

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

VESNA GRGUR

**VPLIV INHIBITORJEV ENCIMA HISTAMIN-N-
METILTRANSFERAZE NA PRIVZEM HISTAMINA V
ASTROCITE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Vesna GRGUR

**VPLIV INHIBITORJEV ENCIMA HISTAMIN-N-METILTRANSFERAZE
NA PRIVZEM HISTAMINA V ASTROCITE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF INHIBITORS HISTAMINE N-METHYL-
TRANSFERASE ON THE UPTAKE OF HISTAMINE INTO
ASTROCYTES**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije, molekularno-biološkega bloka na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Diplomsko delo sem opravljala na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Mojce KRŽAN.

Študijska komisija dodiplomskega študija Oddelka za biologijo je na seji dne 20.6.2008 za mentorico imenovala prof. dr. Mojco Kržan.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Članica (mentorica): prof. dr. Mojca KRŽAN, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta,
Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo

Član (recenzent): prof. dr. Peter MAČEK, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,
Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 30. 3. 2010

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Vesna Grgur

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
UDK	577.2:577.15:612(043.2)=163.6
KG	astrocit / histamin-N-metiltransferaza / metoprin / amodiakvin
AV	GRGUR Vesna
SA	KRŽAN Mojca (mentorica)
KZ	SI-Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2010
IN	VPLIV INHIBITORJEV ENCI MA HISTAMIN-N-METILTRANSFERAZE NA PRIVZEM HISTAMINA V ASTROCITE
TD	diplomska naloga (univerzitetni študij)
OP	VIII, 54 str., 19 sl., 41 ref.
IJ	sl
JI	sl / en
AI	<p>Telesa živčnih celic in aksone obdajajo celice glije, ki jo v osrednjem živčevju imenujemo nevroglia. Značilnost vseh je, da so to celice bogate z glikogenom in maščobami, razlikujejo pa se po funkciji in obliki. Daleč najštevilčnejše celice glije so astrociti, ki v določenih delih možganov predstavljajo kar 90% vseh celic. Po stimulaciji s signalnimi molekulami sproščajo različne živčne prenašalce, citokine, rastne dejavnike in molekule zunajceličnega matriksa ter tako aktivno posegajo v dogajanje v osrednjem živčevju. Na svoji membrani izražajo številne transporterje, s katerimi sodelujejo pri privzemu neurotransmitorjev. Tako so astrociti pomemben regulator vzdrževanja homeostaze. V osrednjem živčevju kot neurotransmitor deluje tudi histamin, ki se sintetizira v presinaptičnih nevronih iz prekursorja histidina. Iz le-teh se po stimulaciji sprošča ter učinkuje v sinapsi in v neposredni bližini sproščanja. Fiziološka aktivnost histamina v možganih je odvisna od prisotnosti histaminskih receptorjev, na katere se mora vezati, da doseže učinek in tudi od učinkovitosti njegove inaktivacije. Inaktivacija histamina poteka z difuzijo v ekstracelularni prostor, z encimsko razgradnjo ter s privzemom v presinaptične nevrone in astrocite. Encimska razgradnja poteka z dvema znotrajceličnima encimoma, diamino oksidazo (DAO) in histamin N-metil-transferazo (HNMT). V možganih je prisoten le slednji. Histamin, kot pozitivno nabita molekula, ni sposobna hitrega prehoda preko membrane v intracelularni prostor. Zato predvidevamo, da obstaja visoko afinitetni transportni sistem za prenos histamina, ki pa do danes ni znan. V okviru diplomske naloge sem želela osvetliti vpliv dodatka seruma (FBS) inkubacijskemu mediju na transport histamina v astrocite ter vpliv inhibitorjev, amodiakvina in metoprina, na privzem histamina v neonatalne astrocite podgan. Pri poskusih sem kulture astrocitov, pripravljene iz možganov neonatalnih podgan, v treh paralelkih 20 minut inkubirala v različnih koncentracijah inhibitorja (od 10^{-3} M do 10^{-8} M) ali v pufru za privzem, ki sem mu dodala FBS. Nato je sledil dodatek 125 nmol/L 3H-histamina in 20 minutni privzem v kulture astrocitov. Iz dobljenih rezultatov sklepam, da dodatek FBS pufru za privzem zniža privzem histamina v neonatalne astrocite podgan. Uporabljena inhibitorja sta različno vplivala na privzem histamina v astrocite. Nižje koncentracije metoprina so povečale privzem histamina v astrocite, zelo visoke ($\geq 100 \mu\text{M}$) pa so ga zmanjšale. Predinkubacija astrocitov z višjimi koncentracijami amodiakvina ($\geq 10 \mu\text{M}$) je znatno znižala privzem histamina v astrocite. Nižje koncentracije amodiakvina pa niso imele takega učinka na privzem histamina v astrocite. Sklepam, da amodiakvin in histamin tekmujeta za isti transportni sistem. V osrednjem živčevju ima histamin mnogo že raziskanih in še neznanih funkcij. Z vsako študijo smo bliže odkritja specifičnega transportnega sistema za prenos histamina v celice. Prav to pa bi omogočilo patentiranje potencialnih zdravil za preprečevanje nespečnosti in slabosti ter zdravljenja bolezni kot so Alzheimerjeva ter Parkinsonova bolezen in epilepsija ter depresija.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 577.2:577.15:612(043.2)=163.6
CX Astrocytes / histamine N-methyltransferase / metoprine / amodiaquine
AU GRGUR Vesna
AA KRŽAN Mojca
PP SI-Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2010
TI THE EFFECT OF INHIBITORS HISTAMINE N-METHYL-TRANSFERASE ON THE UPTAKE OF HISTAMINE INTO ASTROCYTES
DT Graduation Thesis (University Studies)
NO VIII, 54 p., 19 fig., 41 ref.
LA sl
AL sl / en
AB Axons and bodies of the nerve cells are surrounded by glial cells, which are called neuroglia in central nervous system. Their common characteristic is that they are all rich in glycogen and fats, but they differ in their function and shape. By far most numerous glial cells are astrocytes which can in some parts of brain represent 90% of all cells. After stimulation by signal molecules they release different neurotransmitters, cytokines and growth factors and in this way actively interfere with activity of the central nervous system. Numerous transport molecules are integrated in their membrane, with which they cooperate in the neurotransmitter uptake. In this manner the astrocytes are important controllers of homeostasis regulation. Histamine, which is synthesized from precursor histidine in presynaptic neurons, also plays a role of neurotransmitter in central nervous system. After stimulation it is released from presynaptic neuron and it effects in synapse and in direct vicinity of release. Histamine physiological activity in the brain depends on presence of specific histamine receptors on which it has to combine to achieve an effect, and also on efficiency of its inactivation. Inactivation of histamine can be achieved by diffusion in the extra cellular space, enzyme decomposition and by uptake into presynaptic neurons and astrocytes. The decomposition is catalyzed by two intra cellular enzymes, diamino oxidase (DAO) and histamine N-methyltransferase (HNMT). Only latter mechanism is present in the brain. As a positively charged molecule, histamine is not capable of fast movement across the cellular membrane into intra cellular space. So we predict that a high affinity transport system exists to transfer histamine but it remains unknown so far. In my assignment we wanted to highlight the influence of presence of proteins (FCS) in incubation medium on transport of histamine into astrocytes, and also the influence of inhibitors amodiaquine and metoprine on histamine uptake in neonatal astrocytes. We incubated the astrocyte cultures, prepared from brain cortex of neonatal rats, in three parallels for 20 minutes in different inhibitor concentrations (from 10^{-3} M to 10^{-8} M) or in buffer for uptake in which we added FCS. After that we added 125 nmol/L 3 H-histamine and waited 20 minute for uptake into astrocytes. From the results we got to we conclude, that adding FCS into the buffer for uptake decreases histamine uptake into rat's neonatal astrocytes. The inhibitors had different effect on histamine uptake in astrocytes. Lower metoprine concentrations increased histamine uptake in astrocytes but very high concentrations (≥ 100 μ M) decreased it. Pre-incubation of astrocytes with higher amodiaquine concentrations (≥ 10 μ M) had severely decreased histamine uptake in astrocytes. Lower concentrations of amodiaquine had no such effect on histamine uptake in astrocytes. We conclude that histamine and amodiaquine compete for the same transport system. Histamine has many known and also yet unknown functions in the central nervous system. With every study concluded we are one step closer to discovery of a specific mechanism for histamine uptake.

KAZALO VSEBINE:

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	II
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	III
KAZALO VSEBINE:.....	IV
KAZALO SLIK :.....	VI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VII
SLOVARČEK.....	VIII
1. UVOD.....	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNI HIPOTEZI.....	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1 OSREDNJE ŽIVČEVJE (OŽ).....	2
2.1.1 VZBURJENJE ŽIVČNIH CELIC.....	2
2.1.2 POVEZAVE MED NEVRONI - SINAPSE	3
2.2 CELICE GLIJE.....	3
2.2.1 ASTROCITI.....	5
2.2.1.1 ASTROCITI V RAZLIČNIH ŽIVLJENJSKIH OBDOBJIH	7
2.2.1.2 FUNKCIJE ASTROCITOV.....	7
2.3 KRVNO-MOŽGANSKA PREGRADA.....	8
2.4 NEVROTRANSMITORJI.....	9
2.4.1 PRENOS Z NEVROTRANSMITORJI	10
2.4.2 INAKTIVACIJA NEVROTRANSMITORJA.....	11
2.4.3 ZNAČILNOSTI TRANSPORTNIH PROTEINOV, KI SODELUJEJO PRI PRIVZEMU NEVROTRANSMITORJEV V OSREDNJEM ŽIVČEVJU	12
2.5 AMINERGIČNI SISTEMI – HISTAMINERGIČNI SISTEM.....	13
2.5.1 HISTAMINERGIČNA VLAKNA	14
2.6 HISTAMIN	15
2.6.1 VLOGA HISTAMINA.....	16
2.6.2 PODTIPI HISTAMINSKIH RECEPTORJEV	17
2.6.3 SINTEZA, SPROŠČANJE IN INAKTIVACIJA HISTAMINA	19
2.6.3.1 HISTAMIN N-METILTRANSFERAZA (HNMT).....	22
2.6.3.2 PRIVZEM HISTAMINA V CELICE, KJER DELUJE HNMT	23
2.6.3.3 TRANSPORTERJI, KI BI LAHKO SODELOVALI PRI PRIVZEMU HISTAMINA	24
2.6.3.4 INHIBICIJA HNMT	26

2.6.3.4.1 METOPRIN	26
2.6.3.4.2 AMODIAKVIN.....	27
2.6.4 KINETIKA PRIVZEMA HISTAMINA V NEONATALNE ASTROCITE	28
3. MATERIAL IN METODE DELA.....	30
3.1 MATERIALI	30
3.2 METODE	30
3.2.1 ŽIVALI.....	30
3.2.2 PRIPRAVA PRIMARNIH CELIČNIH KULTUR ASTROCIT	30
3.2.3 PRIVZEM HISTAMINA.....	31
3.2.3.1 TESTNE SNOVI.....	32
3.2.4 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV.....	33
3.2.5 ANALIZA PODATKOV.....	33
4. REZULTATI.....	34
4.1 PRIVZEM HISTAMINA V NEONATALNE ASTROCITE V ODVISNOSTI OD TEMPERATURE	35
4.2 VPLIV DODATKA 10% FBS PUFRU ZA PRIVZEM NA PRIVZEM HISTAMINA	36
4.3 VPLIV METOPRINA NA PRIVZEM HISTAMINA V NEONATALNE ASTROCITE	37
4.4 VPLIV AMODIAKVINA NA PRIVZEM HISTAMINA V NEONATALNE ASTROCITE	39
5. RAZPRAVA IN SKLEPI	41
5.1 RAZPRAVA	41
5.2 SKLEPI	46
6. POVZETEK	48
7. VIRI.....	50
7.1 CITIRANI VIRI.....	50
7.2 DRUGI VIRI	54

KAZALO SLIK :

SLIKA 1 : POVEZAVE MED NEVRONI IN CELICAMI GLIJE	4
SLIKA 2 : ASTROCITI VZGOJENI IZ KORTEKSA NEONATALNIH PODGAN	6
SLIKA 3 : MESTA NA NEVRONIH IN ASTROCITIH, NA KATERIH SE NAHAJAJO TRANSPORTERJI ZA NEVROTRANSMITORJE.	13
SLIKA 4 : KEMIJSKA STRUKTURA HISTAMINA	15
SLIKA 5 : SHEMATSKI PRIKAZ SINTEZE HISTAMINA	19
SLIKA 6 : SINTEZA IN METABOLIZEM HISTAMINA.....	21
SLIKA 7 : IZRAŽANJE HISTAMIN N-METIL-TRANSFERAZE MRNA	22
SLIKA 8 : SHEMATSKI PRIKAZ HIPOTEZ HISTAMINSKE METILACIJE.....	24
SLIKA 9 : SHEMATSKI PRIKAZ STRUKTURE METOPRINA	26
SLIKA 10 : SHEMATSKI PRIKAZ STRUKTURE AMODIAKVINA.....	27
SLIKA 11 : ČASOVNI PRIVZEM ³ H-HISTAMINA V PRIMARNE KULTURE NEONATALNIH ASTROCITOV PODGAN.....	28
SLIKA 12 : PRIKAZ HITROSTI PRIVZEMA HISTAMINA V ASTROCITE.	29
SLIKA 13 : KONCENTRACIJSKA ODVISNOST PRIVZEMA ³ H- HISTAMINA V KULTURNE NEONATALNIH ASTROCITOV V ODVISNOSTI OD TEMPERATURE.....	35
SLIKA 14 : KONCENTRACIJSKA ODVISNOST PRIVZEMA ³ H- HISTAMINA V KULTURNE NEONATALNIH ASTROCITOV TER VPLIV FBS.	36
SLIKA 15 : VPLIV METOPRINA NA PRIVZEM ³ H- HISTAMINA.....	37
SLIKA 16 : PRIKAZUJE PRIMERJAVA MED METOPRINOM (10μM) TER AMODIAKVINOM (10μM) NA TRANSPORT HISTAMINA V NEONATALNE ASTROCITE.	38
SLIKA 17 : VPLIV AMODIAKVINA NA PRIVZEM ³ H- HISTAMINA OB DODATKU FBS IN BREZ DODANEGA 10% FBS	39
SLIKA 18 : PRIMERJAVA MED AMODIAKVINOM (10μM) TER METOPRINOM (10μM) NA TRANSPORT HISTAMINA V NEONATALNE ASTROCITE.	40
SLIKA 19 : STRUKTURE RAZLIČNIH TAUTOMERNIH OBLIK HISTAMINA.	42

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP – adenzin trifosfat

BSA – serumski goveji albumin

cAMP – ciklični adenzin monofosfat

CREB - cAMP-response-element binding

DAG – diacil glicerol

DAO – diamin oksidaza

DMEM - (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) po Dulbeccu modificiran Eangelov medij

FBS – fetalni goveji serum

GABA- γ -aminomaslena kislina

GFAP - glialna fibrilarna kislina beljakovina

HNMT - histamin N-tele-metiltransferaza

IP₃ – inozitol trifosfat

MAO B – monoamin oksidaza B

MATE – (multidrug and toxic compound extrusion) transmembranski prenašalec,
ki deluje kot kationsko – protonski antiporter

NGF – (nerve growth factor) živčni rastni dejavnik

OCT – (organic cation transporter) transmembranski prenašalec organskih kationov

OŽ – osrednje živčevje

PKA – protein-kinaza A aminov

SLC1 - (solute carrier 1) transmembranski prenašalci družine 1

SLC6 - (solute carrier 6) transmembranski prenašalci družine 6

SLC22 – (solute carrier 22) transmembranski prenašalci družine 22

VMAT - vezikularni transporter monoaminov

SLOVARČEK

Astrocit – zvezdasta glijalna celica

Nevrotransmitor – prenašalec v osrednjem živčnem sistemu

Receptor – protein v celični membrani ali v jedru, na katerega se veže določen prenašalec in povzroči učinek

HEPES- organska kemijska spojina s puferskimi lastnostmi, ki se uporablja pri gojenju celičnih kultur.

1. UVOD

1.1 NAMEN DELA

Histamin je eden izmed prenašalcev v osrednjem živčnem sistemu. Za nemoteno delovanje prenašalcev v osrednjem živčevju, je ključnega pomena, da le-ti po sprostitvi iz živčnih celic, delujejo le omejen čas, zato se relativno hitro inaktivirajo. Inaktivacija poteka na več načinov; z difuzijo v zunajcelični prostor, z encimsko razgradnjo ter preko ponovnega privzema v živčne celice ter privzema v celice glije.

Iz znanstvene literature je znano, da zaviranje funkcij astroglije zviša koncentracijo histamina v ekstracelularnem prostoru, na račun zmanjševanja privzema histamina v astrocite (Horton *et al.*, 2005). Sam privzem histamina v astrocite je saturacijski proces, odvisen od koncentracije histamina, časa inkubacije ter koncentracije ekstracelularnih natrijevih ionov.

Pomembno pa je omeniti tudi, da astrociti, kljub stalnemu privzemu, vsebujejo zelo malo ali sploh nič histamina, kar dokazuje, da se privzeti histamin v astrocitih hitro metabolizira. Metabolizem poteče z znotrajceličnim encimom histamin N-metiltransferazo (HNMT).

Namen mojega diplomskega dela je nadaljevati študije na področju privzema histamina v astrocite. Proučila sem predvsem vpliv eksogenih proteinov na privzem histamina in s tem ponazorila eno od posledic motene funkcije krvno-možganske pregrade, ki se pojavi pri meningitisu. V nadaljevanju pa še vpliv inhibitorjev histamin N-metiltransferaze na privzem histamina. Ker so inhibitorji HNMT pri fiziološkem pH nabite molekule, delujejo pa znotrajcelično, me je zanimalo, če vstopajo v celice preko istih transportnih mehanizmov kot histamin.

1.2 DELOVNI HIPOTEZI

Pri našem delu smo se osredotočili na preverjanje naslednjih dveh hipotez:

- ⇒ privzem histamina v astrocite zavirajo zdravila, ki učinkujejo znotrajcelično
- ⇒ prisotnost proteinov v inkubacijskem mediju zmanjša privzem histamina v astrocite

2. PREGLED LITERATURE

2.1 OSREDNJE ŽIVČEVJE (OŽ)

Osnovni elementi živčnega tkiva so živčne celice ali **nevroni**. Poleg nevronov pa so pomemben del živčnega sistema tudi **celice glije**. Glijo in nevrone ločuje zelo tanek prostorček (20 nm) zapolnjen s tekočino. Veljalo naj bi splošno pravilo, da imajo bolj kompleksne živali večje število glija celic glede na število nevronov (eno izmed najvišjih razmerij je značilno prav za ljudi, 90% glijalnih in 10% živčnih celic – Araque, 2001). Zanimivo pa naj bi bila količina celic glije tudi v korelaciji z velikostjo živali, tako predstavljajo celice glije pri slonu kar 96% vseh celic možganov (Allen in Barres, 2009).

Tako nevroni kot celice glije v večini izvirajo iz nevrálnega ektoderma. Ko so nevroni enkrat diferencirani, nimajo več zmožnosti delitve, izrastki, **dendriti** in **aksoni**, pa se lahko obnavljajo. V grobem bi lahko rekli, da je bistvena razlika med nevroni in celicami glije v tem, da so nevroni vzdražne celice, prevajajo vzburjenje, celice glije pa so manj vzdražne, sposobne medsebojne komunikacije s kalcijevimi tokovi (Verhratsky, 1996).

Nevroni so zgrajeni iz telesa, krajših izrastkov – dendritov in daljšega izrastka – aksona. Telesa večine nevronov sestavljajo centralni živčni sistem, ki je pri vretenčarjih zgrajen iz možganov in hrbtenjače, pri nevretenčarjih pa možganov in nevrálnih somitov – ganglijev. Izrastki nevronov, ki izstopajo iz lobanje in vretenc, predstavljajo periferni živčni sistem (Randall *et al.*, 2002).

2.1.1 VZBURJENJE ŽIVČNIH CELIC

Vzburljenje potuje po nevronu od dendritov proti aksonu. Glede na smer prevajanja signala razlikujemo, aferentne nevrone, ki prevajajo vzburljenje v smeri OŽ in eferentne nevrone, ki prenesejo vzburljenje stran od OŽ proti tarčnim tkivom. Živci so zgrajeni iz večjega števila nevronov in tako so tudi živci lahko aferentni ali senzorični ter eferentni ali motorični. Poznamo tudi živce mešanega tipa.

Bistvo živčnega sistema je povezava in usklajevanje delovanja organov. Organi so tako medsebojno povezani z živci, ki prevajajo impulze od enega do drugega živca. Sam proces prevajanja poteka na membrani nevrona. Živčni impulz imenujemo tudi **akcijski potencial**. Sproži ga trenutna sprememba v napetosti membrane, ki je posledica večje prepustnosti membrane za Na^+ ione. Posledica te spremembe napetosti je bolj pozitivno nabita notranjost celice in to stanje imenujemo depolarizacija. Takoj za depolarizacijo se spremeni tudi prevodnost membrane za K^+ ione, ki vdrejo iz celice. Ta proces imenujemo repolarizacija. Prvotno stanje, mirovnega membranskega potenciala, vzpostavi Na^+ , K^+ ATP-aza. Samo vznurjenje živčne celice je posledica delovanja stimulusov iz okolja. Vznurjenje živčne celice deluje po pravilu »vse ali nič« - ko se preseže vzdražni prag, se sproži maksimalni možni odgovor (Štrus, 2002).

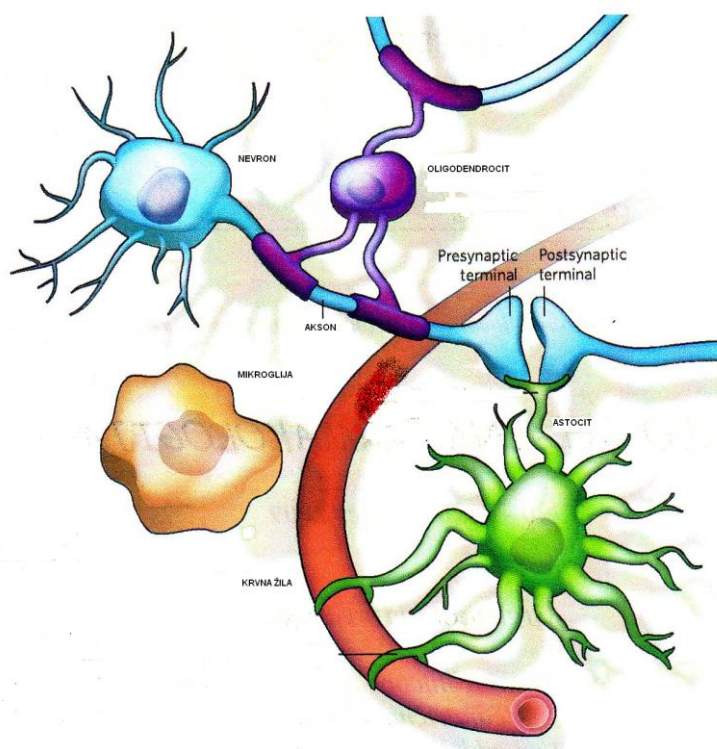
2.1.2 POVEZAVE MED NEVRONI - SINAPSE

Nevroni med seboj komunicirajo s sinapsami, to so različno široki prostori med terminalnim delom ene živčne celice in sprejemnim delom druge živčne celice. Ločimo kemične in električne sinapse. Za **električne sinapse** je značilno, da se električni impulz prenaša neposredno, prenos je tako hitrejši. Električne sinapse prevladujejo med nevroni v gladkih mišicah, pogoste so v možganih. Med **kemičnimi sinapsami** pa se impulz ne prenaša neposredno, temveč s pomočjo signalnih molekul (npr. acetilholin, noradrenalin, histamin,...). Taka sinapsa je zgrajena iz presinaptičnega nevrona – navadno je to terminalni del aksonov, sinaptične špranje in iz postsinaptične živčne celice, ki je lahko del iste ali druge živčne celice (Randall *et al.*, 2002).

2.2 CELICE GLIJE

Telesa živčnih celic in aksone obdajajo celice glije, ki jih je v OŽ sistemu vretenčarjev lahko tudi do 50-krat več kot nevronov (v človeških možganih jih je približno desetkrat več kot živčnih celic (Pangeršič, 2006)). Ime glija izhaja iz grške besede za lepilo, saj je dolgo veljalo, da celice glije povezujejo, lepijo skupaj ostale celice (Kandel *et al.*, 1991). Šele kasneje

histološke tehnike z uporabo kovinskih barvil, ki sta jih razvila Golgi in Cajal, so omogočile opredelitev glije kot samostojnih celic v OŽ (Kržan, 2001).



Slika 1 : povezave med nevroni in celicami glije (povzeto po Allen in Barres, 2009)

Danes vemo, da imajo celice glije **številne vitalne vloge v živčnem sistemu**;

- služijo kot podporni element, nudijo čvrstost in vzdržujejo strukturo možganov
 - oligodendrociti, Schwanove celice producirajo mielin in tako predstavljajo izolacijsko snov na aksonih
 - nekateri tipi celic glije so pomembni pri razvoju možganov, saj sodelujejo pri usmerjanju migracije nevronov
 - pomembne so pri regeneraciji živčnega tkiva, ker se povezujejo s krvnimi žilicami
 - imajo prehransko vlogo
 - aktivno izločajo učinkovine, ki omogočajo rast, razvoj in preživetje nevronov
 - z reguliranjem koncentracije K^+ in pH vzpostavljajo homeostazo zunajceličnega prostora
- Za vzpostavljanje homeostaze je pomembno tudi njihovo odstranjevanje neurotransmitorjev (Kandel *et al.*, 1991).

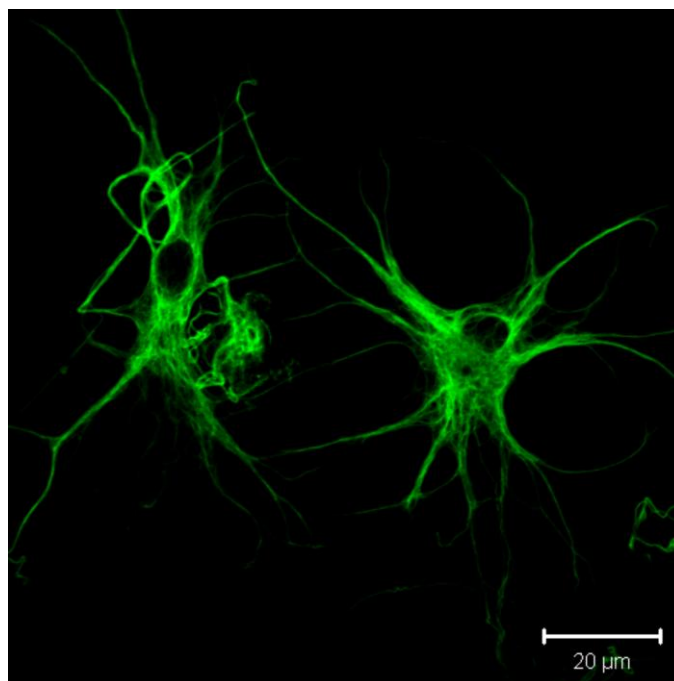
Celice glije v OŽ imenujemo **nevroglija**. Kot omenjeno se celice glije razlikujejo po funkciji, ločimo pa jih tudi po obliki. Značilnost vseh je, da so to celice bogate z glikogenom in maščobami.

V grobem lahko glijo razdelimo na

- **mikroglijo**; značilne za mikroglijo so ameboidne celice, sposobne fagocitoze. Embriološko te celice niso sorodne nevromom ali ostalim celicam glije, izvirajo namreč iz mezoderma. To so npr. fagociti, ki se mobilizirajo ob poškodbi, infekciji ali bolezni (Štrus, 2002);
- **makroglijo**, kamor uvrščamo :
 - oligodendrocite, ki tvorijo mielinske ovojnice v OŽ in tako predstavljajo izolacijsko snov;
 - Schwannove celice, ki imajo podobno vlogo v perifernem živčnem sistemu;
 - daleč najštevilčnejše celice glije pa so astrociti (Kandel *et al.*, 2000).

2.2.1 ASTROCITI

Ime so celice dobile, zaradi svoje spremenljive in nepravilne oblike ter dolgih izrastkov, kar lahko spominja na zvezdo. So edine celice, ki vsebujejo **glijalno fibrilarno kislno beljakovino** – GFAP (angl. »glial fibrillary acidic protein«). Prav na podlagi te beljakovine jih lahko določimo s pomočjo imunohistokemijskega barvanja. Ravno to barvanje pa je bilo zavajajoče, saj se GFAP močno izraža le okrog jedra ter v primarnih in sekundarnih izrastkih, novejša citosolna tehnika barvanja pa so razkrile številne manjše, močno razvejane tanke izrastke. Tako danes vemo, da je oblika astrocitov pravzaprav poligonalna (slika 1) (Pangršič, 2006).



Slika 2 : Astroцити vzgojeni iz korteksa neonatalnih podgan v primarni kulturi in barvan z GFAP (1:1000). Slika je bila posneta na Referenčnem Carl-Zeiss centru za konfokalno mikroskopijo v Laboratoriju za neuroendokrinologijo in celično fiziologijo, PAFI.

Eno izmed pomembnejših odkritij, ki je vodilo k kasnejšim raziskavam astrocitov, je bilo, da te celice po stimulaciji s signalnimi molekulami sproščajo različne živčne prenašalce, citokine, rastne dejavnike in molekule zunajceličnega matriksa ter tako aktivno posegajo v dogajanje v OŽ (Kržan, 2001). Med drugim so ugotovili, da primarne kulture astrocitov, vzgojene iz možganske skorje novorojenih podgan, sproščajo pod vplivom histamina, povečane količine različnih nevrotrofičnih dejavnikov – NGF in BDNF, ki sta nujna za razvoj, diferenciacijo in vzdrževanje sinaptične plastičnosti nevronov (Lipnik-Štrangelj, Čarman-Kržan, 1998).

Te dejavnike bi morda v prihodnosti lahko uporabili za zdravljenje neurodegenerativnih bolezni in možganskih poškodb (Kržan, 2001).

V skladu s spremembami v okolju lahko spreminjajo svojo obliko in funkcijo.

2.2.1.1 ASTROCITI V RAZLIČNIH ŽIVLJENJSKIH OBDOBJIH

Najzgodnejše diferencirane celice glije imenujemo **radialna glija** in iz nje se v razvojnem obdobju razvijejo tudi astrociti. V tem obdobju astrociti izločajo adhezivne molekule in proteine medceličnega matriksa ter tako usmerjajo proces migracije nevronov ter rasti njihovih aksonov in nastanek sinaps. Prav tako je v tem obdobju pomembno njihovo izločanje nevrotrofičnih faktorjev, ki uravnavajo morfologijo, rast, diferenciacijo ter preživetje določenih nevronskih skupin ter citokine, ki so trofična podpora nevronom in celicam glije.

V odraslem obdobju ločimo **različne tipe astrocitov**. Na obliko vpliva predvsem aktivnost živčnih končičev v njihovi neposredni bližini – tako npr. vezava noradrenalina na adrenergične receptorje beta vpliva na razvejanje astrocitov (Kržan, 2001). Protoplazmatski astrociti se nahajajo predvsem v sivi substanci, vlaknasti v belini, poznamo pa še specializirane astrocite npr. Bergmannovo glijo in Müllerjeve celice (Kržan, 2001).

2.2.1.2 FUNKCIJE ASTROCITOV

Ena izmed pomembnejših vlog astrocitov je tvorba presledkovnih stikov in s tem vzpostavitev medcelične komunikacije z nevroni, predvsem z uporabo kalcijevih ionov.

Astrociti nudijo oporo in vzdržujejo obliko možganov, saj vsebujejo intermediarne filamente iz glijalne fibronske kisline.

Pretvarjajo glukozo, ki jo perivaskularni astrociti privzemajo neposredno iz možganskih žil, v glikogen in z njim oskrbujejo nevrone, tako lahko govorimo o prehranski vlogi astrocitov.

Pri nižjih organizmih z izrastki, imenovanimi »perivascular feet«, utrdijo kapilare in tvorijo krvno-možgansko pregrado. Pri višjih organizmih pa tvorijo krvno-možgansko pregrado skupaj še z endotelijskimi celicami in periciti.

Ko nevroni posredujejo signal, sprostijo nevrotransmitorje ter K^+ ione, astrociti absorbirajo te substance in tako preprečijo kopičenje snovi v tkivni tekočini (Kandel *et al.*, 1991). Pred

previsoko koncentracijo amoniaka ščitijo tako, da privzeti amoniak uporabijo za tvorbo inertnega glutamina, pri tem pa porabijo še s pomočjo transportnih prenašalcev privzet glutamat. Glutamat se v astrocitih z glutamin sintetazo pretvori v glutamin, ta se prenese v nevrone in tam ponovno pretvori v glutamat (Kržan, 2001). Astroцитi so pomemben regulator vzdrževanja homeostaze.

Poleg prej omenjenih transporterjev za glutamat, so na astrocitih dokazali tudi obstoj transporterjev za aspartat/glutamat, glicin, GABA ter biogene amine. Zanimivo je dejstvo, da je gostota transporterjev za ekscitatorne nevrottransmitterje na astrocitih še večja kot na nevronih samih, kar ponovno dokazuje, da astroцитi v OŽ niso le v pasivni vlogi (Nestler *et al.*, 2001).

Astroцитi pa imajo vlogo tudi pri patoloških procesih. Mirujoči astroцитi se spremenijo v reaktivne celice, za katere je značilno, da so večji, vsebujejo več glikogena in citoskeletnih proteinov, izločajo več trofičnih faktorjev, citokinov, encimov in imajo višjo frekvenco delitve ter tako sprožijo proces regeneracije ter brazgotinjenja. Do sedaj še ni znano kaj sproži proces prehoda iz mirujoče v aktivno obliko. Prav tako ni znano ali ima ta proces res pozitiven učinek. Ob aktivaciji astroцитi lahko tudi nabreknejo in zmanjšajo lumen kapilar, kar povzroči zmanjšano prekrvavljenost ter zmanjšanje prostora izven celic. Posledično se poveča koncentracija ionov v izvensceličnem prostoru, to pa negativno vpliva na nevrone.

Tipična reakcija astroцитov na možgansko poškodbo je reaktivna glijoza, za katero je značilna hkratna proliferacija mikroglije in hipertrofija astroцитov (Kržan, 2001).

2.3 KRVNO-MOŽGANSKA PREGRADA

Za nemoteno signalizacijo med nevroni je nujna stalna koncentracija ekstracelularnih ionov ter zelo natančno nadzorovano sproščanje, ponovni privzem in metabolizem nevrottransmitorjev (Nestler *et al.*, 2001).

Krvno-možganska pregrada predstavlja mejo med osrednjim živčevjem in ostalim telesom (Abbott *et al.*, 2006). Ena izmed najpomembnejših nalog krvno-možganske pregrade je vzdrževanje homeostaze v osrednjem živčevju, deluje kot nekakšen filter. V fizioloških

razmerah krvno-možganska pregrada prepušča le v maščobah topne, majhne molekule (temu kriteriju ustrezajo alkohol, nikotin, kofein in antidepresivi (<http://www.mcmanweb>)). Na ta način so možgani varovani pred morebitnimi povzročitelji bolezni, toksini in drugimi polarnimi snovmi v krvi. Onemogočen pa je tudi vstop večini zdravil. Dodatno varovalo predstavljajo prenašalni proteini (glikoprotein P), ki regulirajo iztok telesu tujih snovi. Če zdravilu (npr. antiepileptik karbamazepin, nekateri antipsihotiki) uspe preiti krvno-možgansko pregrado, ga glikoproteini-P hitro odstranijo iz osrednjega živčnega sistema. Za prenos hidrofilne snovi iz krvi v možgane pa mora obstajati specifičen prenašalni sistem. V krvno-možganski pregradi se nahajajo prenašalci za glukozo, aminokislino, inzulin in transferin (Nestler *et al.*, 2001). Pomembno je tudi vedeti, da krvno-možganska pregrada pri novorojencih še ni v celoti razvita .

Virusne in bakterijske infekcije možganskih ovojnic povzročijo spremembo prepustnosti krvno-možganske pregrade in pomembna laboratorijska diagnostična znaka infekcije v osrednjem živčevju sta prisotnost vnetnih celic in beljakovin v možganski tekočini. Klinično se meningitis odraža z glavobolom, motnjami zavesti (od zaspanosti do kome), vedenjskimi motnjami (zmedenost, agresivnost). Če so prisotni še nevrološki znaki (tremor, epileptični napadi), govorimo o meningoencefalitisu (Marolt-Gomišček in Radšel-Medvešček, 1992).

2.4 NEVROTRANSMITORJI

Pri večini glavnih živčnih poti v možganih najdemo kemični sinaptični prenos z nevrotransmitorji.

Ali je vsaka kemična snov v možganih nevrotransmitor?

Ker so iz možganov izolirali mnogo različnih snovi, se je pojavila težnja po natančnejšem definiranju pojma nevrotransmitor in tako je obveljalo, da mora snov, ki jo imenujemo nevrotransmitor ustrezati naslednjim pogojem;

- sinteza mora potekati v nevronu
- prisotna mora biti v presinaptičnih končičih in se iz njih sproščati v zadostnih količinah, da ob aktivaciji izzove pričakovano aktivnost na postsinaptični membrani

- neurotransmitor ne prehaja krvno-možganske pregrade, njegove predsopnje pa jo
- če snov dodamo eksogeno (kot zdravilo) posnema aktivnost, ki jo sproži endogena sprostitelj
- obstajati mora specifičen mehanizem, ki snov odstrani iz mesta delovanja (Kandel *et al.*, 2000).

Pri kemičnem prenosu med sinapsami se navadno sprošča malo neurotransmitorja, pri vretenčarjih povprečno le 10^4 molekul/sinapso/akcijski potencial (Randall *et al.*, 2002).

Do sredine prejšnjega stoletja so poznali le tri neurotransmitorje: acetilholin, adrenalin in GABA. Danes poznamo več kot sto različnih neurotransmitorjev (Randall *et al.*, 2002).

Kemični prenos signala znotraj sinapse poteka v štirih korakih. Začetna stopnja je sinteza neurotransmitorja, ta se nato shranjuje v sinaptičnih veziklih in se ob aktivaciji aksonskih končičev sprošča, sledi interakcija neurotransmitorja in receptorja na presinaptični in postsinaptični membrani ter zaključni korak, odstranitev neurotransmitorja z mesta delovanja (Kandel *et al.*, 2000).

2.4.1 PRENOS Z NEVROTRANSMITORJI

Danes je znano, da znotraj kemičnega prenosa ločimo hiter prenos ter počasnejši prenos. Za prvega je značilno, da vezava neurotransmitorja na specifične receptorje na postsinaptični membrani povzroči odprtje od ligandov odvisnih kanalčkov in s tem takojšnjo spremembo polarizacije postsinaptične membrane. V vlogi neurotransmitorja nastopajo majhne molekule, ki se sintetizirajo v aksonskem končiču. Majhne molekule klasičnih neurotransmitorjev lahko nastajajo iz holina (acetilholin), amino kislin (**biogeni amini**, kamor sodi tudi histamin), vmesnih stopenj metabolizma glukoze (GABA, glutamat). Za počasnejši kemični prenos pa je značilno, da vezava neurotransmitorja na receptorje na postsinaptični membrani povzroči sproščanje signalnih molekul, kar sproži modifikacijo ionskih kanalčkov. Pri temu tipu prenosa, poleg manjših molekul, sodelujejo tudi večje molekule, ki se tipično sintetizirajo v somi, iz več amino kislin, imenujemo jih **neuropeptidi**. V somi se zberejo v velikih veziklih, ki se nato prenesejo v aksonske končiče.

Odziv, ki ga sproži integracija prenašalca in receptorja, imenujemo **sinaptični potencial**. Različni transmittorji sprožijo različen sinaptični potencial, ki pa je odvisen tudi od same sinapse, njene geometrije, števila in lokacije receptorjev. Prav tako pa je aktivnost signala odvisna od aktivnega privzema nevrotansmittorja preko transporterja, ki se nahaja v plazemski membrani nevronov in celic glije (Bergles, 2001).

2.4.2 INAKTIVACIJA NEVROTRANSMITORJA

Kot rečeno, je za normalno delovanje živčnega sistema ključna tudi odstranitev nevrotansmittorja z mesta delovanja. To prepreči stalno aktivnost sinapse in stanje refraktarnosti. Znani so trije mehanizmi odstranitve nevrotansmittorja iz mesta delovanja; **difuzija**, **encimska razgradnja** ter njegov **ponovni privzem**.

Z **difuzijo** se živčni transmittor širi v medcelični prostor. Značilno je, da difuzija odstrani le nekatere funkcije transmittorja, vendar učinkuje hkrati na več kemijskih snovi. Včasih zadošča že, da koncentracija nevrotansmittorja pade pod prag, ki ne vzdraži receptorjev.

Encimska razgradnja lahko poteka v nevronu ali v nenevronskega tkivu. Gre za pomemben mehanizem nadzora konstantne koncentracije nevrotansmittorja v končičih in njegove inaktivacije v sinapsi. Pri razgradnji z encimi se nevrotansmittor razgradi na metabolite, ki so neaktivni in tako nesposobni vezave z receptorji. Encimske poti razgradnje so pomembne tudi v klinični praksi, saj predstavljajo mesto delovanja zdravil.

Najpogostejši mehanizem inaktivacije pa je **privzem**. Za vsak specifičen tip nevrone je značilen karakterističen mehanizem privzema, s specifičnimi transportnimi proteini (Kandel *et al.*, 2000), ki ta proces posredujejo.

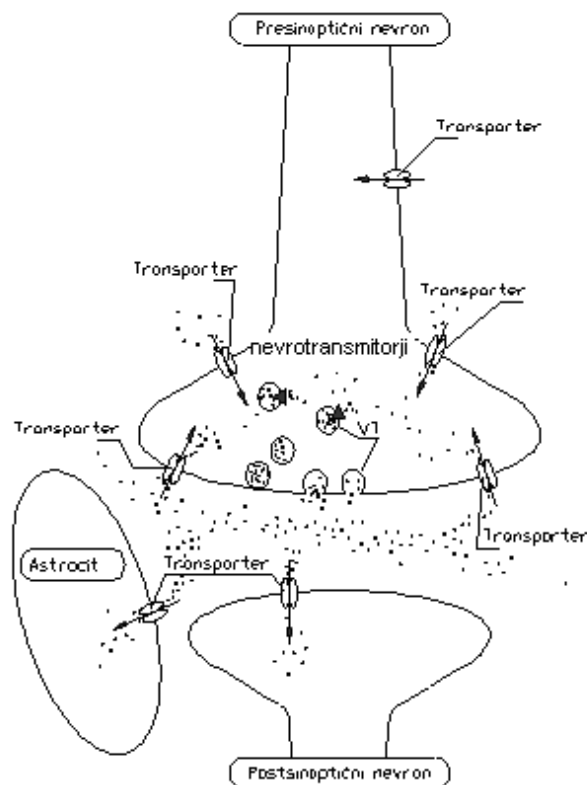
2.4.3 ZNAČILNOSTI TRANSPORTNIH PROTEINOV, KI SODELUJEJO PRI PRIVZEMU NEVROTRANSMITORJEV V OSREDNJEM ŽIVČEVJU

Transporterji se nahajajo v nevronih in celicah glije. Študije v celicah glije, predvsem v astrocitih, so pokazale izražanje transporterjev za vse glavne nevrotransmitorje. Zakaj ravno tu? Saj astrociti zmanjšujejo interakcije med sinapsama, s povečevanjem razdalje, ki jo mora nevrotransmitor prepotovati, da doseže receptor sosednje sinapse. Astrocitni transporterji tako regulirajo trajanje vzdražnosti vsake individualne sinapse (Bergles, 2001).

Nevrotransmitorski transporterji so glikoproteini, iz približno 600 amino kislin (Bergles, 2001). Prisotni so v celičnih membranah živčnih in glijalnih celic.

Danes velja, da poteka privzem s transporterji tako, da transporter tvori poro skozi membrano, ki spominja na ionski kanal. Transport snovi skozi poro je odvisen od konformacije transmitorja. Transport je reguliran prek dvojnih vrat; ko so zunanja vrata odprta, se veže Na^+ . To spremeni konformacijo transporterja, tako, da ta lahko veže transmitor. Po vezavi nevrotransmitorja se zunanja vrata zaprejo, notranja pa odprejo, pride do odcepa ionov in nevrotransmitorja. En cikel transporta traja približno 10-100 ms. Zaradi dolgotrajnosti postopka je gostota transporterjev velika, prav tako njihova afiniteta za vezavo z nevrotransmitorji (Bergles, 2001).

Antidepresivi, psihostimulanti (npr. kokain blokira privzem dopamina in noradrenalina, Kandel et al., 2000) in antiepileptiki so zdravila, ki lahko inhibirajo določen transporter. Problem teh zdravil je, da imajo podobno zgradbo kot nevrotransmitorji in tako vplivajo tudi na druge procese v organizmu, saj s transmitorji tekmujejo za vezavna mesta na receptorjih (Bergles, 2001).



Slika 3 : Slika prikazuje mesta na nevronih in astrocitih, na katerih se nahajajo transporterji za nevrotransmitorje. Večino sproščenega nevrotransmitorja privzame presinaptični nevron. Privzeti nevrotransmitor se lahko z vezikularnim transportom (VT) vrača v vezikle in ponovno sodeluje pri sinaptičnem prenosu signala (ponovna uporaba prenašalcev) (povzeto po Perdan *et al.*, 2009).

2.5 AMINERGIČNI SISTEMI – HISTAMINERGIČNI SISTEM

Naši možgani iz okolja stalno sprejemajo informacije in oblikujejo naša občutja. Zmožnost možganov, da oblikujejo subjektivni vidik informacije, je rezultat delovanja štirih aminergičnih sistemov, ki ležijo v centralnem živčnem sistemu; serotoninski, dopaminski, noradrenalinski in histaminski. Vsi sestojijo iz skupin nevronov v možganih in hrbtenjači. Specifičnost sistemi dosežejo z različnimi aferentnimi vključki ter s specifično lociranimi receptorji v tarčnih regijah (Brown *et al.*, 2001).

V nadaljevanju se bom posvetila predvsem histaminergičnemu sistemu, sintezi histamina, njegovemu sproščanju, metabolizmu ter delovanju v organizmu vretenčarjev.

Centralni histaminergični sistem je tekom evolucije ostal skoraj nespremenjen. Sproščanje in pretvorbo histamina sprožijo različni, za organizem nevarni dejavniki; npr. dehidracija, hipoglikemija, spremembe v krvnem tlaku in stres. V predelih, kjer je histaminska oživčenost majhna (hipokampus, možgansko deblo), se vzburjenje histaminskih vlaken pojavi le v ekstremnih okoliščinah (Brown *et al.*, 2001).

Morfološka struktura histaminergičnega sistema, s skupki kompaktnih celic in široko razpršenimi vlakni, spominja na ostale aminergične sisteme, kar nakazuje na morebitno vlogo histaminergičnega sistema kot regulatornega centra celotne možganske aktivnosti (Blandina *et al.*, 2004).

2.5.1 HISTAMINERGIČNA VLAKNA

Z uporabo protiteles proti L-histidin dekarboksilazi in histaminu so natančno določili lego in porazdelitev histaminergičnih vlaken v telesu (povzeto po Yanai *et al.*, 2007).

Gre za velike celice, povprečnega premera 25-30 mikrometrov, ki poleg histamina vsebujejo še druge nevroaktivne substance: GABA, adenzin, galanin, substanco P in druge (kar je pomembno za modulacijo signala) (Brown *et al.*, 2001). Iz površine možganov histaminergični nevroni tako iztezajo dolge primarne dendrite, ki se cepijo na sekundarne, ti pa oživčujejo celotne možgane in dele hrbtenjače. V možganih so dendriti zgoščeni predvsem v sloju Purkinjejevih celic, telesa pa se nahajajo v hipotalamusu, tako histaminergični sistem zagotavlja direktno povezavo teh dveh delov možganov (Takemura *et al.*, 2003). Tudi v regijah z majhno gostoto histaminergičnih vlaken je elektrofiziološki vpliv histamina stalen. Sprožitev vzburjenja je počasna (podobna kot pri spodbujevalniku), rezultat tega je obsežen akcijski potencial in dolgotrajna hiperpolarizacija. Histaminski nevroni so pod tonično inhibitorno kontrolo sproščenega histamina iz dendritov ali avtoreceptorjev H_3 . Inhibitorno nanje delujeta tudi GABA in galanin, ekscitatorni vpliv pa imajo acetilholin, oreksin in glukoza (Brown *et al.*, 2001). Histaminergična vlakna niso mielinizirana in tvorijo malo sinaptičnih povezav (Blandina *et al.*, 2004).

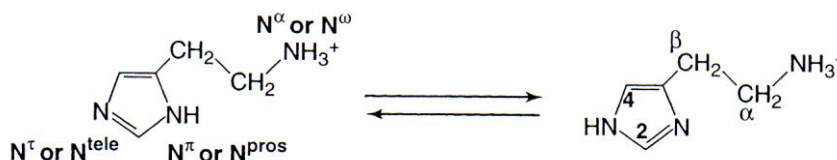
Histaminergične nevrone so odkrili pri večini vretenčarjev (vključno s ptiči, kačami in ribami) (Houhg 2006). Poudariti pa je potrebno, da se distribucija histaminergičnih vlaken, receptorjev in encimov, ki sodelujejo pri metabolizmu, med živalskimi vrstami razlikuje (Takemura *et al.*, 2003).

2.6 HISTAMIN

Histamin sta Windaus in Vogt sintetizirala leta 1907, njegov prvi učinek – stimulacija maternice – pa je bil odkrit leta 1910 (Kržan, 1995).

Histamin je derivat amino kisline histidin. Tako histidin kot histamin vsebujeta značilen petčlenski obroč z dvema atomoma dušika. Histamin je prekurzor dveh neuropeptidov; karnozina, ki je kemijsko beta-alanil histidin ter homokarnozina, ki je beta-aminobutirilhistidin (Kandel *et al.*, 2000).

Kemijsko gledano je histamin 2-(4-imidazol)etilamin. Etilaminski del je značilen zaaminske transitorije, imidazolno jedro pa je posebnost histamina (Houhg, 2006).



Slika 4 : Kemijska struktura histamina. Slika prikazuje dve tautomeri obliki. Na levi sliki sta poimenovana tudi dušikova atoma. (povzeto po Houhg, 2006: str: 250)

Najdemo ga v večini telesnih tkiv, v večjih koncentracijah se nahaja v pljučih, koži in gastrointestinalnem traktu. Na celičnem nivoju je prisoten v mastocitih in bazofilcih, v povezavi s heparinom in kislimi proteini (Rang *et al.*, 2007). Najvišje koncentracije »ne-mastocitnega« histamina so dosežene v manjših regijah posteriornega hipotalamusa (Brown *et al.*, 2001).

2.6.1 VLOGA HISTAMINA

Histamin so dolgo prepoznavali le kot lokalni hormon, kot avtokoid, aktiven pri vnetnih reakcijah (Kandel *et al.*, 2000). Na učinek histamina v centralnem živčnem sistemu so bili pozorni šele v 50ih letih prejšnjega stoletja, ko so zaznali sedativni stranski učinek antihistaminikov prve generacije (Osredkar *et al.*, 2009). Danes vemo, da ima histamin v osrednjem živčevju mnogo funkcij, da je v povezavi z ostalimi aminergičnimi sistemi in da se v OŽ nahajajo štirje podtipi histaminskih receptorjev, na katere se specifično veže.

Histamin ima **izven osrednjega živčevja** vpliv predvsem na:

- regulacijo in modulacijo imunskega sistema. Produkcija histamina je inducirana z lipopolisaharidnimi interleukini. S stimulacijo receptorjev H₂ pride do produkcije vezikularnega endotelijskega rastnega faktorja, vezava histamina na receptorje H₄ pa se odraža v kemotaksi mastocitov, proliferaciji celic T ter mutacijah dendritskih celic (Ogasawara *et al.*, 2006)
- iz mastocitov se sprošča z eksocitozo med vnetno ali alergično reakcijo
- z vezavo na receptorje H₂ stimulira izločanje želodčne kisline (iz kliničnega vidika najpomembnejša vloga histamina)
- če se veže na receptorje H₁ povzroči krčenje gladkih mišic črevesja in bronhijev (Rang *et al.*, 2007), z vezavo na receptorje H₂ pa sproži krčenje mišic maternice (Kržan, 1995). Histamin je eden izmed glavnih mediatorjev, ki zmanjšajo pretok zraka v prvi fazi astme
- z delovanjem na receptorje H₁ histamin razširja žile, z delovanjem na receptorje H₂ pa ojača in pospeši srčni utrip
- glavna patofiziološka vloga je, da deluje kot mediator pri slabosti in bruhanju (Rang *et al.*, 2007).

Znotraj osrednjega živčevja pa histamin vpliva na:

- vzdrževanje budnosti; nevroni histamina so različno vzburjeni v fazi spanja kot v fazi budnosti. Na cikel spanja in budnosti vpliva tako, da se veže na receptorje H₁ in s tem povzroči depolarizacijo holinergičnih in serotoninskih nevronov (Brown *et al.*, 2001). Da je histamin potreben pri stanju budnosti nadalje nakazujejo njegove interakcije z

- oreksinskimi nevroni. Oreksin je peptidni neurotransmiter, ki vpliva na prehranjevanje in stanje budnosti (Blandina *et al.*, 2004);
- vzdrževanje ravnotežja tekočin, saj sproži pitje in hkrati poveča izločanje vazopresina, ki sodeluje pri večjemu odvajanju urina (Brown *et al.*, 2001);
 - prehranjevanje; antagonist receptorjev H₃ zavre prehranjevanje, med tem, ko antagonist receptorjev H₁ poveča željo po vnosu hrane;
 - regulacijo temperature; z vbrizganjem histamina se pojavi hipotermija, vezava na receptorje H₂ v posteriornem hipotalamusu je vpletena v izgubo toplote;
 - histaminergični sistem predstavlja hipotalamično osnovo, ki vpliva na shrambo spomina, ki bazira na emocijah. Eksperimentalno so ugotovili tudi, da farmakološka blokada receptorjev H₃ pri odraslih podganah povečuje socialni spomin, pozornost in kognitivne predstave (Blandina *et al.*, 2004);
 - občutke bolečine; če ga apliciramo v možganske ventrikle je opazen blažilni učinek (Brown *et al.*, 2001). Če ga apliciramo na kožo povzroča srbečico, saj stimulira končiče senzoričnih nevronov (Rang *et al.*, 2007).
 - občutek strahu; vbrizganje antagonista receptorjev H₃ v bazolateralno amigdalo zmanjša občutek strahu, aplikacija agonista pa podaljša reakcijski odziv na strah. Skladno s tem se zmanjša oz. poveča sproščanje acetilholina iz bazolateralne amigdale. Histamin torej na občutenje strahu vpliva z modulacijo holinergičnega tonusa (Blandina *et al.*, 2004).

2.6.2 PODTIPI HISTAMINSKIH RECEPTORJEV

Do sedaj so bili odkriti štirje podtipi histaminskih receptorjev, ki vsi sodijo v razred histaminskih farmakoloških receptorjev, ki za prenos informacije v celico potrebujejo sklopitev z gvanin-nukleotid vezavnim regulatornim proteinom (proteinom G) (Kržan, 1995). V možganih se podtip H₄ nahaja v nizkih koncentracijah (Osredkar *et al.*, 2009).

Receptorji H₁ so povezani z G_{q/11} GTP-hidrolaznim proteinom, ki ga aktivira vezava histamina na receptor, to aktivira fosfolipazo C, tako, da ta pretvori fosfatidil-inozitol-4,5-bifosfat v dva sekundarna sporočevalca – DAG (diacil glicerol) in IP₃ (inozitol-3-trifosfat), ki se dalje veže na receptorje v endoplazmatskem retikulumu in tam povzroči sproščanje Ca²⁺ v citoplazmo, kar pa blokira prepuščanje kalijevih ionov. Ta podtip histaminskih receptorjev je

široko razširjen v OŽ, posebno veliko gostoto doseže v talamusu, korteksu, limbičnemu sistemu in amigdali. Preko receptorjev H_1 je histaminergični sistem povezan z noradrenalinom, saj z vezavo nanje lokalno poveča sproščanje noradrenalina iz anteriornega in posteriornega hipotalamusa (Brown *et al.*, 2001).

Prav receptorji H_1 so ključni pri vzdrževanju cirkadianega ritma, v periferiji pa povzročajo krčenje gladkega mišičja črevesja in bronhijev (Osredkar *et al.*, 2009).

Aktivacija z **receptorjem H_2** povezanega proteina G vodi v stimulacijo adenilil ciklaze in povečanje produkcije sekundarnega sporočevalca cAMP (ciklični adenzin 3,5-monofosfat), ki vpliva na PKA (proteinsko kinazo A), ki nadalje lahko fosforilira tarčne proteine v citosolu, na celični membrani ali pa se prenese v jedro in aktivira transkripcijski faktor CREB (cAMP-response-element binding). Posebno velika gostota tega podtipa je v bazalnih ganglijih in v hipokampalni formaciji ter talamičnem jedru limbičnega sistema. Vezava histamina na receptor H_2 ne vpliva na pretok Ca^{2+} , temveč vpliva direktno na kalijev kanalček (ki je tudi eden izmed tarčnih proteinov za delovanje PKA). Tako receptorji H_2 delujejo sinergistično z receptorji H_1 pri depolarizaciji celic preko blokade kalijeve prevodnosti (Brown *et al.*, 2001). Na periferiji so ti receptorji odgovorni za stimulacijo izločanja želodčne kisline ter povišanje in ojačanje srčnega utripa (Osredkar *et al.*, 2009).

Receptorji H_3 so v možganih prisotni v vseh slojih in delih možganske skorje. Receptor H_3 v povezavi s proteinom G inhibira adenililciklazo. To zavre sintezo cAMP in privede do inhibicije napetostno odvisnih Ca^{2+} kanalčkov. V presinaptičnih končičih se inhibira sproščanje transitorja – v primeru histaminergičnega nevrona je transitor histamin, torej delujejo kot avtoreceptorji. Ker pa se nahajajo tudi na nehistaminergičnih nevronih, delujejo kot heteroreceptorji in zavirajo sproščanje drugih neurotransmitorjev; npr. noradrenalina, glutamata, GABA (gama-aminomaslena kislina) in drugih. Maksimalna inhibicija sproščanja teh neurotransmitorjev je 60%, odvisno od ekstracelularne koncentracije Ca^{2+} (Brown *et al.*, 2001).

Raziskave kažejo, da naj bi histamin pomembno vplival na učenje in spomin. To pa naj bi potekalo ravno preko aktivacije receptorjev H_3 in posledične regulacije izločanja acetilholina (Blandina *et al.*, 2004).

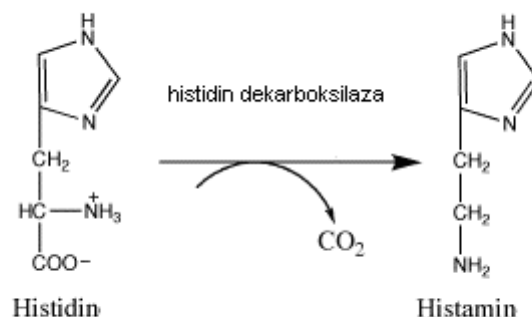
Receptorji H₄ so bili odkriti pred kratkim (Tamaki *et al.*, 2000). Po strukturi in specifični vezavi so zelo podobni receptorjem H₃. Preferenčno se nahajajo v levkocitih in ostalih imunskih celicah, v možganih pa jih sprva sploh niso zaznali. Kasnejše raziskave so pokazale, da se nahajajo tudi v možganih, predvsem v sloju granularnih celic dentatnega girusa ter sloju piramidalk v hipokampalni formaciji. Za odkritje njihove funkcije v OŽ pa bodo potrebne dodatne raziskave (Takemura *et al.*, 2003).

2.6.3 SINTEZA, SPROŠČANJE IN INAKTIVACIJA HISTAMINA

Kot rečeno sodi histamin med biogene amine. Zanje je značilno tudi to, da se ne sintetizirajo po splošnih biokemičnih poteh (Kandel *et al.*, 2000). V vseh delih telesa se histamin sintetizira iz L-histidina.

Na periferiji poteka **sinteza** v Golgijevelem aparatu mastocitov in bazofilcev s pomočjo L-aromatične aminokislinske dekarboksilaze. Te celice sintetizirani histamin nato shranijo v sekretorne granule (Rang *et al.*, 2007).

Sinteza histamina v OŽ pa poteče v enem koraku z dekarboksilacijo. Pri tem sodeluje encim L-histidin dekarboksilaza v histaminergičnih nevronih (Kandel *et al.*, 2000). Novo sintetizirani nevrnalni histamin se transportira v histaminske nevrnalne vezikle z vezikularnim monoaminskim transporterjem (VMAT2). Depolarizacija nevrnalnih končičev aktivira eksocitotsko sproščanje histamina (gre za napetostno in od Ca²⁺ odvisen mehanizem). Po sprostitvi histamin aktivira postsinaptične in presinaptične receptorje (Houhg, 2006).

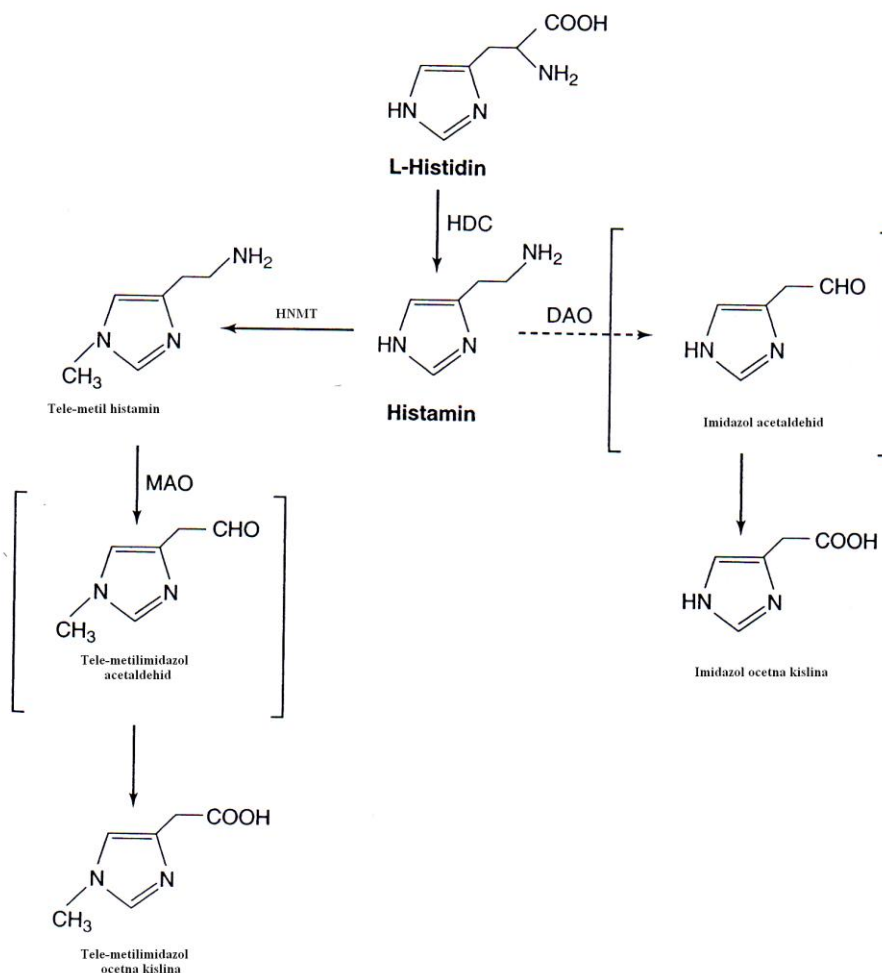


Slika 5 : Shematski prikaz sinteze histamina s pomočjo encima L-histidin dekarboksilaze (povzeto po Nestler *et al.*, 2003: str. 208)

Po **sprostivni** histamina je ključnega pomena tudi njegova hitra odstranitev z mesta delovanja. S tem se omeji trajanje sinaptične komunikacije kot tudi difuzija do ostalih sinaptičnih mest, onemogoči se recikliranje ter ponovna uporaba nemetaboliziranega histamina, kar posledično privede do redukcije potrebnih snovi za sintezo nevrottransmitorja *de novo*. Hiter vpad koncentracije sproščenega histamina je možen, zaradi difuzije v ekstracelularno tekočino, ponovnega privzema sproščenega nevrottransmitorja v presinaptične nevrone, encimske razgradnje ter transporta v presinaptično locirane astrocite, kjer tudi poteče encimska razgradnja (Perdan *et al.*, 2009).

Pomembna pot inaktivacije histamina je njegov **metabolizem**. Metabolizira pa se po dveh poteh:

- najpomembnejša pot za razgradnjo histamina v možganih je metilacija z histidin N-metiltransferazo (HNMT), ki je intracelularni encim, pri čemer nastane tele-metilhistamin. Sledi še oksidacija stranske verige tele-metilhistamina z diamino oksidazo (DAO) ali monoamin oksidazo tipa B (MAO B) (oba sta znotrajcelična encima).
- druga pot pa je oksidativna deaminacija z ekstracelularno diamino oksidazo, ki tele-metilhistamin pretvori v metilimidazolocetno kislino (Haddock *et al.*, 1987, Ogasawara *et al.*, 2006).



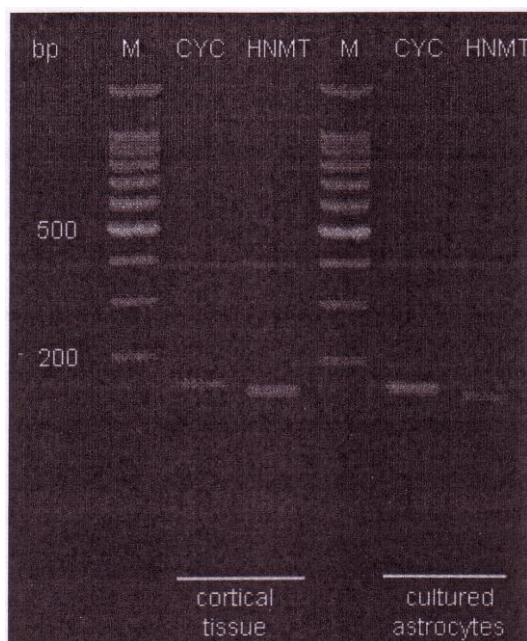
Slika 6 : Slika prikazuje sintezo in metabolizem histamina. Polna črta prikazuje pot pretvorb histamina v OŽ, prekinjena črta pa dodatno pot razgradnje izven OŽ (povzeto po Houhg, 2006: str: 250).

V osrednjem živčevju sesalcev niso odkrili aktivnosti DAO. Do sedaj dokazana ekspresija DAO je omejena na ledvica, priželjc, posteljico in črevesje (Tahara *et al.*, 2000), zato velja mnenje, da je HNMT edini encim, ki inaktivira histamin živčnega izvora. To trditev potrjujejo tudi rezultati pridobljeni iz študije, v kateri so Takemura in sodelavci (2003) preverjali učinek inhibitorja HNMT (S-[4-(N,N-dimethylaminobutyl)isothioureia) ter inhibitorja DAO (aminogvanidin) na akumulacijo inozitol fosfata (IP). Opazili so, da inhibitor HNMT premakne krivuljo koncentracija-odgovor za polovično vrednost v levo, inhibitor DAO pa ni imel efekta, kar dokazuje, da poteka razgradnja histamina v OŽ s HNMT in ne z DAO (Takemura *et al.*, 2003).

Predhodne študije so pokazale, da inhibicija HNMT s specifičnim inhibitorjem reducira privzem histamina v želodčno mukozo pri zajcih. To dokazuje, da je privzem histamina sklopljen z njegovo metilacijo (Tahara *et al.*, 2000).

2.6.3.1 HISTAMIN N-METILTRANSFERAZA (HNMT)

Encim HNMT so našli pri vseh vrstah vretenčarjev. Njegova močna ekspresija je bila potrjena predvsem v ledvicah, jetrih, črevesju, prostati, ovarijih ter hrbtenjačnih celicah (Horton *et al.*, 2005). Visoka koncentracija HNMT v gastrointestinalnem traktu nakazuje na njeno pomembno vlogo pri inaktivaciji histamina iz hrane (Tahara *et al.*, 2000). Osredkar in sodelavci (2009) so na agaroznem gelu z dodatkom etidijevega bromida dokazali izražanje HNMT tako v možganski skorji kot v astrocitih, vzgojenih iz možganske skorje podgan.



Slika 7 : Izražanje histamin N-metil-transferaze mRNA v skorji možgan neonatalnih podgan ter v kulturi astrocitov, pridobljeni iz iste možganske regije. CYC (hišni gen ciklofilin) je pozitivna kontrola (povzeto po D. Osredkar *et al.*, 2009, vol.58, str: 99).

HNMT ima dve strukturni domeni, ki vključujeta metilni donor S-adenozil-L-metionin, vezavno domeno ter histamin-vezavno domeno (Horton *et al.*, 2005).

Za ta citosolni encim je značilna velika specifičnost za substrat. Zato preseneča dejstvo, da so njegovi inhibitorji tako po kemijski strukturi kot farmakološko gledano zelo raznolike spojine (Horton *et al.*, 2005). Tahara in sodelavci (2000) so v raziskavi odkrili, da je metoprin (inhibitor HNMT) povečal znotrajcelični nivo histamina v hipotalamični regiji podganjih možgan. Aktivnost HNMT ima torej vpliv na koncentracijo ekstracelularnega histamina v osrednjem živčevju (Tahara *et al.*, 2000).

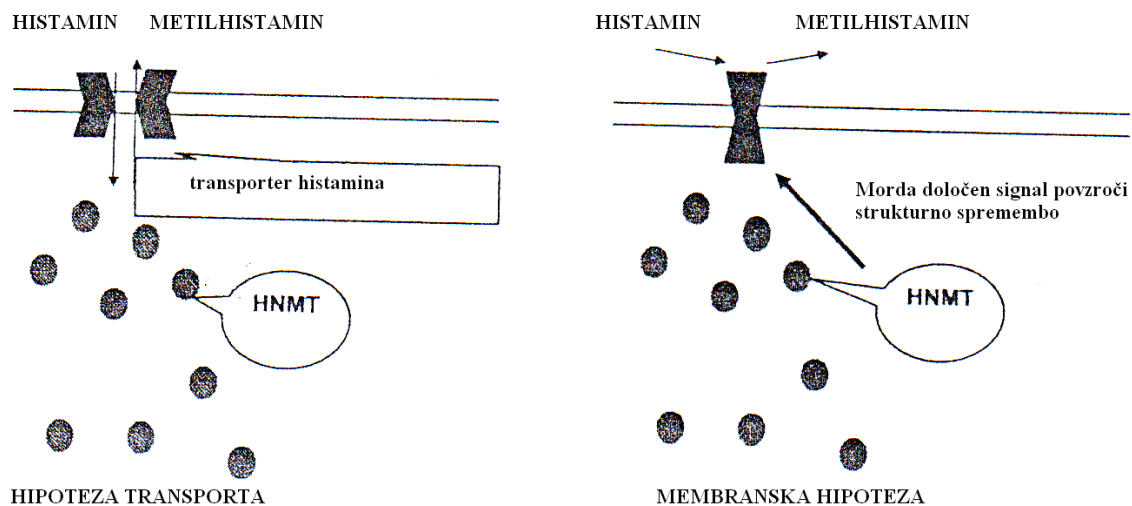
Ker je histamin pozitivno nabita molekula in kot taka nesposobna hitrega prehoda preko membrane v intracelularni prostor, kjer se nahaja encim HNMT, prevladuje predvidevanje, da obstaja visoko afinitetni transportni sistem za prenos histamina.

2.6.3.2 PRIVZEM HISTAMINA V CELICE, KJER DELUJE HNMT

Specifičen transporter za histamin do danes še ni znan. Obstajajo pa jasni dokazi, da privzemajo histamin tako astrociti (Kržan *et al.*, 2006) kot nevroni (Sakurai *et al.*, 2005). Odkrili so tudi visoko afinitetni privzem histamina v fotoreceptorje pri nevretenčarjih (Takemura *et al.*, 2003). Transport histamina v nevrone je odvisen od Na^+ , Cl^- in HCO_3^- (Sakurai *et al.*, 2005), medtem, ko je transport histamina v astrocite odvisen le od prisotnosti Na^+ (Kržan *et al.*, 2006). Zadnje dokazuje tudi občutljivost privzema histamina v astrocite na dodatek ouabaina (inhibitor Na^+, K^+ -ATPaze) (Kržan *et al.*, 2006, Perdan *et al.*, 2010). Pri odstranitvi zunajceličnega histamina pa naj bi astrociti, poleg aktivnega transporta, sodelovali tudi z elektrodifuzijo. Ta proces naj bi prispeval k odstranitvi histamina ne glede na zunanjo temperaturo in je odvisen od transmembranskega koncentracijskega gradienta ^3H -histamina (Osredkar *et al.*, 2009).

Ena od raziskav, ki so jo opravili Ogasawara in sodelavci leta 2006, pa prikaže rešitev tega vprašanja v dveh hipotezah. Prva je hipoteza plazemske membrane, po kateri naj bi se HNMT prenesla na plazemsko membrano in tako delovala na celičnem površju pod vplivom rastnih faktorjev. Druga hipoteza pa predvideva, da sodelujeta transporterja za organske katione (organic cation transporter) OCT2 in OCT3 tudi pri transportu histamina v celico. Pri preverjanju prve hipoteze so dokazali, da se HNMT po receptorsko posredovanem stimulusu (npr. epidermalni rastni faktor) transportira na plazemsko membrano. A so nadaljnji poskusi pokazali, da membranska translokacija encima ne sodeluje pri metilaciji histamina,

temveč ima vlogo pri inhibiciji metabolizma encima. Torej je hipoteza transporta bolj verjetna od hipoteze plazemske membrane (Ogasawara *et al.*, 2006).



Slika 8 : Shematski prikaz hipotez histaminske metilacije z histamin N-metiltransferazo (povzeto po Ogasawara M. *et al.*, 2006, str: 25)

2.6.3.3 TRANSPORTERJI, KI BI LAHKO SODELOVALI PRI PRIVZEMU HISTAMINA

Ko govorimo o transporterjih imamo v mislih membranske proteine, katerih glavna funkcija je olajšati pretok molekul v in iz celic (Perdan *et al.*, 2009). Večina membranskih transporterjev je oligospecifičnih, specializiranih za prenos specifičnih metabolitov ali hranilnih snovi. Polispecifični transporterji pa so sposobni sprejeti snovi različnih velikosti in struktur. Polispecifični organski kationski transporterji sodijo v družini SLC22 (solute carriers) in MATE (multidrug and toxic compound extrusion, pred kratkim odkriti sesalčki protonsko kationski antiporterji) (Koepsell *et al.*, 2007).

Za SLC transporterje je značilno, da nimajo ATP-vezavnih mest, temveč delujejo v odvisnosti od tokov Na^+ . SLC družini pripadata dva velika razreda neurotransmitorskih transporterjev na celični membrani nevronov in celic glije, SLC1 in SLC6. V družini SLC1 je visokoafinitetni prenašalec glutamata. V SLC6 družino sodijo transporterji za dopamin, serotonin, noradrenalin, glicin in GABA. Biogeni amini pa se lahko prenašajo v nevrone in astrocite tudi preko organskih kationskih transporterjev (OCT), ki sodijo v družino SLC22, ta vsebuje tri podtipne organskih kationskih transporterjev, ki jih imenujemo OCT1, OCT2 in OCT3. V

primerjavi s transporterji iz družin SLC1 in SLC6 imajo transporterji OCT nizko afiniteto za vezavo molekul, a veliko večjo kapaciteto prenosa (Perdan *et al.*, 2009).

Transporterji OCT imajo značilno zgradbo. Sestojijo iz 12 alfa-helikalnih transmembranskih domen, intracelularnega konca N, velike ekstralularne glikozilirane zanke med prvo in drugo transmembransko domeno, intracelularne zanke s fosforiliranimi mesti med šesto in sedmo transmembransko domeno ter intracelularnega konca C (Koepsell *et al.*, 2007). OCT1 se nahajajo predvsem v epitelnih celicah in nekaterih nevronih, pri človeku se najmočneje izražajo v jetrih, našli pa so jih tudi v tumorskih celicah. Tudi OCT2 se izražajo v celicah epitelov in nevronskih celicah, najmočneje pa so izraženi v ledvicah. OCT3 transportni sistem pa najdemo v epitelnih celicah, nevronskih celicah, mišičnih celicah ter celicah glije (Ogasawara *et al.*, 2006).

Za transporterje OCT je značilno, da so sposobni transporta strukturno zelo različnih organskih kationov ter šibkih baz, ki so pri fiziološkem pH pozitivno nabite. OCT tako prenašajo endogene substance, zdravila ter ksenobiotike. Prenos poteka na elektrogen način, kar dokazuje tudi dejstvo, da se sproščanje histamina poveča z visoko koncentracijo K^+ ionov (Huszti 2003) in je neodvisen od Na^+ . Prenos organskih kationov preko plazemske membrane je možen v obeh smereh (Koepsell *et al.*, 2007).

Pokazalo se je, da ima OCT3 zelo visoko afiniteto za prenos histamina. A naj bi služil predvsem pri prenosu ne-nevronskega histamina, npr. pri prenosu histamina v bazofilce. To potrjuje tudi študija z uporabo inhibitorjev OCT (decinij-22 in kortikosterona), ki ni pokazala značilne razlike v primerjavi s kontrolnim poskusom, kar dokazuje, da OCT3 transporterji ne sodelujejo pri privzemu histamina v astrocite (Perdan *et al.*, 2009).

Aktivnost transporterjev se stalno spreminja glede na spremembe mikro okolja (Perdan *et al.*, 2009).

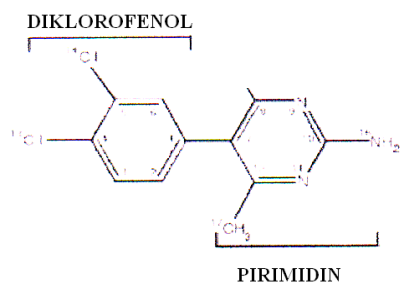
2.6.3.4 INHIBICIJA HNMT

Inhibitorji HNMT strukturno in farmakološko zelo raznolike molekule. Značilno je, da zasedejo vezavno mesto za histamin na encimu ter tako preprečijo vezavo histamina in posledično njegov metabolizem.

Kot inhibitorji HNMT delujejo npr. antagonist histaminskih receptorjev H₁ difenhidramin, antiholinesterazno zdravilo takrin, antimalarik amodiakvin, citostatik metoprin in mnogi drugi. Zanimivo pri tem je, da so vse našteje snovi velike in kompleksne molekule, histamin pa je relativno majhna molekula. Kako je možno, da se tako različne molekule vežejo na isto vezavno mesto?

Pri ugotavljanju strukturnih značilnosti vezave inhibitorjev so ugotovili, da pri vezavi inhibitorja pride do največje konformacijske spremembe na aromatskem obroču na koncu N, ta pa predstavlja eno steno aktivnega stranskega žepa, ki se tako lahko spreminja v velikosti. Tako se aktivni žep z lahkoto prilagaja majhni molekuli histamina in veliki molekuli inhibitorja. A kljub veliki fleksibilnosti v velikosti vezavne molekule, je povezava med inhibitorjem in HNMT zelo močna. Pri jakosti povezave igra odločilno vlogo polarni atom inhibitorja (pri amodiakvinu je to O19, pri metoprinu pa sta to N11 in N14), saj ima ta zmožnost tvorbe vodikovih vezi. Močna vezava inhibitorja z HNMT pa je posledica tudi velikega števila van der Waalsovih interakcij z molekulami inhibitorja (Horton *et al.*, 2005).

2.6.3.4.1 METOPRIN

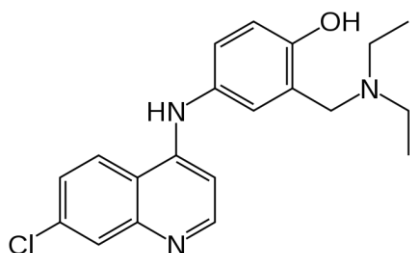


Slika 9 : Shematski prikaz strukture metoprina (prirejeno po Horton *et al.*, 2005, str: 338).

Metoprin poleg že omenjene inhibicije HNMT, inhibira tudi dihidrofolatno reduktazo, kar zmanjša celični metabolizem folne kisline ter celično rast. Metoprin je lipidotopen in kot tak zmožen prečkanja krvo-možganske bariere (<http://www.cancer.gov/>).

Metoprin se specifično veže na HNMT, tako da se z aromatskim obročem globoko zasidra v aktivne žepe encima. Diklorofenolni obroč se veže na hidrofobno mesto encima, pirimidinski obroč pa v bližino Glu28 (Horton *et al.*, 2005).

2.6.3.4.2 AMODIAKVIN



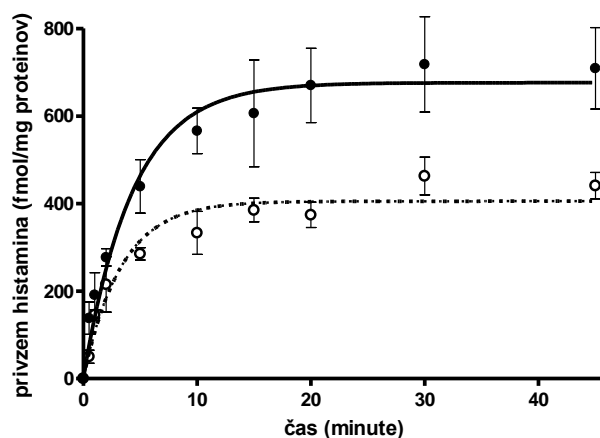
Slika 10 : Shematski prikaz strukture amodiakvina. (povzeto po wikipedia.com)

Amodiakvin se uporablja kot antimalarik, primeren je za zdravljenje okužbe s *Plasmodium falciparum*, predvsem pri ljudeh, ki živijo oz. se dalj časa nahajajo na področjih, kjer lahko pride do okužbe. Amodiakvin se veže na jedrne proteine in inhibira DNA ter RNA polimerazo. Visoke koncentracije amodiakvina so našli v lizosomih parazita, kar parazitu preprečuje metabolizem hemoglobina, od česar je energetsko odvisen. Poleg tega amodiakvine deluje tudi protivnetno (<http://www.malariaipca.com/>). Sam mehanizem prehajanja amodiakvina v možgane ni znan, jasen pokazatelj, da vanje prehaja, so neželeni učinki, ki jih tam povzročajo (Phillips-Howard, 1995).

Presenetljivo pri vezavi amodiakvina na HNMT je, da se na eno molekulo encima vežeta kar dve molekuli inhibitorja. Ena zasede aktivni žep, za to vezavo se domneva, da je kompetitivna. Druga molekula amodiakvina pa se veže v globoki žep na zunanji površini, šlo naj bi za nekompetitivno vezavo. Prav kombinacija kompetitivne in nekompetitivne vezave naj bi bila vzrok za najučinkovitejšo inhibicijo HNMT med znanimi inhibitorji (Horton *et al.*, 2005).

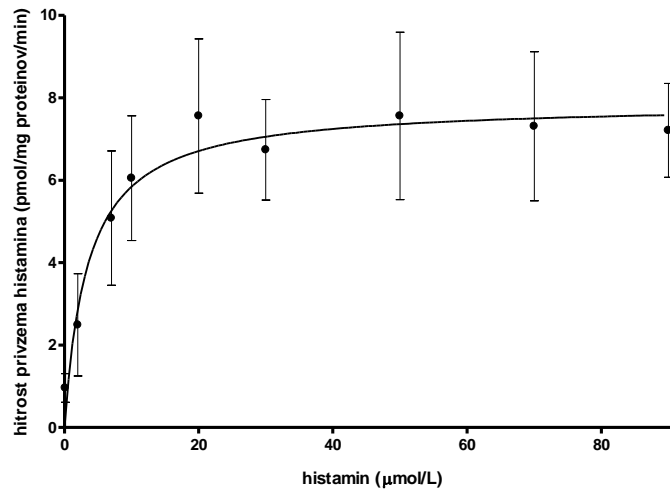
2.6.4 KINETIKA PRIVZEMA HISTAMINA V NEONATALNE ASTROCITE

Privzem histamina v neonatalne astrocite je odvisen od temperature ter časa inkubacije. Privzem se pojavi tako pri nizkih temperaturah (4°C) kot pri višjih temperaturah (37°C), a je pri nizkih znatno nižji. V obeh primerih pa sprva, s podaljševanjem časa inkubacije, narašča ter doseže plato pri 20 minutni inkubaciji. Najvišji privzem 3-Hhistamina v neonatalne astrocite podgan, ki so ga zabeležili D. Osredkar in sodelavci, je bil, po 20 minutni inkubaciji pri 37°C, 670 ± 85 fmol/mg proteinov. Pri visoki temperaturi k odstranitvi histamina znatno prispevata tako pasivni transport (difuzija) kot aktivni transport, pri nizkih temperaturah pa je aktivni transport nepomemben (Osredkar *et al.*, 2009).



Slika 11 : Prikaz časovnega privzema ^3H -histamina v primarne kulture neonatalnih astrocitov podgan. Celice so bile inkubirane v pufru za privzem pri 37°C (polni simboli) ter pri 4°C (prazni simboli). Vsaka točka predstavlja srednjo vrednost \pm SEM poskusa (n=6). Privzem ^3H -histamina pri 4°C je bil značilno nižji ($p < 0.0002$) kot privzem merjen pri 37°C (Osredkar D. in sodelavci., 2009).

Rezultati predhodnih poskusov so dokazali tudi, da je privzem histamina od koncentracije odvisen, nasitljiv proces. Histamin se v neonatalne astrocite privzema s K_m $3,5 \pm 0,8 \mu\text{M}$ in V_{max} $7,9 \pm 0,3 \text{ pmol/mg proteinov /min}$ (Papler T in Pečavar B, 2006).



Slika 12 : Slika prikazuje hitrost privzema histamina v astrocite.

3. MATERIAL IN METODE DELA

3.1 MATERIALI

Vsi mediji za gojenje celičnih kultur, razen fetalnega govejega seruma, ki ga izdeluje Cambex, Belgija, so proizvod tovarne GIBCO, Velika Britanija. Uporabljene so bile še naslednje snovi: [³H]-histamin (66,7 GB q/mmol) Perkin Elmer, ZDA, amodiakvin Sigma, ZDA in metoprin Burroughs Wellcome Co., ZDA.

3.2 METODE

3.2.1 ŽIVALI

Za pripravo primarnih kultur astrocitov smo uporabili možganske skorje tri dni starih mladičev podgan obeh spolov seva Wistar po metodi Schwartzove in Wilsonove (1992). Vsi postopki na živalih so bili opravljeni v skladu z dovoljenjem Veterinarske uprave Republike Slovenije za izvajanje poskusov na živalih št. 323-02-232/2005/02 ter s smernicami za delo s poskusnimi živalmi, ki ga je izdal Komite za zaščito živali Nacionalnih Inštitutov zdravja, Bethesda, ZDA.

3.2.2 PRIPRAVA PRIMARNIH CELIČNIH KULTUR ASTROCIT

Poskusne živali je z dekapitacijo evtanaziral tehnik, ki ima za izvajanje evtanazacije poskusnih živali dovoljenje. Iz lobanje je nato previdno odstranil možgane in jih potopil v raztopino Leibowitz L-15 (ki vsebuje BSA – serumski goveji albumini, gentamicin in L-15). Nato je odstranil možganske ovojnice in možgansko skorjo. Po tem smo tkivo prenesli v 15 mililiterske centrifugirke, dodali raztopino L-15 ter s pomočjo pipet in igel različnih svetlin, mehansko razdrobili možgansko tkivo. Sledilo je 4 minutno centrifugiranje pri 1200 obratih/minuto. Po centrifugiranju smo supernatant odlili, usedlino pa zopet mehansko razdrobili v raztopini L-15 ter ta postopek ponovili tri-krat. Končno usedlino smo še precedili preko sterilnega niteksa ter ponovili centrifugiranje pri 1200 obratih/minuto. Po končanem

postopku smo v vsako gojitveno stekleničko prenesli skupno 15 mililitrov tekočine, ki je vsebovala v postopku pridobljene celice ter gojitveni medij.

Medij za gojenje astrocitov je imel naslednjo sestavo: gentamicin, piruvat, L-glutamat, fetalni kravji serum ter po Dulbeccu modificiran Eagleov medij (DMEM), z visoko koncentracijo glukoze.

Celice smo nato v gojitvenih stekleničkah vzgajali v inkubatorju pri 37°C, v mešanici 95% zraka in 5% CO₂.

Medij smo med gojitvijo menjali 2-3krat tedensko, dokler niso kulture prvič postale konfluentne. Takrat smo celice stresali preko noči pri 225 obratih/minuto in naslednje jutro zamenjali gojitveni medij. Ta postopek smo ponovili dvakrat.

Po ponovitvi postopka smo odlili medij in dodali 4 ml tripsina, inkubirali 20 minut in nato še mehansko, s strgalcem, odlepili celice od podlage. Odlepljene celice smo prenesli v nove gojitvene posode in inkubirali preko noči. Postopek tripsinizacije smo ponovili in zopet gojili preko noči v svežem mediju. Nato smo prenesli astrocite v gojilne posode z 12 petrijevskami (v vsako smo dali približno 1 ml medija z celicami).

Za nadaljnje raziskave smo torej uporabili astrocite po treh tednih gojenja v drugi pasaži.

3.2.3 PRIVZEM HISTAMINA

Odstranili smo gojitveni medij in plošče s celicami dvakrat sprali z 1 ml pufru za privzem s CaCl₂, ki smo ga po spiranju odlili. Nato smo v vsako petrijevko s konfluentnimi astrociti dodali pufer s CaCl₂ in različne koncentracije testnih snovi, ki so opisane v nadaljevanju. Vsaka koncentracija je bila dodana v treh paralelkah. Privzem histamina se bo začel z dodatkom 125 nmol/L ³H-histamina. Po pretečenem času (20 minut) smo reakcijo ustavili tako, da smo posodice položili v ledeno kopel in hitro odstranili inkubacijski medij. Sledilo je trikratno spiranje posodic s celicami z ledeno mrzlim pufrom, ki ni vseboval CaCl₂. Sledila je še denaturacija z 0,6 ml 0,5 M NaOH, ki je povzročila odstopanje celic. Na koncu smo celice še stresali na stresalniku 10 min pri 200 obratih/min.

V 0,5 ml vsakega vzorca smo izmerili radioaktivnost s scintilacijskim števcem (Mikrobeta, Perkin Elmer, ZDA), v preostanku vzorca (0,1 ml) pa koncentracijo proteinov s pomočjo metode BioRad.

3.2.3.1 TESTNE SNOVI

- FETALNI GOVEJI SERUM – FBS

Zanimal nas je vpliv dodatka 10% govejega seruma na privzem histamina v astrocite, zato smo v polovico petrijevk s konfluentnimi astrociti poleg pufra s CaCl_2 dodali še 10% FBS ter v nekaterih poskusih tudi različne koncentracije testnih snovi, ki so opisane v nadaljevanju. Fetalni goveji serum je plazma, ki ostane po koagulaciji krvi. Fibrinogen se pretvori v fibrin, vsebuje malo antiteles ter veliko rastnih faktorjev. Glavna komponenta je BSA – serumski albumin.

- AMODIAKVIN

Preverjali smo vpliv amodiakvina na privzem histamina. V vsako od petrijevk s konfluentnimi astrociti smo dodali eno od koncentracij amodiakvina – 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M.

- METOPRIN

Zanimal nas je tudi inhibitorni vpliv metoprina. V posodice za privzem s konfluentnimi astrocitami smo dodali eno od koncentracij metoprina - 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M.

Preverjali smo tudi učinek obeh inhibitornih snovi ob hkratnem delovanju. V tem delu poskusa smo v vsako od petrijevk s konfluentnimi astrocitami dodali eno od izbranih koncentracij amodiakvina ter metoprina - 10^{-2} M metoprin + 10^{-2} M amodiakvin, 10^{-3} M metoprin + 10^{-3} M amodiakvin, 10^{-4} M metoprin + 10^{-4} M amodiakvin.

3.2.4 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV

Za določanje proteinov smo uporabili metodo po Bradfordovi (BioRad).

3.2.5 ANALIZA PODATKOV

Vse poskuse smo izvedli v treh paralelkah in večkratnih ponovitvah. Vse vrednosti so označene kot aritmetična sredina \pm standardna napaka aritmetične sredine (SEM). Kinetične parametre privzema smo izračunali s pomočjo računalniškega programa Prism4, verzija 4.00 (GraphPad Software Inc., San Diego ZDA). Statistično razliko smo izračunali s Studentovim t-testom ali enosmerno analizo variance in Bonferronijevim testom.

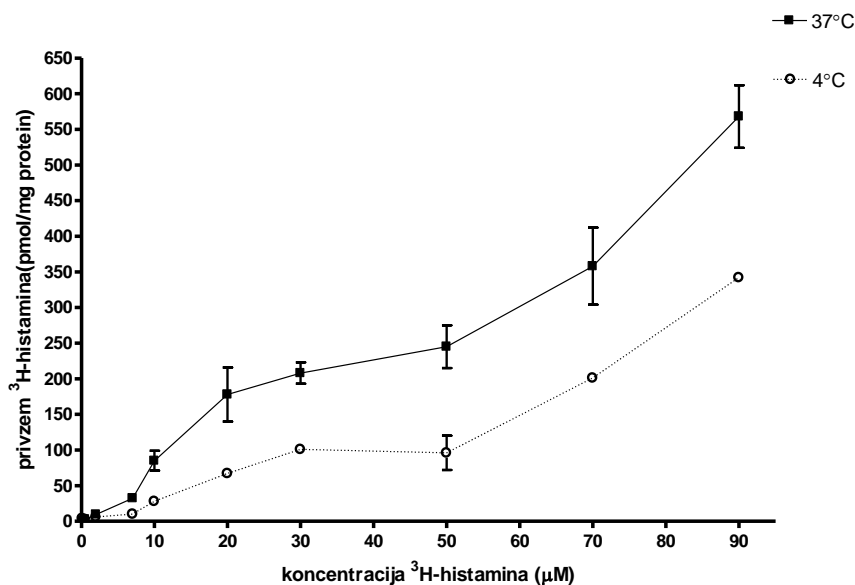
Statistično značilno razliko predstavlja vrednost $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI

Predhodne raziskave potrjujejo trditev, da astrociti privzemajo histamin. Privzem je temperaturno in časovno odvisen proces (Osredkar *et al.*, 2009). Hkrati pa so Haddock in sodelavci (1987) ugotovili, da se privzem histamina v endotelijske celice človeka poveča, če povečamo količino dodanih proteinov. Zato nas je zanimalo ali dodatek 10% FBS pufri za privzem vpliva tudi na privzem histamina v astrocite.

Kot rečeno, je inaktivacija neurotransmitorja zelo pomemben korak pri pravilnem delovanju transmitorjev. V naši raziskavi smo iskali predvsem soodvisnost privzema ter metabolizma histamina v astrocitih kot pomembnega dejavnika inaktivacije. Osredotočili smo se na vpliv dveh inhibitorjev HNMT – metoprina in amodiakvina – na privzem histamina v astrocite. Proučevali smo tudi njun hkratni učinek. Ker omenjeni zdravili učinkujeta intracelularno, nas je zanimalo ali se morda privzemata v celico preko istega transportnega sistema kot histamin.

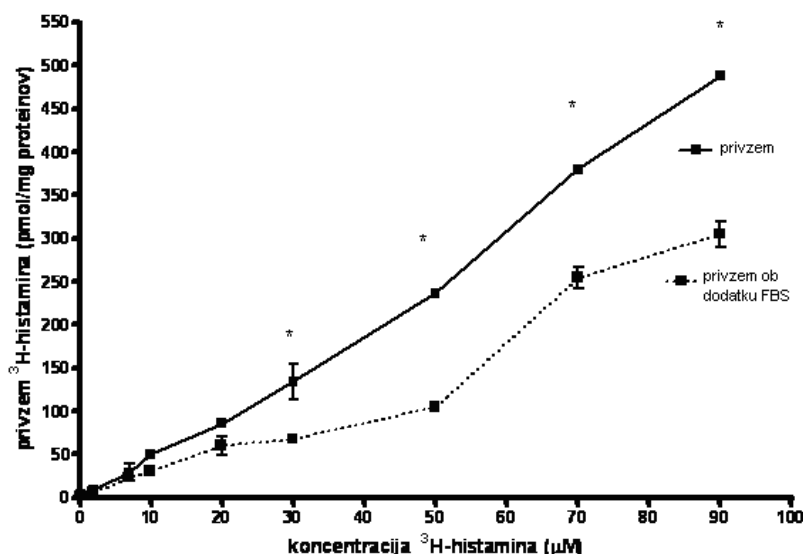
4.1 PRIVZEM HISTAMINA V NEONATALNE ASTROCITE V ODVISNOSTI OD TEMPERATURE



Slika 13 : Graf prikazuje koncentracijsko odvisnost privzema (20 min) ³H-histamina v kulture neonatalnih astrocitov v odvisnosti od temperature. Polni simboli predstavljajo rezultate pridobljene pri inkubaciji pri 37°C, prazni pa pri 4°C. Vsaka točka predstavlja srednjo vrednost ± SEM (n=6).

Iz grafa koncentracijske odvisnosti privzema histamina v neonatalne astrocite podgan je jasno razvidno, da poteka privzem tako pri nizki temperaturi (4°C) kot pri višji temperaturi (37°C). Ne pri nizki, ne pri visoki temperaturi ni bil proces nasitljiv. V obeh primerih privzem narašča z naraščanjem koncentracije ³H- histamina. Razvidno pa je tudi, da so vrednosti privzema pri višji temperaturi znatno višje.

4.2 VPLIV DODATKA 10% FBS PUFRU ZA PRIVZEM NA PRIVZEM HISTAMINA

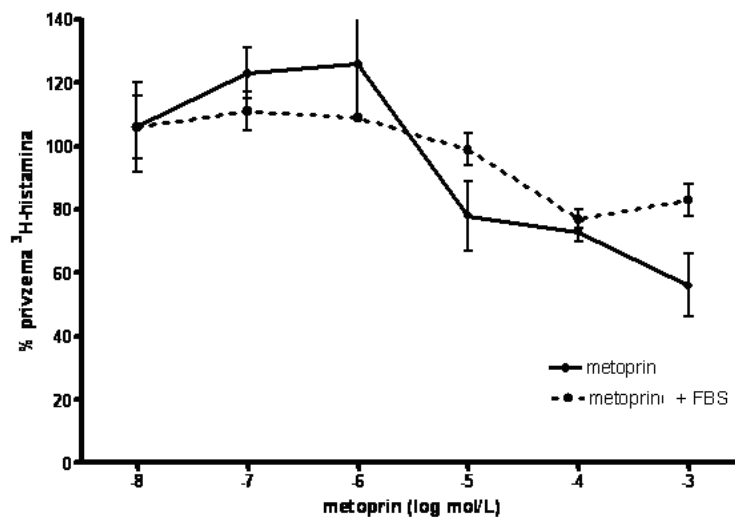


Slika 14 : Rezultati predstavljajo koncentracijsko odvisnost privzema ³H- histamina pri 37°C v kulture neonatalnih astrocitov ter vpliv FBS. Kulturi neonatalnih astrocitov smo dodali pufer za privzem (polna črta na grafu) ali pufer za privzem, ki smo mu dodali 10% FBS (črtkana črta na grafu) ter različne koncentracije ³H- histamina. Po 20 minutah smo privzem prekinili. Vsaka točka predstavlja srednjo vrednost ± SEM (n=6).

Grafično predstavljeni rezultati kažejo na to, da privzeta količina ³H-histamina v neonatalne astrocite podgan narašča skupaj z naraščanjem koncentracije ³H-histamina tako pri uporabi pufera za privzem, kot če uporabimo pufer za privzem z dodatkom 10% FBS. Proces ni bil nasitljiv tudi, ko smo uporabili najvišje koncentracije histamina. Jasno pa je razvidno tudi, da dodatek 10% FBS znatno zniža privzem ³H-histamina v neonatalne astrocite podgan. Dodatek FBS v inkubacijski medij pomakne krivuljo koncentracijske odvisnosti privzema histamina v desno, kar pomeni, da FBS preprečuje privzem histamina v astrocite neonatalnih podgan v primarni kulturi.

V nadaljnjih poskusih smo proučevali vpliv inhibitorjev HNMT na privzem histamina. Uporabili smo metoprin in amodiakvin v dveh eksperimentalnih razmerah: v inkubacijskem mediju z in brez prisotnosti FBS.

4.3 VPLIV METOPRINA NA PRIVZEM HISTAMINA V NEONATALNE ASTROCITE

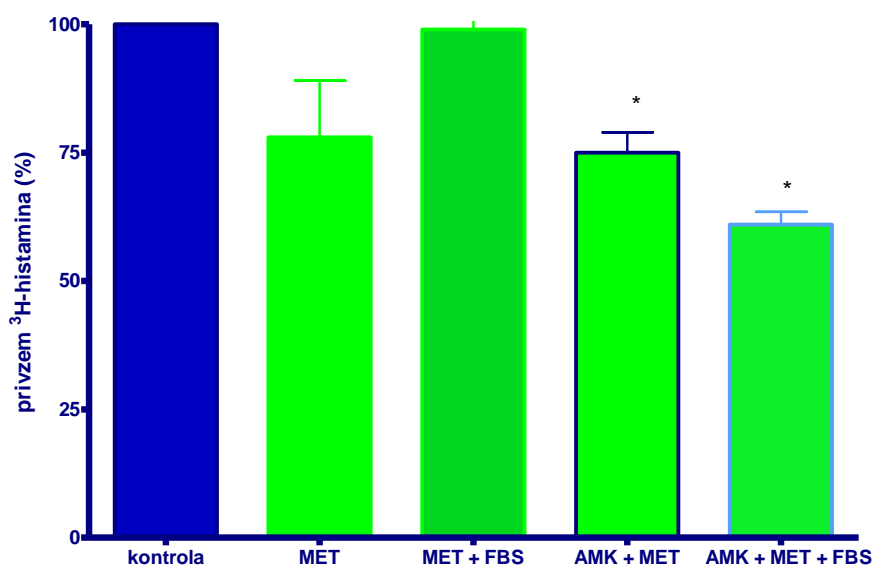


Slika 15 : Graf prikazuje vpliv metoprina na privzem ³H-histamina. Astroците smo 20 minut predinkubirali z metoprinom, preden smo dodali še ³H- histamin. Privzem je potekal pri temperaturi 37°C, 20 minut. Vsaka točka predstavlja srednjo vrednost ± SEM (n=6).

Iz naših rezultatov je razvidno, da se pri nizkih koncentracijah metoprina (10^{-8} , 10^{-7} in 10^{-6}) % privzema ³H-histamina povečuje. A povečanje privzema ni statistično značilno.

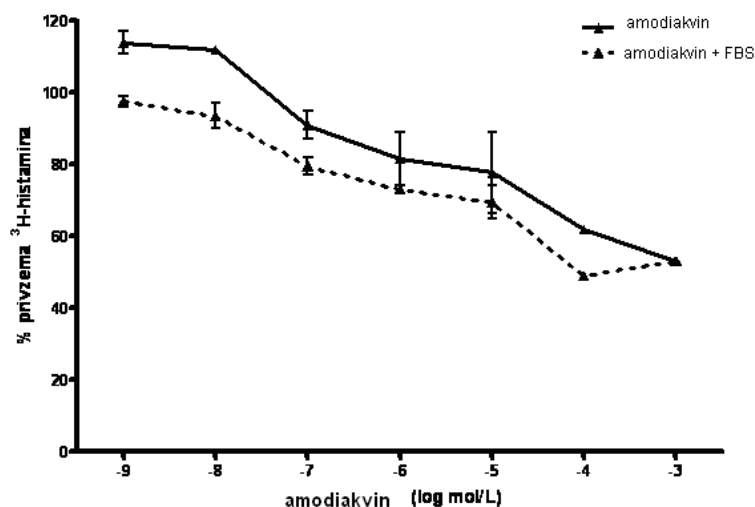
Dodatek FBS inkubacijskemu mediju privzem histamina najprej zniža, kasneje pa ga poveča, vendar statistično neznačilno.

Sočasno delovanje metoprina in amodiakvina statistično zmanjša privzem histamina. Enak učinek opazimo, če privzem histamina izvedemo v mediju, ki vsebuje FBS (sliki 16 in 18).



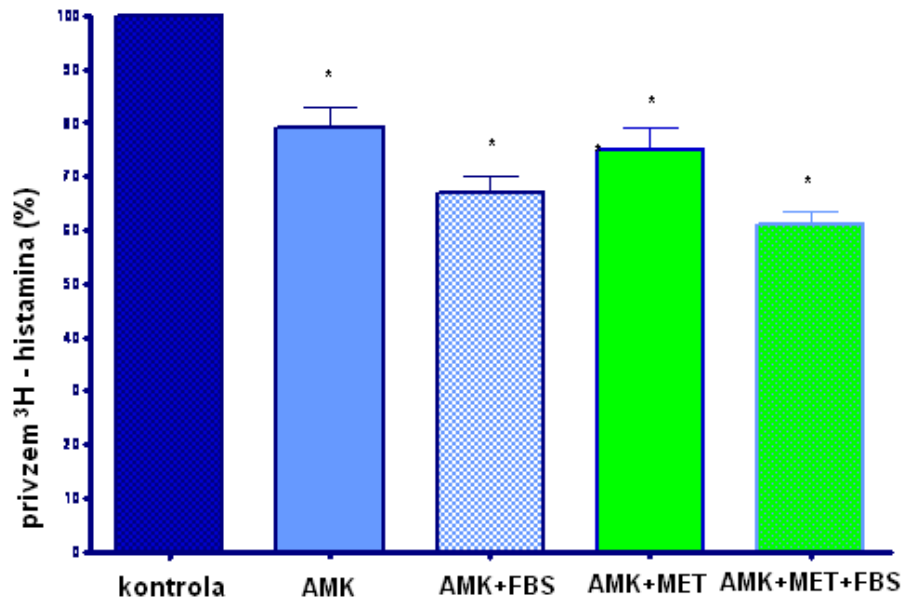
Slika 16 : Graf prikazuje primerjavo med metoprinom (MET) (10 μ M) ter amodiakvinom (AMK) (10 μ M) na transport histamina v neonatalne astrocite. Astrocite smo predinkubirali 20 minut z metoprinom, preden smo dodali še ³H- histamin. Privzem je potekal pri temperaturi 37°C. Po dvajsetih minutah smo privzem prekinili. Vsaka točka predstavlja srednjo vrednost \pm SEM (n=6).

4.4 VPLIV AMODIAKVINA NA PRIVZEM HISTAMINA V NEONATALNE ASTROCITE



Slika 17 : Graf prikazuje vpliv amodiakvina na privzem ³H- histamina ob dodatku FBS in brez dodanega 10% FBS. Astroците smo predinkubirali z amodiakvinom, nato smo dodali še ³H- histamin. Privzem je potekal 20 min pri temperaturi 37°C. Vsaka točka predstavlja srednjo vrednost ± SEM (n=6).

Povečevanje koncentracije amodiakvina znižuje privzem ³H-histamina v neonatalne astrocite podgan. Skoraj enak trend upada je viden tudi, če pufru za privzem dodamo 10% FBS, le da se v tem primeru privzem zniža za približno 10% v primerjavi z inkubacijo le v pufru za privzem. Dodatek FBS pomakne inhibicijsko krivuljo privzema histamina v astrocite vzporedno v levo.



Slika 18 : Graf prikazuje primerjavo vpliva 10 μ M amodiakvina (AMK) ter 10 μ M metoprina (MET) na transport histamina v neonatalne astrocite. Astrocite smo 20 minut predinkubirali z amodiakvinom, nato smo dodali še ³H- histamin. Privzem je potekal 20 minut pri temperaturi 37°C. Vsaka točka predstavlja srednjo vrednost \pm SEM (n=6).

5. RAZPRAVA IN SKLEPI

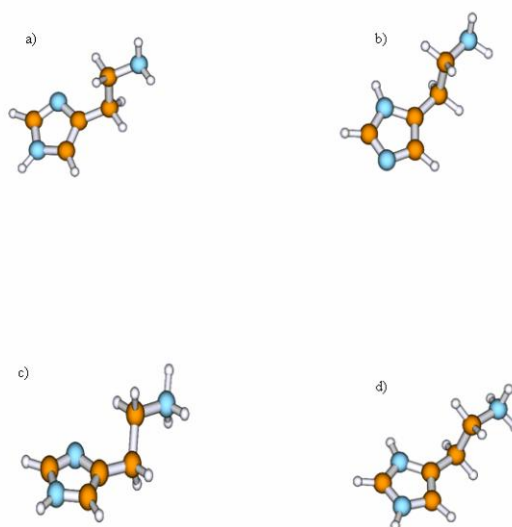
5.1 RAZPRAVA

Histamin je prenašalec v osrednjem živčevju, kjer se sintetizira v presinaptičnih nevronih iz prekursorja histidina. Iz le-teh se po stimulaciji sprošča ter učinkuje v sinapsi in v neposredni bližini sproščanja. Njegovo delovanje je v osrednjem živčevju le lokalno, saj kot nabita molekula ni zmožen prehajati krvo-možganske pregrade. Po posredovanju učinka se relativno hitro inaktivira. Inaktivacija poteče z difuzijo v zunajcelični prostor, z razgradnjo ali pa s ponovnim privzemom.

Histamin posreduje svoje učinke prek vezave na specifične membranske receptorje: H1, H2, H3 in H4. Nespecifično se lahko veže tudi na druga vezavna mesta, npr. na muskarinske receptorje M1 in dopaminske receptorje D2, ki so po strukturi zelo podobni histaminskim H1. Največja podobnost v aminokislinski sestavi je ravno v transmembranskih domenah 3 in 5, kjer se nahaja vezavno mesto za endogene ligande. Iz tega sledi, da se histamin in njegovi ligandi lahko vežejo tudi na druge receptorje. V primeru zdravil npr. antagonistov histaminskih receptorjev H1 je vezava na druge receptorske podtipe odgovorna za nastanek neželenih/stranskih učinkov zdravila.

Rezultati predhodnih poskusov so pokazali, da je privzem histamina odvisen od koncentracije, nasitljiv proces (Papler T in Pečavar B, 2006). V okviru svoje diplomske naloge nisem zaznala nasičenja procesa privzema histamina v astrocite, tudi pri uporabljenih najvišjih koncentracijah, kar pomeni, da imajo astrociti veliko kapaciteto za privzem histamina. To je dodaten dokaz, da so astrociti celice, ki aktivno sodelujejo pri regulaciji ustrezne sestave mikrookolja in zagotavljanju optimalnih razmer za delovanje osrednjega živčevja.

Histamin se pri fiziološkem pH nahaja v dveh različnih monoprotoniranih oblikah s pKa vrednostima 5,8 (dušikov atom na imidazolnem obroču) in 9,4 (dušikov atom na alifatski verigi) ter v obliki dikationa (Perdan *et al.*, 2009). Večina, 96% histamina, se nahaja v obliki monokationa, 3% v obliki dikationa, ostalo pa predstavlja neprotonirana oblika histamina. (Slika 19)



Slika 19 : Strukture različnih tautomernih oblik histamina. Slika a prikazuje nevtralni α tautomer, slika b nevtralni π tautomer, slika c monokation in slika d dikation (povzeto po Perdan-Pirkmajer K. *et al.*, 2010).

Dodan fetalni kravji serum poveča količino eksogenih proteinov v mediju. Glavna komponenta fetalnega kravjega seruma je serumski albumin (BSA). Serumski albumin je v vodi topna beljakovina, ki je pomembna predvsem za zagotavljanje koloidnega osmotskega tlaka v žilah. Poleg omenjene funkcije serumski albumini vežejo tudi kalcijeve ione in prenašajo različne hormone, maščobne kisline, bilirubin in droge, preko histidinskih aminokislinskih ostankov pa delujejo kot pufer v zunajceličnih tekočinah (<http://www.doctorslounge.com/>). Predvidevam, da se del histamina v obliki monokationa s pKa 5.8 veže na albumine v govejem serumu in zaradi tega ne more prehajati skozi membrano astrocita. To sem tudi dokazala v prvem delu raziskave, ko sem se osredotočila na vpliv dodatka 10% FBS pufru za privzem. Histamin v monokationski obliki, s pKa 9.4, pa se lahko veže na kisli protein $\alpha 1$, ki je tudi normalna sestavina FBS, na katerega se vežejo predvsem bazične snovi.

Drugo možnost za zmanjšan privzem histamina v astrocite pa predstavlja morebitni metabolizem histamina v inkubacijskem mediju, ki vsebuje FBS. V FBS niso prisotni le albumini in kisli protein $\alpha 1$, vsebuje lahko tudi DAO, encim, ki razgrajuje histamin v

imidazol acetaldehid (Tahara *et al* 2000). Zato obstaja možnost, ki jo poskus z dodatkom 10% FBS pufri za privzem eksperimentalno podkrepi, da histamin reagira z eksogeno diamino oksidazo, kar se odraža v znižanju privzema ³H-histamina v neonatalne astrocite podgan. To možnost bi potrdili, če bi v inkubacijskem mediju dokazali prisotnost imidazol acetaldehida ali imidazol očetne kisline.

Zanimivo je, da so ravno nasprotno opazili sodelavci, ki so proučevali vpliv histamina na privzem v endotelne celice iz popkovnične vene človeka (Prosen, 2009). Ugotovili so, da dodatek fetalnega govejega seruma signifikantno poveča privzem histamina v endotelne celice v primarni kulturi. Mehanizma, zakaj pride do sinergističnega vpliva DAO na privzem histamina v endotelne celice, si še ne znamo razložiti. Izmerjen učinek pa je dokaz za različno delovanje in vlogo histamina v osrednjem živčevju in zunaj njega, kjer deluje predvsem kot lokalni hormon in mediator vnetja, ne pa kot živčni prenašalec.

Za nemoteno delovanje vseh nevrottransmitorjev je ključnega pomena tudi njihova inaktivacija ter odstranitev z mesta delovanja. V ta namen se histamin v živih sistemih razgrajuje z encimoma DAO in HNMT (v osrednjem živčevju je prisoten le slednji, ki se nahaja v citoplazmi). Da bi se histamin v osrednjem živčevju lahko razgradil, mora torej vstopiti, se privzeti, v živčne celice ali celice glije, ki vsebujejo HNMT. Ker sta za inaktivacijo pomembna tako metabolizem kot privzem (transport) histamina v astrocite, verjetno obstaja korelacija med tema dvema procesoma.

Histamin kot pozitivno nabita molekula ni sposobna hitrega prehoda preko membrane v intracelularni prostor. Zato predvidevamo, da obstaja visoko afinitetni transportni sistem za prenos histamina. Specifični protein, ki deluje kot histaminski transporter, do danes še ni znan. Poleg tega pa obstaja še nizkoafinitetni, neselektivni sistem za privzem histamina, t.i. privzem2, ki poleg histamina privzema še druge nevrottransmitorje, zdravila in ksenobiotike. Nizkoafinitetni transport lahko poteka preko neselektivnih prenašalcev, npr. prenašalcev za organske katione. Histamin tako prehaja v astrocite s pomočjo aktivnega transporta, preko še neznanega transporterja in facilitirane difuzije. Na prenos histamina v astrocite lahko vplivajo različne snovi npr. različna antidepresivna zdravila npr. amitriptalin in dezipramin in antagonist histaminskih receptorjev H1 mepiramin (Osredkar, 2009).

Tudi testni snovi (amodiakvin in metoprin), ki sem ju uporabila v drugem delu diplomskega dela, sta v fizioloških pogojih (pH 7,4) pozitivno nabiti molekuli in ne moreta preiti s preprosto difuzijo preko membrane v intracelularni prostor (kamor pa morata prehajati, če želita delovati na HNMT), ampak morata uporabiti enega od v membrani prisotnih, prenašalnih sistemov. Tako sem z njuno uporabo želela ugotoviti ali morda uporabljata isti transportni sistem za prenos preko membrane v astrocite, kot histamin.

Od opazovanih zdravil, amodiakvina in metoprina, je le amodiakvin statistično značilno zmanjšal privzem histamina v astrocite. Predinkubacija astrocitov z višjimi koncentracijami amodiakvina ($\geq 10 \mu\text{M}$) je znatno znižala privzem histamina v astrocite. Predvidevam, da je amodiakvin zasedel del od večine razpoložljivih transportnih proteinov, ki sodelujejo pri membranskem prenosu histamina v astrocite. Nižje koncentracije amodiakvina pa niso imele takega učinka na privzem histamina v astrocite. Rezultati kažejo na možnost, da amodiakvin in histamin tekmujeta za isti transportni sistem.

Dodatek proteinov v medij je še dodatno znižal privzem histamina v astrocite, kar kaže na možnost, da se je del histamina vezal na albumine v FBS in se ni mogel privzeti v astrocite oz. je vezava histamina na albumine iz FBS omogočila, da so molekule amodiakvina lažje vstopale v naš modelni sistem. Histamin se lahko v prisotnosti seruma razgradi v metabolit indol-acetaldehid, ki pa se ne prenaša s prenašalci v notranjost astrocitov.

Ker sočasno dodajanje amodiakvina in metoprina v inkubacijski medij ni bistveno spremenilo količine privzetega histamina v astrocite, sklepam da se metoprin privzema v astrocite prek drugega prenašalca oz. prenašalcev.

Zanimivo je, da se je metoprin obnašal drugače kot amodiakvin. Nižje koncentracije metoprina so celo povečale privzem histamina v astrocite, zelo visoke ($\geq 100 \mu\text{M}$) pa so ga zmanjšale. Iz tega lahko sklepamo, da metoprin ne uporablja istega transportnega sistema kot histamin ali pa uporablja nizkoafinitetni transportni sistem, kjer so potrebne bistveno večje zunajcelične koncentracije substrata za aktivacijo le-tega. Če pa v medij poleg metoprina dodamo še FBS, ni razlike s kontrolno skupino. Zgleda, da se večina metoprina veže na proteine v FBS in ne vpliva na privzem histamina, oz. se prenaša preko drugih prenašalcev.

Za HNMT, encim, ki v osrednjem živčevju razgrajuje histamin, je zanimivo, da je substratno zelo specifičen (razgrajuje le histamin), njegovi inhibitorji pa so zelo različni – tako strukturno kot farmakološko; difenhidramin (antagonist receptorjev H1), takrin (inhibitor acetilholinesteraze, zdravilo za Alzheimerjevo bolezen), metoprin (antagonist folata – citostatik), amodiakvin (antimalarik).

Pri vezavi inhibitorjev na molekulo HNMT pride do največje konformacijske spremembe na aromatskem obroču na koncu N, ki predstavlja eno od sten aktivnega stranskega žepa. Konformacijska sprememba povzroči spremembo položaja aminokislin v stranskem žepu. Tako se lahko spreminja velikost žepa, v katerega se lahko vežejo ali majhne ali bistveno večje molekule (Horton *et al.*, 2005).

Metoprin se specifično veže na HNMT, tako da se z aromatskim obročem globoko zasidra v aktivne žepe encima. Medtem ko je za vezavo amodiakvina na HNMT značilno, da se na eno molekulo encima vežeta kar dve molekuli inhibitorja. Ena molekula amodiakvina zasede aktivni žep, druga pa se veže v globoki žep na zunanji površini. Amodiakvin se veže na HNMT s kompetitivno in nekompetitivno vezavo (Horton *et al.*, 2005). Razlika v strukturi amodiakvina in metoprina, je glavni vzrok za uporabo različnih transportnih sistemov za prehod v znotrajcelični prostor.

Zaključim lahko, da je privzem neonatalnega histamina kompleksen proces. Dobljeni rezultati pa kažejo na to, da se amodiakvin privzema preko istih prenašalcev kot histamin v astrocite ter da proteini v mediju zmanjšajo prenos histamina v astrocite.

5.2 SKLEPI

V prvem delu diplomske naloge sem želela osvetliti povezavo med prisotnostjo proteinov v inkubacijskem mediju in hitrostjo privzema histamina v astrocite. Prišla sem do naslednjih zaključkov:

Prisotnost proteinov v inkubacijskem mediju zmanjša privzem histamina v astrocite. S tem se potrди prva zastavljena delovna hipoteza.

Zmanjšan privzem v astrocite razlagata dve predpostavki: histamin se je vezal na proteine (predvsem albumine) v inkubacijskem mediju ali pa je bil poleg proteinov v dodanem FBS prisoten tudi encim DAO, ki je histamin razgradil v imidazol acetaldehid (to bi potrdili, če bi v inkubacijskem mediju dokazali prisotnost imidazol acetaldehida ali imidazol oetne kisline).

V drugem delu pa sem se osredotočila na vpliv znotrajcelično delujočih zdravil na privzem histamina v astrocite. Zanimala me je morebitna korelacija med metabolizmom in transportom histamina v astrocite. Hkrati pa sem želela z uporabo inhibitorjev HNMT, amodiakvinom in metoprinom, ugotoviti ali morda uporabljata isti transportni sistem za prenos preko membrane kot histamin. Zaključim lahko:

Privzem histamina v astrocite zavirajo nekatera zdravila, ki učinkujejo znotrajcelično.

Od opazovanih zdravil, amodiakvina in metoprina, je le amodiakvin statistično značilno zmanjšal privzem histamina v astrocite.

Predinkubacija astrocitov z višjimi koncentracijami amodiakvina ($\geq 10 \mu\text{M}$) je znatno znižala privzem histamina v astrocite. Nižje koncentracije amodiakvina pa niso imele takega učinka na privzem histamina v astrocite. Rezultati kažejo na možnost, da amodiakvin in histamin tekmujeta za isti transportni sistem. Dodan serum je še dodatno, vendar ne statistično značilno, zmanjšal privzem histamina v astrocite. Del ^3H -histamina se je lahko vezal na albumine ali DAO in se zato ni privzel.

Nižje koncentracije metoprina so celo povečale privzem histamina v astrocite, zelo visoke ($\geq 100 \mu\text{M}$) pa so ga zmanjšale. Sklepam lahko, da metoprin ne uporablja istega transportnega sistema kot histamin ali pa uporablja nizkoafinitetni transportni sistem, ki se aktivira le ob bistveno večjih zunajceličnih koncentracijah substrata. Dodan serum ni statistično značilno vplival na količino privzetega ^3H -histamina. Verjetno se metoprin z bistveno večjo afiniteto kot histamin veže na proteine prisotne v serumu in zaradi tega manj ovira privzem histamina v astrocite.

6. POVZETEK

Telesa živčnih celic in aksone obdajajo celice glije, ki jih v osrednjem živčevju imenujemo nevroglia. Značilnost vseh je, da so to celice bogate z glikogenom in maščobami, razlikujejo pa se po funkciji in obliki. Daleč najštevilčnejše celice glije so astrociti, ki v določenih delih možganov predstavljajo kar 90% vseh celic. Po stimulaciji s signalnimi molekulami sproščajo različne živčne prenašalce, citokine, rastne dejavnike in molekule zunajceličnega matriksa ter tako aktivno posegajo v dogajanje v osrednjem živčevju. Na svoji membrani izražajo številne transporterje, s katerimi sodelujejo pri privzemu nevrotansmitorjev. Tako so astrociti pomemben regulator vzdrževanja homeostaze.

V osrednjem živčevju kot nevrotansmitor deluje tudi histamin, ki se sintetizira v presinaptičnih nevronih iz prekursorja histidina. Iz le-teh se po stimulaciji sprošča ter učinkuje v sinapsi in v neposredni bližini sproščanja. Fiziološka aktivnost histamina v možganih je odvisna od prisotnosti histaminskih receptorjev, na katere se mora vezati, da doseže učinek in tudi od učinkovitosti njegove inaktivacije. Inaktivacija histamina poteka z difuzijo v ekstracelularni prostor, z encimsko razgradnjo ter s privzemom v presinaptične nevrone in astrocite. Encimska razgradnja poteka z dvema znotrajceličnima encimoma, diamino oksidazo (DAO) in histamin N-metil-transferazo (HNMT). V možganih je prisoten le slednji. Histamin, kot pozitivno nabita molekula, ni sposobna hitrega prehoda preko membrane v intracelularni prostor. Zato predvidevamo, da obstaja visoko afinitetni transportni sistem za prenos histamina, ki pa do danes ni znan.

V okviru diplomske naloge sem želela osvetliti vpliv prisotnosti proteinov (FBS) v inkubacijskemu mediju na transport histamina v astrocite ter vpliv inhibitorjev, amodiakvina in metoprina, na privzem histamina v neonatalne astrocite podgan.

Pri poskusih sem kulture astrocitov, pripravljene iz možganske skorje neonatalnih podgan, v treh paralelkah 20 minut inkubirala v različnih koncentracijah inhibitorja (od 10^{-3} M do 10^{-8} M) ali v pufru za privzem, ki sem mu dodala FBS. Nato je sledil dodatek 125 nmol/L ^3H -histamina in 20 minutni privzem v kulture astrocitov.

Iz dobljenih rezultatov sklepam, da dodatek FBS pufri za privzem zniža privzem histamina v neonatalne astrocite podgan. Kar je lahko posledica vezave histamina na proteine prisotne v inkubacijskem mediju ali razgradnje histamina, ki je posledica delovanja DAO (prisotnega v FBS). Uporabljena inhibitorja sta različno vplivala na privzem histamina v astrocite. Nižje koncentracije metoprina so povečale privzem histamina v astrocite, zelo visoke ($\geq 100 \mu\text{M}$) pa so ga zmanjšale. Predinkubacija astrocitov z višjimi koncentracijami amodiakvina ($\geq 10 \mu\text{M}$) je znatno znižala privzem histamina v astrocite. Nižje koncentracije amodiakvina pa niso imele takega učinka na privzem histamina v astrocite. Sklepam, da amodiakvin in histamin tekmujeta za isti transportni sistem. Medtem ko, metoprin ne uporablja istega transportnega sistema kot histamin ali pa uporablja nizkoafinitetni transportni sistem, ki se aktivira le ob bistveno večjih zunajceličnih koncentracijah substrata. Dodatek seruma je dodatno znižal privzem histamina ob prisotnosti amodiakvina, ne pa metoprina.

V osrednjem živčevju ima histamin mnogo že raziskanih in še neznanih funkcij. Z vsako študijo smo bliže odkritja specifičnega transportnega sistema za prenos histamina v celice. Prav to pa bi omogočilo patentiranje potencialnih zdravil za preprečevanje nespečnosti in slabosti ter zdravljenja bolezni kot so Alzheimerjeva ter Parkinsonova bolezen in epilepsija ter depresija.

7. VIRI

7.1 CITIRANI VIRI

1. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. 2007. Rand and Dale's Pharmacology, 6th edition, Elsevier Limited, Philadelphia, 829 str
2. Kržan M, Schwartz JP. 2006. Histamine Transport in Neonatal and Adult Astrocytes. *Inflam Res*, 55: Supplement I: S36-7
3. Štrus J. 2002. Splošna Zoologija, 2. izdaja, Ljubljana, Študentska založba: str 18-19
4. Kržan M. 2001. Funkcija Astrocitov. *Zdrav vest*, 70: 553-9
5. Koepsel H, Lips K, Volk C. 2007. Polyspecific Organic Cation Transporters: Structure, Function, Physiological Roles and Biopharmaceutical Implications. *Pharm Res*, 24: 1227-1251
6. Osredkar D, Burnik-Papler T, Pečavar B, Kralj-Iglič V, Kržan M. 2009. Kinetic and Pharmacological Properties of [³H]-Histamine Transport into Cultured Type 1 Astrocytes from Neonatal Rats. *Inflamm Res*, 58: 94-102
7. Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC. 2001. *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience*. McGraw-Hill Companies, Inc, New York, str 176-211
8. Brown RE, Stevens DR, Haas HL. 2001. The Physiology of Brain Histamine. *Progr Neurobiol*, 63: 637-672
9. Sakurai E, Sakurai E, Orelan L, Nishiyama S, Kato M, Watnabe, Yanai K. 2006. Evidence of the Presence of Histamine Uptake into Synaptosomes of Rat Brain. *Pharmacology*, 78:72-80

10. Yanai K, Tashiro M. 2007. The Physiological and Pathophysiological Roles of Neuronal Histamine: An Insight from Human Positron Emission Tomography Studies, *Pharmacol & Ther*, 113: 1-15
11. Perdan K, Lipnik-Štangelj M, Kržan M. 2009. The Impact of Astrocytes in the Clearance of Neurotransmitters by Uptake and Inactivation. *Advances in Planar Bilayers and Liposomes*, 9: 211-235
12. Blandina P, Efofudebe M, Cenni G, Mannaioni P, Passani MB. 2004. Acetylcholine, Histamine and Cognition: Two Sides of the Same Coin. *Learning & Memory*, 11: 1-8
13. Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. 2000. *Principles of Neural Science*. 4th edition. McGraw-Hill: 280-293; 894-895 str
14. Randall D, Burggren W, French K. 2002. *Eckert Animal Physiology, Mechanisms and Adaptations*. 5th edition. New York, W.H. Freeman and Company: 167, 186-94 str
15. Ogasawara M, Yamauchi K, Satoh Y, Yamaji R, Inui K, Jonker JW, Schinkel A H, Maeyama K. 2006. Recent Advances in Molecular Pharmacology of the Histamine Systems: Organic Cation Transporters as a Histamine Transporter and Histamine Metabolism. *J Pharmacol Sci*, 101: 24-30
16. Haddock RC, Mack P, Fogerty FJ, Lewis-Baenziger N. 1987. Role of Receptors in Metabolic Interaction of Histamine with Human Vascular Endothelial Cells and Skin Fibroblasts. *J Biol Chem*, 262, 21: 10220-10228
17. Bergles DE. Neurotransmitter Transporters. *Encyclopedia of Life Sciences* (19.4.2001) www.els.net (20.2.2009)
18. Perdan K, Kobe Z, Kržan M. Nature of histamine transport in neonatal rat cultured type 1 astrocytes – organic cation transporters are not involved. *Inflamm Res*, 58: 32-33

19. Takemura M, Kitanaka N, Kitanaka J. 2003. Signal transduction by histamine in the cerebellum and its modulation by N-methyltransferase. *The Cerebellum*, 2 : 39-43
20. Perdan-Pirkmajer K, Mavri J, Kržan M. 2010. Histamine (re)uptake by astrocytes: an experimental and computational study. *J Mol Mod* (in print)
21. Huszti Z. 2003. Histamine uptake into non-neuronal brain cells. *Inflamm Res*, 52: 3-6
22. Tahara A, Nishibori M, Ohsuka A, Sawada K, Sakiyama J, Saeki K. 2000. Immunohistochemical Localization of Histamine N-Methyltransferase in Guinea Pig Tissues. *J Histochem Cytochem*, 48: 943-954
23. Horton JR, Sawada K, Nishibori M, Cheng X. 2005. Structural Basis for Inhibition of Histamine N-Methyltransferase by Diverse Drugs. *J Mol Biol*, 353: 334-344
24. Kržan, M. 1995. Razporeditev, značilnosti, pomen in vloga histaminskih H₁ in H₂ receptorjev v srcu. Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo
25. <http://www.cancer.gov/drugdictionary/?CdrID=39206>, 10.10.2009
26. http://www.malaria-ipca.com/artesunate_amodiaquine.html, 10.10.2009
27. Hough LB, Leurs R. Histamine In: Siegel GJ ed. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 2006. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 249-264.
28. Pangršič T. 2006. Elektrofiziološke lastnosti podganjih astrocitov v celični kulturi. Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo
29. <http://www.doctorslounge.com/gastroenterology/labs/albumin.htm>, 26.11.2009

30. Phillips – Howard PA. 1995. CNS adverse events associated with antimalarial agents. Fact or fiction?. *Drug Saf*, 12(6): 370-383
31. Verhratsky A, Kettenmann H. Calcium signalling in glial cells. *Trends Neurosci* 1996; 19: 346 -352
32. Allen NJ, Barres BA. Glia – more than just brain glue. *Nature*. 2009; 457: 675 – 677
33. http://www.mcmanweb.com/blood_brain.html, 22.3.2010
34. Abbott N.J, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature*. 2006; 7: 41 - 53
35. <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Blood+brain+barrier>, 22.3.2010
36. Marolt-Gomišček M, Radšel-Medvešček A. 1992. Infekcijske bolezni. Ljubljana, Tangram, str. 293 – 309
37. Kališnik M, 2007. Slovenski medicinski slovar, 3. izdaja, Ljubljana, Medicinska fakulteta: str 84

7.2 DRUGI VIRI

1. Oishi R, Nishibori M, Saeki K. 1983. Regional distribution of histamine and tele-methylhistamine in the rat, mouse and guinea-pig brain. *Br Res*, 280: 172-175
2. Yokoyama A, Mori S, Takahashi HK, Kanke T, Wake H, Nishibori M. 2006. Effect of amodiaquine, a histamine N-methyltransferase inhibitor, on, *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide-induced hepatitis in mice. *Eur J Pharmacol*, 558: 179-184
3. Huszti Z, Prast H, Tran MH, Fisher H, Philippu A. 1998. Glial cells participate in histamine inactivation in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 357: 49-53
4. Schwartz JP, Wilson DJ. Preparation and characterization of type 1 astrocytes cultured from adult rat cortex, cerebellum and striatum. *Glia* 1992, 5:75-80

ZAHVALA

Že na začetku študija sem vedela, da bo moja diplomska naloga potekala v laboratoriju. Tekom študija se je interes še okrepil in me v času iskanja diplomske teme popeljal v do tedaj neznane kraje, na Medicinsko fakulteto. Če citiram svojo mentorico, sem tako vstopila v magični svet glije. Hkrati pa sem spoznala pomembnost stranskih vlog tako astrocitov v centralnem živčevju, kot ljudi, ki so pomagali pri nastajanju diplomske naloge. Vesela sem, ker mi je bila diplomska naloga v užitek in izziv. Nekoliko nečimrno pa si domišljam, da sem tudi sama položila majhen košček v sestavljanje poznavanja delovanja možganov.

Iskreno se zahvaljujem mentorici gospe prof. dr. Mojci Kržan za spremljanje mojega dela, za strokovne nasvete pri praktičnem delu, napotke pri pisanju diplomske naloge ter za mnenja in popravke.

Zahvaljujem se tehnični sodelavki gospe Jožici Košir za vso pomoč pri laboratorijskem delu, veliko koristnih strokovnih nasvetov ter prijetno preživetih ur v laboratoriju.

Zahvaljujem se mladi raziskovalki asist. Katji Perdan-Pirkmajer, dr.med. za pomoč pri zbiranju literature ter prijateljski odnos.

Hvala predsedniku komisije za zagovor gospodu prof. dr. Tomu Turku in recenzentu gospodu prof. dr. Petru Mačku za strokovno oceno diplomskega dela.

Prisrčna hvala staršema za zgled ter moralno in finančno podporo tekom celotnega študija.