. Chlorek sodu zakupiono w Alfa Aesar[®], Kandel, Germany, natomiast chlorek miedzi(II) bezwodny w POCh SA, Gliwice, Polska. Chlorkowodorek imipraminy pochodził z Jelfa SA, Jelenia Góra, Polska. Woda czterokrotnie destylowana o przewodnictwie poniżej 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ została otrzymana w aparacie HLP 5 (Hydrolab Poland). Wzorce zawartości jonów cynku(II), magnezu(II) i miedzi(II) o stężeniu 1 g/L zostały zakupione w Okręgowym Urzędzie Miar w Łodzi, Polska.

Przygotowanie roztworów – transport bierny

Do badania transportu biernego IMI sporządzono roztwór chlorowodoru imipraminy o stężeniu $2 \cdot 10^{-2}$ mol/L w roztworze chlorku sodu o stężeniu fizjologicznym 0,9%. Roztwory chlorku cynku(II), chlorku magnezu(II) i chlorku miedzi(II) o stężeniu $2 \cdot 10^{-2}$ mol/L także sporządzono przez rozpuszczenie odpowiednich soli tych metali w 0,9% roztworze chlorku sodu. Roztwory wzorcowe zastosowane do oznaczeń metodą F-AAS przygotowywano przez rozcieńczenie certyfikowanych materiałów odniesienia: cynku(II), magnezu(II) i miedzi(II) również w roztworze soli fizjologicznej. Wyznaczono krzywe kalibracyjne dla: cynku(II) w zakresie 0,1–1 mg/L, dla magnezu(II) w zakresie 0,075–0,3 mg/L, dla miedzi(II) w zakresie 0,1–1 mg/L.

W badaniu transportu biernego wykorzystano autorskie teflonowe jednokomorowe kapsuły (ryc. 1).

Dwa otwory w kapsułach zostały przykryte błoną półprzepuszczalną wykonaną z regenerowanej celulozy (Serva, VISKING[®] Dialysis Tubing, MWCO 12000-14000). Do kapsuły wprowadzano około 4 mL roztworów otrzymanych przez zmieszanie w stosunku objętościowym 1:1 odpowiednio: IMI + 0,9% NaCl, IMI + Zn^{2+} , IMI + Cu^{2+} , IMI + Mg^{2+} , Zn^{2+} + 0,9% NaCl, Cu^{2+} + 0,9% NaCl, Mg^{2+} + 0,9% NaCl. Kapsuły po napełnieniu badanymi roztworami o znanym stężeniu umieszczano w kolbach o po-

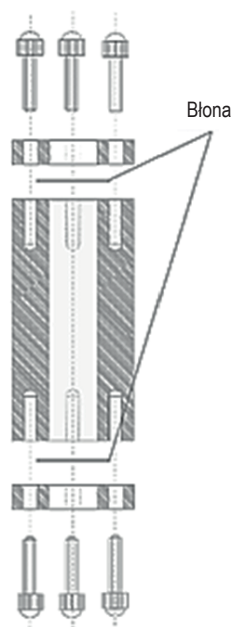
jemności 250 mL zawierających 0,9% roztwór NaCl, następnie w aparacie Gastroel-2014 inkubowano je w temperaturze 37°C w ciągu 90 minut [24]. Próbkę badanego roztworu w objętości 2 mL były pobierane z kolb po czasie: 15, 30, 45, 60, 75 i 90 minut. Pierwiastki w uzyskanych próbkach oznaczano metodą F-AAS, natomiast imipraminę oznaczono metodą RP-HPLC.

Przygotowanie roztworów – transport aktywny

Badania transportu aktywnego wykonano po sporządzeniu roztworu chlorowodoru imipraminy o stężeniu 120 mg/L oraz roztworu chlorku cynku(II) o stężeniu 25 mg/L w roztworze soli fizjologicznej. Roztwór wzorcowy cynku zastosowany do oznaczeń techniką F-AAS przygotowywano przez rozcieńczenie soli cynku(II) również w roztworze soli fizjologicznej. Roztwory wzorcowe imipraminy do oznaczeń metodą RP-HPLC sporządzono przez rozpuszczenie chlorowodoru imipraminy w roztworze soli fizjologicznej oraz przygotowano krzywą wzorcową w zakresie stężeń od 0,0625 do 1 mg/mL.

Transport aktywny

Ludzkie komórki nowotworowe nabłonka jelita CaCo-2 (*colorectal adenocarcinoma*, HTB-37) hodowano w pożywce Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) z dodatkiem 15% FBS oraz dodatkiem antybiotyków (penicylina 100 IU/mL, streptomycyna 100 µg/mL) (ATTC, Manassas, VA, USA). Kultury mycelialne prowadzono w inkubatorze w temperaturze 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO₂, w butelkach do hodowli typu Falcon o powierzchni 75 cm², do momentu osiągnięcia gęstości komórek 5·10⁵. Dodatkowo każdego dnia przeprowadzano obserwacje mikroskopowe w celu wykazania prawidłowej morfologii komórek (Olympus, Tokyo, Japan). Określano żywotność komórek metodą wykluczania z błękitem trypanu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). We wszystkich hodowlach komórki wykazywały prawidłowy kształt. Odsetek komórek, które uległy adhezji do podłoża, wynosił każdorazowo 95–100%. Do końcowych doświadczeń komórki CaCo-2 wysiano na membrany PET (wielkość porów 0,4 µm) w systemie 6-dołkowym SPL Life Sciences (SPL Life Sciences, Korea) o gęstości 2·10⁴ komórek/dołek. Komórki hodowano przez 21 dni, zmieniając podłoże co 2–3 dni. Integralność monowarstwy komórek nabłonka jelita grubego określono przez pomiar transnabłonkowej oporności elektrycznej (TEER) za pomocą układu elektrycznego opornika nabłonkowego Millicell ERS-2 Volt-Ohm Meter (Millipore, Merck, Darmstadt, Niemcy). W doświadczeniach wykorzystano komórki CaCo-2 z wartościami TEER powyżej 800 Ω·cm², wskazującymi na szczelność połączeń między komórkami nabłonka jelitowego użytego do eksperymentu.



Rycina 1. Schemat kapsuły do badania transportu biernego

Insert system z komórkami CaCo-2 został umieszczony w pojemniku tak, aby ich warstwa stykała się z roztworem soli fizjologicznej. Na powierzchnię monowarstwy komórek CaCo-2 nanoszono roztwór zawierający jony cynku, roztwór chlorowodoru imipraminy lub roztwór chlorowodoru imipraminy z cynkiem (supernatant). Każdy z wariantów inkubowano w temperaturze 37° C w czasie 30 i 60 minut (maksymalny czas przeżywalności komórek, określony eksperymentalnie) w aparacie Transcell-2017 (urządzenie skonstruowane na potrzeby eksperymentu). Do analizy na zawartość cynku (F-AAS) i imipraminy (RP-HPLC) pobierano próbki supernatantu (powyżej monowarstwy komórek CaCo-2) i przesączu (poniżej monowarstwy komórek CaCo-2).

Oznaczanie badanych pierwiastków metodą F-AAS

Zawartość cynku(II), magnezu(II) i miedzi(II) oznaczono metodą płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej (techniką płomieniową – F-AAS) z użyciem Spektrometru iCE serii 3000 (Thermo Scientific, Wielka Brytania) [25, 26]. Ocenę oznaczeń przeprowadzono z wykorzystaniem certyfikowanego materiału roślinnego, liści Virginia Tobacco (CTA-VTL-2). Parametry pracy atomizera przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Parametry pracy spektrometru podczas analizy cynku(II), magnezu(II) i miedzi(II) metodą F-AAS

Parametry	Zn	Mg	Cu
Typ płomienia/paliwo	Acetylen/powietrze		
Długość fali [nm]	213,9	285,2	324,8
Szerokość szczeliny [nm]	0,7	0,2	0,7
Czas pomiaru [s]	2s		
Typ dopasowania krzywej	Liniowa, metodą najmniejszych kwadratów		
Współczynnik determinacji	R ² = 0,9986	R ² = 0,9994	R ² = 0,9976
Zakres stężeń [µg/g]	0,1–1	0,075–0,3	0,1–1

Oznaczenie chlorowodoru imipraminy metodą RP-HPLC

Roztwory zawierające chlorowodorek imipraminy zostały odparowane (wyparka Büchi, Niemcy) pod ciśnieniem 200 mBa w 40°C do sucha. Zateżony analit rozpuszczono w metanolu i przesączono przez bibułę filtracyjną Whatman nr 3. Ekstrakty rozpuszczono ilościowo w 1,5 mL metanolu i poddano analizie metodą RP-HPLC z użyciem aparatu Hitachi HPLC (Merck, Japonia) wyposażonego w pompę typu L-7100, Purospher® RP-18 (4 × 200 mm, 5 µm) termostatowaną w 25°C, detektor UV pracujący przy λ = 275 nm. Zastosowano rozdział izokratyczny w fazie ruchomej w następujący sposób: metanol o szybkości przepływu 1 mL/min. Analizę ilościową imipraminy przeprowadzono za pomocą krzywej kalibracyjnej z założeniem liniowej wielkości powierzchni pod pikiem i stężenia wzorca odniesienia. Ocenę ilościową

przeprowadzono przez pomiar powierzchni pików w odniesieniu do krzywej standardowej uzyskanej z pięciu stężeń (0,0625 do 1 mg/mL). Wyniki wyrażono w mg/L.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wyników badań przeprowadzono testem One-Way ANOVA z testem *post hoc* wielokrotnych porównań Tukeya (GraphPad Instat 3). Za istotne przyjęto różnice między średnimi na poziomie $p \leq 0,05$.

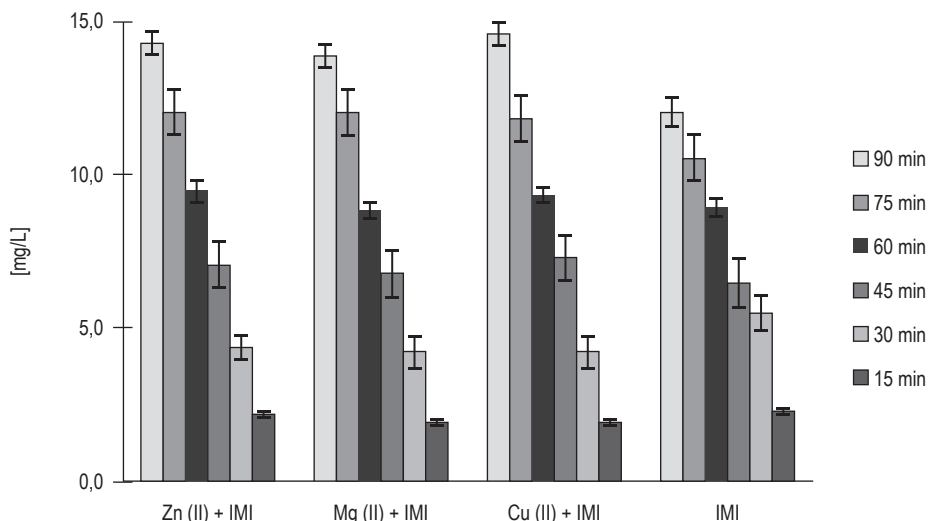
Wyniki

Opracowana procedura przygotowania próbek do analizy, a także zastosowana metoda F-AAS do oceny ilościowej badanych pierwiastków oraz RP-HPLC do oceny ilościowej chlorowodoru imipraminy pozwoliły na dokładną i szybką analizę.

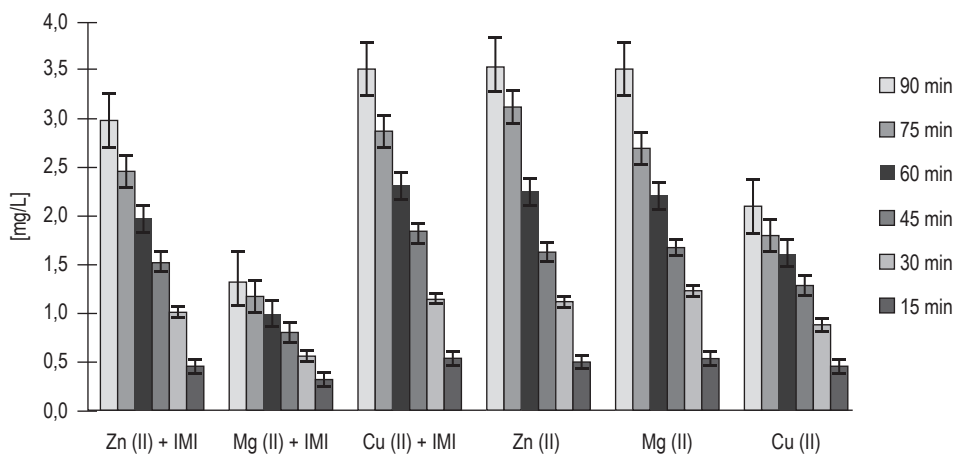
W celu oceny wpływu wybranych jonów metali na transport imipraminy eksperyment wykonano w dwóch modelach *in vitro*: transport bierny i aktywny.

W modelu transportu biernego w pierwszym wariancie zbadano wydajność przechodzenia chlorowodoru imipraminy przez membranę półprzepuszczalną, a w drugim wariancie wydajność dyfuzji tego związku w obecności jonów cynku(II), magnezu(II) lub miedzi(II) (ryc. 2).

Oznaczono, że średnie stężenie chlorowodoru imipraminy po 90 minutach eksperymentu wynosiło 12,11 mg/L, natomiast średnie stężenia badanego leku w obecności jonów Zn(II), Mg(II) lub Cu(II) wynosiły odpowiednio 14,32 mg/L, 13,83 mg/L



Rycina 2. Wykres zmian stężeń [mg/L] chlorowodoru imipraminy w roztworze 0,9% NaCl dla badań prowadzonych w obecności jonów cynku(II), magnezu(II) i miedzi(II) oraz dla chlorowodoru imipraminy w zależności od czasu eksperymentu



Rycina 3. Wykres zmian stężeń [mg/L] cynku(II), magnezu(II) i miedzi(II) dla badań prowadzonych w obecności chlorowodoru imipraminy oraz dla metali w zależności od czasu eksperymentu

i 14,59 mg/L. Wykazano różnice istotne statystycznie między stężeniami IMI vs. IMI + Cu(II). Transport bierny chlorowodoru imipraminy po 90 minutach zachodził więc najbardziej efektywnie dla prób w obecności jonów Cu(II).

W kolejnym etapie badań dokonano oceny wpływu obecności chlorowodoru imipraminy na wydajność przechodzenia jonów cynku(II), magnezu(II) i miedzi(II) przez błonę półprzepuszczalną (ryc. 3).

Analizę rozpoczęto od przeprowadzenia eksperymentu na roztworach zawierających tylko jony badanych metali. Wykazano różnice istotne statystycznie między stężeniami Cu(II) vs. Zn(II) oraz Cu(II) vs. Mg(II) po 90 minutach inkubacji. Stężenie Cu(II) było znacząco niższe od stężeń Zn(II) i Mg(II). Następnie oznaczono stężenia badanych metali otrzymane w roztworach zawierających również badany lek. Średnie stężenia jonów cynku(II), magnezu(II) i miedzi(II) otrzymane w eksperymentach prowadzonych w obecności chlorowodoru imipraminy po 90 minutach wynosiły odpowiednio: 2,98 mg/L, 1,34 mg/L i 3,52 mg/L.

Analizując zmiany stężeń w czasach 15, 30, 45, 60 i 90 minut dla jonów cynku(II) i magnezu(II), w tym wariantcie badań wykazano ich niższe wartości w porównaniu z analogicznymi próbami przeprowadzonymi bez dodatku leku, natomiast w wypadku miedzi(II) przeciwnie – otrzymane stężenia były wyższe w porównaniu z roztworami zawierającymi dodatkowo chlorowodorek imipraminy.

Omówienie wyników

Imipramina jest modelowym lekiem przeciwdepresyjnym o przebadanej farmakokinetyce, natomiast brakuje badań opisujących wpływ jonów metali na wydajność transportu tego leku. Na ilość dostarczanych do tkanek w organizmie człowieka pierwiastków wpływ mają też związki organiczne o zdolnościach kompleksujących. Takie tendencje zauważono

w badaniach dotyczących depresji, w których stosowano imipraminę i cynk [11]. Hamujący wpływ obecności magnezu i wapnia na wchłanianie tetracykliny jest powszechnie znany. W piśmiennictwie można znaleźć informacje o hamującym wpływie wchłaniania lewofloksacyny w obecności wodorotlenku glinu [27]. Podobny efekt zaobserwowano też w wypadku cyprofloksacyny i ofloksacyny w obecności siarczynu(VI) żelaza(II) [28]. Jony cynku, magnezu i miedzi ulegają wchłanianiu z pożywienia na drodze transportu biernego, dlatego wskazane wydawało się zbadanie wpływu ich obecności na wydajność transportu imipraminy. Cynk z pożywienia wchłania się w jelicie cienkim dzięki transporterem ZIP4 oraz na drodze transportu biernego, podobnie jak magnez i miedź [29–31].

Poddając analizie oznaczone stężenia metali, wykazano różnice istotne statystycznie między Cu(II) + IMI vs. Mg(II) + IMI oraz Zn(II) + IMI vs. Mg(II) + IMI. Porównano również stężenia cynku(II), magnezu(II) i miedzi(II) otrzymanych w dwóch wariantach eksperymentu: badane metale oraz badane metale z dodatkiem chlorowodoru imipraminy. Wykazano następujące istotne różnice statystyczne: Cu(II) vs. Zn(II) + IMI, Cu(II) vs. Mg(II) + IMI, Zn(II) vs. Mg(II) + IMI, Cu(II) vs. Cu(II) + IMI, Zn(II) vs. Zn(II) + IMI, Mg(II) vs. Mg(II) + IMI. W wyniku przeprowadzonych oznaczeń metali wykazano, że dodatek badanego leku wpływa na poprawę efektywności transportu biernego Cu(II). Efektywność transportu jonów cynku ulegała niewielkiemu obniżeniu w obecności imipraminy. Transport jonów magnezu był zdecydowanie bardziej efektywny w roztworach bez dodatku chlorowodoru imipraminy.

Ze względu na największe znaczenie cynku w terapii depresji do badań transportu aktywnego wybrano wariant: osobno chlorowodorek imipraminy, jony cynku oraz jony cynku z chlorowodorkiem imipraminy. Analizując wyniki oznaczeń przeprowadzonych dla cynku, stwierdzono, że transport tego pierwiastka w obecności imipraminy jest o 27% wyższy niż w wypadku analiz przeprowadzonych dla roztworów zawierających sam cynk bez imipraminy. Ponadto wydłużenie czasu eksperymentu z 30 do 60 minut spowodowało również wzrost efektywności transportu o ponad 10% (tab. 2).

Tabela 2. Zawartość cynku oznaczona w próbkach uzyskanych po przeprowadzeniu transportu aktywnego z imipraminą lub bez imipraminy

Próbka	\bar{n} [mg/L]	SD	\bar{p} [mg/L]	SD
30 min				
Komórki kontrolne	—	—	—	—
IMI + Zn	4,19	1,36	15,68	2,16
Zn	5,45	1,18	11,34	1,65
60 min				
IMI + Zn	2,71	0,67	18,20	1,21
Zn	4,66	0,56	13,41	1,01

— nie oznaczono, n = 3 powtórzenia; $\bar{p} \leq 0,05$; \bar{n} – supernatant; \bar{p} – próbka poniżej monowarstwy komórkowej

Podobną tendencję zaobserwowano przy okazji badań transportu samej imipraminy. W tym wypadku dodatek jonów cynku spowodował zwiększenie efektywności trans-

portu aktywnego samej imipraminy o 39%, a wydłużenie czasu analizy spowodowało wyraźne zwiększenie ilości imipraminy w przesączu (tab. 2 i 3).

Tabela 3. Zawartość imipraminy oznaczona w próbkach uzyskanych po przeprowadzeniu transportu aktywnego z cynkiem lub bez cynku

Próbka	\bar{n} [mg/L]	SD	\bar{p} [mg/L]	SD
30 min				
Komórki kontrolne	—	—	—	—
IMI + Zn	38,03	3,87	6,92	2,27
IMI	26,17	3,06	4,18	0,77
60 min				
IMI + Zn	35,21	1,89	10,51	3,85
IMI	28,12	4,96	10,98	5,87

— nie oznaczono, n = 3 powtórzenia; $\bar{p} \leq 0,05$; \bar{n} – supernatant; \bar{p} – próbka poniżej monowarstwy komórkowej

Wnioski

1. Efektywność transportu biernego chlorowodoru imipraminy przez membranę półprzepuszczalną zależy od obecności wybranych do eksperymentu jonów metali, a zwłaszcza jonów cynku i miedzi.
2. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że przez monowarstwę komórek CaCo-2 zarówno w wypadku badania efektywności przejścia z roztworu imipraminy, jak i cynku większe ich ilości oznaczono, gdy obie substancje były stosowane razem. Wynika z tego, że zachodzi wyraźna pozytywna interakcja imipramina–cynk ułatwiająca ich transport przez komórki – przede wszystkim w transporcie aktywnym.
3. Wykazano, że w wypadku cynku transport tego biopierwiastka jest zależny od czasu. Dla analizy imipraminy takiej tendencji nie stwierdzono.
4. Na podstawie uzyskanych wyników badań można przypuszczać, że jednoczesne zastosowanie imipraminy i cynku w warunkach *in vitro* może zwiększać ich ilość w tkankach.

Piśmiennictwo

1. Li S, Wong AH, Liu F. *Ligand-gated ion channel interacting proteins and their role in neuroprotection*. Front. Cell Neurosci. 2014; 8: 125.
2. Amico-Ruvio SA, Murthy SE, Smith TP, Popescu GK. *Zinc Effects on NMDA Receptor Gating Kinetics*. Biophys. J. 2011; 100(8): 1910–1918.
3. Pochwat B, Sowa-Kucma M, Kotarska K, Misztak P, Nowak G, Szewczyk B. *Antidepressant-like activity of magnesium in the olfactory bulbectomy model is associated with the AMPA/BDNF pathway*. Psychopharmacology (Berl.) 2015; 232(2): 355–367.

4. Poleszak E, Właż P, Szewczyk B, Kędzierska E, Wyska E, Librowski T. *Enhancement of antidepressant-like activity by joint administration of imipramine and magnesium in the forced swim test: behavioral and pharmacokinetic studies in mice.* Pharmacol. Biochem. Behav. 2005; 81(3): 524–529.
5. Siwek M, Dudek D, Paul IA, Sowa-Kućma M, Zięba A, Popik P i wsp. *Zinc supplementation augments efficacy of imipramine in treatment resistant patients: A double blind, placebo-controlled study.* J. Affect. Disord. 2009; 118(1–3): 187–195.
6. Styczeń K, Siwek M, Sowa-Kućma M, Dudek D, Reczyński W, Szewczyk B i wsp. *The serum magnesium concentration as a potential state marker in patients with unipolar affective disorder.* Psychiatr. Pol. 2015; 49(6): 1265–1276.
7. Siwek M, Dudek D, Schlegel-Zawadzka M, Morawska A, Piekoszewski W, Opoka W i wsp. *Serum zinc level in depressed patients during zinc supplementation of imipramine treatment.* J. Affect. Disord. 2010; 126(3): 447–452.
8. Rafało-Ulinska A, Piotrowska J, Kryczyk A, Opoka W, Sowa-Kucma M, Misztak P i wsp. *Zinc transporters protein level in postmortem brain of depressed subjects and suicide victims.* J. Psychiatr. Res. 2016; 83: 220–229.
9. Kim J, Wessling-Resnick M. *Iron and mechanisms of emotional behavior.* J. Nutr. Biochem. 2014; 25(1): 1101–1107.
10. Stanisławska M, Szkup-Jabłońska M, Jurczak A, Wieder-Huszla S, Samochowiec A, Jasiewicz A i wsp. *The severity of depressive symptoms vs. serum Mg and Zn levels in postmenopausal women.* Biol. Trace Elem. Res. 2014; 157(1): 30–33.
11. Ranjbar E, Masoumeh SK, Mohammad-Shirazi M, Nasrollahzadeh J, Rashidkhani B, Shams J i wsp. *Effects of zinc supplementation in patients with major depression: A randomized clinical trial.* Iran J. Psychiatry 2013; 8(2): 73–79.
12. Szkup M, Jurczak A, Brodowska A, Brodowska A, Nociń I, Chlubek D i wsp. *Analysis of relations between the level of Mg, Zn, Ca, Cu, and Fe and depressiveness in postmenopausal women.* Biol. Trace Elem. Res. 2017; 176(1): 56–63.
13. Islam MR, Ahmed MU, Mitu SA, Islam MS, Rahman GK, Qusar MM i wsp. *Comparative analysis of serum zinc, copper, manganese, iron, calcium, and magnesium level and complexity of interelement relations in generalized anxiety disorder patients.* Biol. Trace Elem. Res. 2013; 154(1): 21–27.
14. Styczeń K, Sowa-Kućma M, Siwek M, Dudek D, Reczyński W, Misztak P i wsp. *Study of the serum copper levels in patients with major depressive disorder.* Biol. Trace Elem. Res. 2016; 174(2): 287–293.
15. Russo AJ. *Analysis of plasma zinc and copper concentration, and perceived symptoms, in individuals with depression, post zinc and anti-oxidant therapy.* Nutr. Metab. Insights 2011; 4: 19–27.
16. Bandmann O, Weiss KH, Kaler SG. *Wilson's disease and other neurological copper disorders.* Lancet Neurol. 2015; 14(1): 103–113.
17. Patil M, Sheth KA, Krishnamurthy AC, Devarbhavi H. *A review and current perspective on Wilson disease.* J. Clin. Exp. Hepatol. 2013; 3(4): 321–336.
18. Prasad AS. *Zn: An overview.* Nutrition 1995; 11(1 Suppl): 93–99.
19. Grzywacz A, Gdula-Argasińska J, Muszyńska B, Tyszcza-Czochara M, Librowski T, Opoka W. *Metal responsive transcription factor 1 (MTF-1) regulates zinc dependent cellular processes at the molecular level.* Acta Biochim. Pol. 2015; 62(3): 491–498.
20. Szewczyk B, Poleszak E, Sowa-Kućma M, Siwek M, Dudek D, Ryszewska-Pokraśniewicz B i wsp. *Antidepressant activity of zinc and magnesium in view of the current hypotheses of antidepressant action.* Pharmacol. Rep. 2008; 60(5): 588–599.

21. Landsdown AB, Mirastschijski U, Stubbs N, Scanlon E, Agren MS. *Zinc in wound healing: Theoretical, experimental, and clinical aspects*. Wound Repair Regen. 2007; 15(1): 2–16.
22. Młyniec K. *Zinc in the Glutamatergic Theory of Depression*. Curr. Neuropharmacol. 2015; 13(4): 505–513.
23. Grabrucker L, Magali R, Craig C, Garner L. *Brain-delivery of zinc-ions as potential treatment for neurological diseases: Mini review*. Drug Deliv. Lett. 2011; 1(1): 13–23.
24. Opoka W, Muszyńska B, Rojowski J, Rumian J. *Gastroel-2014* 2016 Poland Patent Application P 417238.
25. Reczyński W, Muszyńska B, Opoka W, Smalec A, Sułkowska-Ziaja K, Malec M. *Comparative study of metals accumulation in cultured in vitro mycelium and naturally grown fruiting bodies of Boletus badius and Cantharellus cibarius*. Biol. Trace Elem. Res. 2013; 155(1–3): 355–362.
26. Krakowska A, Reczyński W, Muszyńska B. *Optimization of the liquid culture medium composition to obtain the mycelium of Agaricus bisporus rich in essential minerals*. Biol. Trace Elem. Res. 2016; 173(1): 231–240.
27. Tanaka M, Kurata T, Fujisawa C, Ohshima Y, Aoki H, Okazaki O i wsp. *Mechanistic study of inhibition of levofloxacin absorption by aluminum hydroxide*. Antimicrob. Agents Chemother. 1993; 37(10): 2173–2178.
28. Lehto P, Kivistö KT, Neuvonen PJ. *The effect of ferrous sulphate on the absorption of norfloxacin, ciprofloxacin and ofloxacin*. Br. J. Clin. Pharmacol. 1994; 37(1): 82–85.
29. Gopalsamy GL, Alpers DH, Binder HJ, Tran CD, Ramakrishna BS, Brown I i wsp. *The relevance of the colon to zinc nutrition*. Nutrients 2015; 7(1): 572–583.
30. Hardwick LL, Jones MR, Brautbar N, Lee DB. *Site and mechanism of intestinal magnesium absorption*. Miner. Electrolyte Metab. 1990; 16(2–3): 174–180.
31. Price KA, Crouch PJ, Volitakis I, Paterson BM, Lim S, Donnelly PS i wsp. *Mechanisms controlling the cellular accumulation of copper bis(thiosemicarbazonato) complexes*. Inorg. Chem. 2011; 50(19): 9594–9605.

Adres: Bożena Muszyńska
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Wydział Farmaceutyczny
Katedra Botaniki Farmaceutycznej
30-688 Kraków, Medyczna 9
e-mail: bozena.muszynska@uj.edu.pl

Otrzymano: 5.12.2017

Zrecenzowano: 31.03.2018

Otrzymano po poprawie: 5.04.2018

Przyjęto do druku: 14.06.2018