

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Zala KOBE

**VPLIV ANTIDEPRESIVNIH ZDRAVIL NA PRIVZEM HISTAMINA
V ASTROCITE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF ANTIDEPRESSANT DRUGS ON THE UPTAKE
OF HISTAMINE INTO ASTROCYTES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek programa študija biologije, morfološko-fiziološkega 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 22.5.2007 za mentorico imenovala prof.dr. Mojco Kržan.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Kristina SEPČIČ, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za biologijo

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

Član (recenzent): doc. dr. Peter STUŠEK, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za biologijo

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.

Datum zagovora: 4. 9. 2008

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Zala KOBE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK 612.014:615.214(043.2)=163.6
KG neurotransmitter histamin/ astrociti/ antidepresivna zdravila
KK
AV KOBE Zala
SA KRŽAN Mojca (mentorica)
KZ SI-Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2008
IN VPLIV ANTIDEPRESIVNIH ZDRAVIL NA PRIVZEM HISTAMINA V ASTROCITE
TD diplomska naloga (univerzitetni študij)
OP
IJ sl
JI sl / en
AI Astrociti so v odraslih možganih odgovorni za vzdrževanje homeostaze. Na svoji membrani izražajo številne transporterje, s katerimi sodelujejo pri privzemu neurotransmiterjev. Histamin igra v odraslih možganih vlogo neurotransmiterja. Specifičen transporter zanj do sedaj še ni bil identificiran. Astrociti imajo v razvijajočih se možganih vlogo usmerjanja rasti in spodbujanja k tvorbi sinaps. Histamin se privzema tako v astrocite neonatalnih kot odraslih podgan, vendar se kinetika privzema razlikuje. V okviru diplomske naloge sem proučevala lastnosti privzema ³H-histamina v astrocite s pomočjo farmakoloških metod (inhibicija privzema ³H histamina z antidepresivnimi zdravili (AD) skupin: selektivni inhibitorji privzema serotonina SSRI [fluoksetin, fluvoksamin, citalopram], neselektivno delujoči antidepresivi NSRI [amitriptilin in klomipramin], selektivni inhibitorji privzema noradrenalina SNRI [dezipramin, maprotilin in nortriptilin]). Pri poskusih sem kulture astrocitov, pripravljene iz možgan neonatalnih in odraslih podgan, v treh paralelkah 20 minut inkubirala v različnih koncentracijah AD od 1 nM do 10 μM. Nato je sledil dodatek 125nmol/L ³H-histamina in 20 minutni privzem v kulture astrocitov. AD ne vplivajo enako na privzem ³H-histamin v astrocite odraslih in neonatalnih podgan. Na privzem ³H-histamina v kulture astrocitov neonatalnih podgan sta statistično značilno zmanjšali privzem AD zdravili dezipramin iz skupine SNRI in amitriptilin iz skupine NSRI. Privzem ³H-histamina v astrocite odraslih podgan je statistično značilno zmanjšalo AD zdravilo klomipramin. Ker vsa AD zdravila iz posamezne skupine ne vplivajo na privzem ugotavljam, da se histamin privzema v astrocite preko posebnega transporterja in ne preko noradrenalinskega (NET) ali serotoninskega (SERT). Rezultati jasno kažejo razliko med delovanjem astrocitov v otroškem in odraslem obdobju ter podpirajo klinične ugotovitve, da imajo antidepresivna zdravila drugačne klinične učinke pri otroški kot pri odrasli populaciji. Zaključujem, da je privzem histamina v neonatalnih možganih manj specifičen proces kot v odraslih. Zaradi mnogoterih in delno še neznanih funkcij histamina v možganih, bi s sintezo stimulatorjev in inhibitorjev njegovega privzema dobili nove možnosti za raziskovalno delo ter potencialna zdravila za zdravljenje nespečnosti, slabosti in nootropična zdravila.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 612.014:615.214(043.2)=163.6
CX Neurotransmitter histamine/ astrocytes/ antidepressant drugs
CC
AU KOBE Zala
AA KRŽAN Mojca
PP SI-Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2008
TI THE EFFECT OF ANTIDEPRESSANT DRUGS ON THE UPTAKE OF HISTAMINE INTO ASTROCYTES
DT Graduation Thesis (University Studies)
NO
LA sl
AL sl / en
AB Astrocytes in the adult human brain are responsible for maintaining a balanced extracellular environment. Astrocytes express many different transporters on their membrane. These transporters function as also as a clearance device for neurotransmitters in the extracellular space. Histamine is a neurotransmitter in the adult brain. A specific transporter for histamine has not yet been identified. In the developing stage the astrocytes primary role is to guide neurons to their targets and thus helping to form synapses. Histamine is taken up by the astrocytes in neonatal and adult brain, but the kinetics of the uptake differs. In my graduation thesis, I explored the properties of the uptake of ³H-histamine in astrocyte cultures from neonatal and adult rats by pharmacologic methods: the inhibition of the uptake of histamine into astrocytes by antidepressant drugs (AD) from the selective serotonin reuptake inhibitors -SSRI group [fluoxetine, fluvoxamine, citalopram], group nonselective noradrenalin and serotonin reuptake inhibitors NSRI [amitriptyline, clomipramine] and group selective noradrenalin reuptake inhibitors-SNRI [desipramine, nortriptyline, maprotiline]. Astrocyte culture was incubated for 20 minutes in a solution of different concentrations of AD from 1 nM to 10 μM. After that I added 125nmol/L of ³H-histamine and incubated for another 20 minutes. The uptake of ³H-histamine in neonatal rats was significantly inhibited by desipramine from the SRNI and amitriptyline from the group NSRI. The uptake of ³H-histamine in neonatal rats was significantly inhibited by clomipramine from the group NSRI. Taking into consideration that not all the AD from a specific group affect the uptake of ³H-histamine, the uptake does not occur either by serotonin (SERT) or by noradrenaline (NET) transporters, but by a specific entity. The results clearly show the different characteristics of astrocytes from neonatal and adult animal and therefore support the clinical findings that AD have different affect on children and adults. I can conclude that histamine uptake in the neonatal brain is a less specific process. Because of the many different and to some degree also unknown roles histamine plays in the brain, the synthesis of stimulators and inhibitors of the histamine uptake would bring new possibilities of research and potential drugs for insomnia, nausea and cognition enhancers (nootropic drugs).

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	XI
Okrajšave in simboli	XII
Slovarček	XIV
1 UVOD.....	1
1.1 UVODNA BESEDA.....	1
1.2 NAMEN DELA.....	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 NEVROTRANSMITERJI	3
2.1.1 Sinteza in skladiščenje.....	5
2.1.2 Sproščanje neurotransmiterjev.....	5
2.1.3 Mehanizem delovanja neurotransmiterjev.....	5
2.1.4 Inaktivacija neurotransmiterjev.....	6
2.1.5 Mehanizmi prehoda molekul čez biološko membrano.....	7
2.1.5.1 Transportne molekule.....	9
2.1.5.2 Prenos neurotransmiterjev.....	10
2.2 HISTAMIN.....	12
2.2.1 Sinteza histamina.....	12
2.2.2 Histamin v centralnem živčevju.....	13

2.2.3	Histamin kot neurotransmiter.....	14
2.2.4	Histaminski receptorji in učinki ob njihovi aktivaciji.....	15
2.2.5	Inaktivacija histamina.....	17
2.2.6	Histamin v času.....	17
2.2.7	Kinetika privzema histamina.....	18
2.3	ASTROCITI.....	20
2.3.1	Glija celice.....	20
2.3.2	Astrociti.....	20
2.3.3	Astrociti v odraslem obdobju.....	22
2.3.4	Astrociti v razvojnem obdobju.....	23
2.3.5	Astrociti pri patoloških procesih.....	24
2.4	ANTIDEPRESIVI.....	25
2.4.1	Depresija.....	25
2.4.1.1	Simptomi.....	25
2.4.1.2	Teorije depresije.....	26
2.4.2	Antidepresivna zdravila.....	27
2.4.2.1	Predstavitev antidepresivnih zdravil, uporabljenih v poskusih.....	30
3	MATERIAL IN METODE.....	33
3.1	MATERIALI.....	33
3.2	METODE.....	33
3.2.1	Živali	33
3.2.2	Priprava primarnih celičnih kultur.....	33

3.2.3	Privzem histamina.....	34
3.2.4	Določanje koncentracije proteinov.....	35
3.2.5	Analiza podatkov.....	35
4	REZULTATI.....	36
4.1	VPLIV NESELEKTIVNIH ZAVIRALCEV PRIVZEMA.....	36
4.2	VPLIV SELEKTIVNIH INHIBITORJEV PONOVNEGA PRIVZEMA NORADRENALINA.....	38
4.3	VPLIV SELEKTIVNIH INHIBITORJEV PRIVZEMA SEROTONINA.....	40
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	42
5.1	RAZPRAVA.....	42
5.2	SKLEPI.....	47
6	POVZETEK.....	48
7	VIRI.....	50

ZAHVALA
PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Tabela 1: Stimulatorne in inhibitorne funkcije živčnega prenašalca histamina.....	16
Tabela 2: Po razredih razdeljena antidepresivna zdravila, ki sem jih uporabila za poskuse.....	30

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Shematski prikaz strukturne formule acetilholina.....	4
Slika 2: Shematski prikaz strukturnih formul nekaterih monoaminskih predstavnikov nevrottransmitterjev.....	4
Slika 3: Shematski prikaz strukturnih formul nekaterih aminokislinskih nevrottransmitterjev.....	4
Slika 4: Shematski prikaz dogajanj v sinapsi.....	6
Slika 5: Shematski prikaz transmembranskega transportnega proteina za kateholamine.....	9
Slika 6: Mesta, kjer se nahajajo transporterji na nevronih in astrocitov.....	11
Slika 7: Shematski prikaz molekule histamina	12
Slika 8: Shematski prikaz sinteze histamina s pomočjo encima L-histidin dekarboksilaze.....	13
Slika 9: Shema histaminergičnega sistema.....	14
Slika 10: Privzem naraščajočih koncentracij ³ H-histamina v primarne kulture astrocitov pripravljenih iz 3 dni starih podgan.....	18
Slika 11: Privzem naraščajočih koncentracij ³ H-histamina v primarne kulture astrocitov pripravljenih iz odraslih podgan.....	19
Slika 12: Astrocit.....	21
Slika 13: Kemijska struktura uporabljenih selektivnih inhibitorjev ponovnega privzema noradrenalina (SNRI).....	30
Slika 14: Kemijska struktura uporabljenih neselektivnih inhibitorjev ponovnega privzema noradrenalina in serotonina(NSRI).....	31
Slika 15: Kemijska struktura uporabljenih selektivnih inhibitorjev ponovnega privzema serotonina (SSRI).....	32
Slika 16: Vpliv antidepresivnih zdravil (amitriptilin in klomipramin) na privzem ³ H- histamina v primarne kulture astrocitov neonatalnih podgan (A) in odraslih podgan (B).....	37
Slika 17: Vpliv antidepresivnih zdravil (dezipramin, maprotilin in nortriptilin) na privzem ³ H- histamina v primarne kulture astrocitov neonatalnih podgan (A) in odraslih podgan (B).....	39

Slika 18: Vpliv antidepresivnih zdravil (citalopram, fluvoksamin in fluoksetin) na privzem ^3H - histamina v primarne kulture astrocitov neonatalnih podgan (A) in odraslih podgan (B).....41

KAZALO PRILOG

Priloga 1: Rokopis prispevka za revijo Inflammation research.....	str. 56
--	------------

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACh – acetil holin

ACTH – (adenocorticotropic hormone) adenokortikotropni hormon

AD – antidepresivno zdravilo

ATP – adenzin trifosfat

BDNF- (brain-derived neurotrophic factor) nevrotrofični dejavnik možganskega izvora

cAMP – ciklični adenzin monofosfat

CNTF- (ciliary neurotrophic factor) ciliarni nevrotrofični dejavnik

CRF – (corticotrophin releasing factor) kortikotropin sproščujoči faktor

CŽS – centralni živčni sistem

DAG – diacil glicerol

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

GABA - γ -aminomaslena kislina

GDNF- (glial-derived neurotrophic factor) nevrotrofični dejavnik glialnega izvora

GFAP - glialna fibrilarna kislina beljakovina

HDC – histidin-dekarboksilaza

HNMT - histamin *N*-tele-metiltransferaza

HVACC - (high-voltage activated calcium channels) napetostno odvisni kalcijevi kanali

IP3 – inozitol trifosfat

MAO B - monoamin-oksidadza B

MAOI – inhibitorji monoaminoksidaze

NET – noradrenalinski transportni proteini

NGF- (nerve growth factor) živčni rastni dejavnik

OCT – (organic cation transporter) transmembranski prenašalec organskih kationov

PIP2 – fosfatidil inozitoltrifosfat

PKC - protein-kinaza C

REM faza – (rapid eye movement) faza spanja, za katero je značilno hitro premikanje oči

sAHP – (slow after hyperpolarisation) počasna hiperpolarizacija

SERT – serotoninški transportni proteini

SLC1 - (solute carrier 1) transmembranski prenašalci družine 1

SLC6 - (solute carrier 6) transmembranski prenašalci družine 6

SLC22 – (solute carrier 22) transmembranski prenašalci družine 22

SNRI – inhibitorji ponovnega privzema serotonina in noradrenalina

SSRI – selektivni inhibitorji ponovnega privzema serotonina

TCA – triciklični antidepresivi

VMAT2 - vezikularni transporter monoaminov 2

SLOVARČEK

Astrocit – zvezdasta glijalna celica (Kališnik M, 2007)

Biološka uporabnost – koncentracija zdravila, ki doseže krvni obtok

Farmakokinetika – področje farmakologije, ki proučuje vpliv telesa na zdravilo - absorpcijo, porazdelitev, razgradnjo zdravila v telesu in izločanje iz njega (Kališnik M, 2007).

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

IC₅₀ - (inhibition concentration) koncentracija inhibitorja, ki izpodrine 50% vezanega ali privzetega radioliganda.

Nevrotransmitter – živčni prenašalec v osrednjem živčnem sistemu. Nevrosekret, ki se v sinapsi sprošča iz vzburjene živčne celice in prenaša informacijo na naslednjo celico (Tavzes M, 2002).

pH - desetiški logaritem molarne koncentracije vodikovih ionov.

pKa - disociacijska konstanta kislin - potencia ionizacijske konstante kisline.

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

Živčni rastni dejavnik – polipeptid, ki nastaja v živčnih celicah in astrocitih ter regulira rast, diferenciacijo in preživetje živčnih celic.

1 UVOD

1.1 UVODNA BESEDA

V uvodu bi rada opozorila na širino teme, ki jo bom obravnavala. Širina sama pa ima dve plati. Po eni strani daje nalogi privlačnost zaradi vseh možnosti, ki se odpirajo in s katerimi se spogleduje, hkrati pa se je bilo zato pri pisanju težje usmeriti in zamejiti. Prav zato pa si pridržujem pravico do malce pesniških uvodnih besed.

V moji nalogi nastopajo trije glavni junaki: histamin, astrociti in antidepresivna zdravila. Vsi pa igrajo na odru z imenom čas. Ta oder pa igralce ne prepušča lastni improvizaciji. Vse kaže, da se njihove vloge v času spreminjajo. Tako vloga astrocitov kot histamina. Posledično pa tudi antidepresivna zdravila ne morejo učinkovati enako.

Naloga primerja delovanje antidepresivnih zdravil na privzem histamina v astrocite odraslih in neonatalnih podgan. Rezultati kažejo razlike v tem delovanju. Interpretacija rezultatov pa je, tako kot junaki sami, podvržena vplivu časa in se mu bo morala prilagajati.

Dejstvo je, da smo glede odkrivanja delovanja možganov šele na začetku in tako vsako novo dognanje predstavlja le majhen košček sestavljanke. Ko takemu koščku iščemo mesto v sestavljanke, se poigravamo z mislijo, kakšna bo celotna slika. Včasih so predstave o celotni sliki drugačne kot se kasneje izkaže. Ne glede na to, če smo košček sprva postavili na napačno mesto, košček še vedno pripada tej sestavljanke in le vprašanje časa je, kdaj bo njegovo pravo mesto najdeno.

1.2 NAMEN DELA

Iz znanstvene literature je znano, da se histamin privzema v astrocite podgan tako v neonatalni in odrasli življenjski dobi. Privzem histamina v astrocite je odvisen od časa inkubacije, od koncentracije histamina ter od koncentracije zunajceličnih natrijevih ionov. Namen mojega diplomskega dela je proučevanje lastnosti privzema ^3H -histamina v astrocite s pomočjo farmakoloških metod (inhibicija privzema ^3H -histamina z različnimi antidepresivnimi zdravili) ter ugotoviti, če obstoječa antidepresivna zdravila vplivajo na privzem histamina v astrocite. Ker se kinetične lastnosti privzema histamina astrocitov neonatalnih in odraslih podgan razlikujejo, je bil namen dela tudi preveriti, če obstajajo razlike tudi v inhibicijskih študijah.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Preverili bomo naslednje delovne hipoteze:

- obstajale bodo razlike pri vplivu antidepresivnih zdravil na privzem ^3H -histamina v kulture astrocitov pripravljenih iz neonatalnih in odraslih podgan;
- selektivna antidepresivna zdravila, kot so SSRI (fluoksetin, fluvoksamin in citalopram) ne bodo bistveno vplivala na privzem ^3H -histamina v astrocite;
- pričakujemo, da bo amitriptilin najbolj inhibiral privzem ^3H -histamina v astrocite, ker ima najmanj selektivno delovanje.

2 PREGLED OBJAV

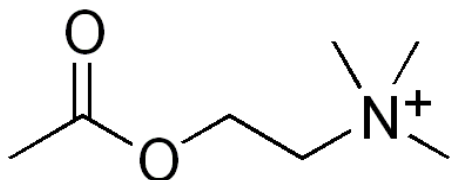
2.1 NEVROTRANSMITERJI

Nevrotransmitterji – prenašalci v živčnem sistemu so snovi, ki jih izločajo živčne celice in s tem druga na drugo prenašajo informacije. Te snovi v dovolj veliki koncentraciji prek vezave na ustrezni membranski receptor povzročijo nastanek akcijskega potenciala na sosednji celici. Nevrotransmitterje glede na velikost molekule delimo v dve skupini. Živčni prenašalci z nizko molekulsko maso so: acetilholin, monoamini (serotonin, dopamin, noradrenalin, histamin, itd.) in aminokisljine (glutamat, GABA, glicin, itd.). Tisti z večjo molekulsko maso pa so nevroaktivni peptidi (enkefalin, dinorfin, itd.).

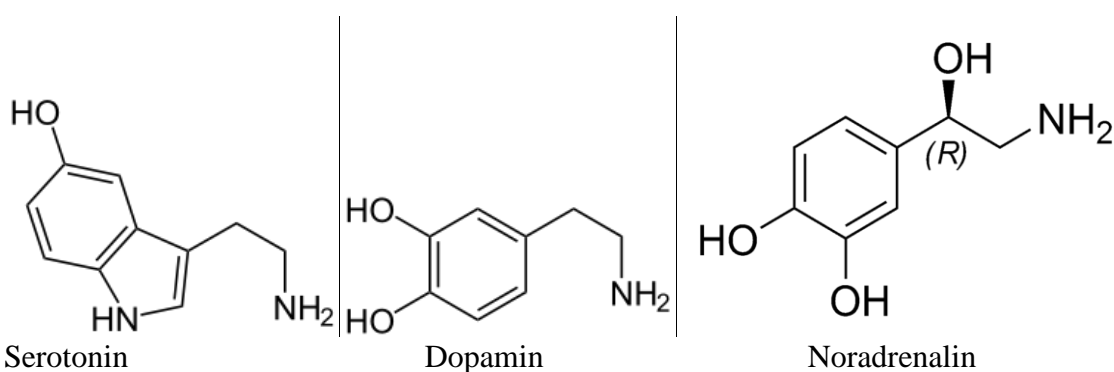
Skupine nevronov, ki izločajo acetilholin in biogene amine, se lahko imenujejo ali po nevrotransmitterju, ki ga izločajo, ali pa po mestu nahajanja v osrednjem živčevju. Vsak sistem omenjenih nevronov ima jedra, iz katerih izhajajo aksoni (projekcije) v točno določene predele možganov. Tako ločimo serotoninški, dopaminski, holinerški, adrenerški, in tudi histaminergski sistem. Slednjemu se bom podrobneje posvetila kasneje. Vsak tak sistem torej lahko povežemo z določenim nevrotransmitterjem in s specifičnimi funkcijami.

Da bi neko snov lahko poimenovali nevrotransmitter, mora ta zadostiti določenim kriterijem: 1. živčni prenašalci ne prehajajo krvno-možganske pregrade; 2. snov se sintetizira v nevronu, prisotna je v presinaptičnem končiču v tako imenovanih sinaptičnih veziklih; 3. po aktivaciji presinaptičnega nevrona se z eksocitozo sprosti v sinaptično špranjo; 4. količina sproščenega prenašalca je zadostna, da sproži ekscitacijo postsinaptičnega nevrona oz. druge celice. 5. če tarčno celico izpostavimo prenašalcu ali njegovemu agonistu v dovolj velikih količinah, izzovemo enak odgovor, kakor bi ga endogeno sproščena snov. Ker bi pretirana stimulacija s prenašalcem lahko škodila, oz. ker je komunikacija med živčnimi celicami časovno in krajevno omejen in strogo reguliran

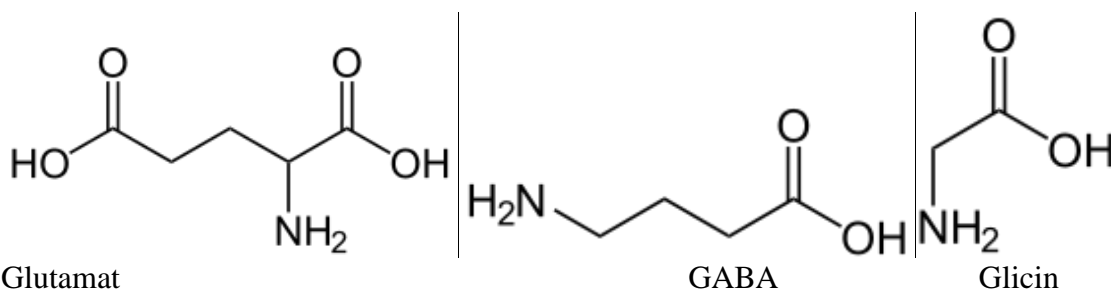
proces: 6. mora za to snov obstajati specifičen mehanizem odstranjanja iz sinaptične špranje (Kandel 2000).



Slika 1 : Shematski prikaz strukturne formule acetilholina (povzeto po Nestler et al, 2003: 201)



Slika 2 : Shematski prikaz strukturnih formul nekaterih monoaminskih predstavnikov nevrottransmiterjev (povzeto po Nestler et al, 2003: 169, 193)



Slika 3 : Shematski prikaz strukturnih formul nekaterih aminokislinskih nevrottransmiterjev (povzeta po Cooper et al, 1996: 151)

2.1.1 Sinteza in skladičenje

Živčne celice s specifičnimi encimi sintetizirajo neurotransmiterje iz predhodnih spojin, ki jih dobimo s hrano. Prehodniki živčnih prenašalcev namreč lahko prestopijo krvno-možgansko pregrado. Predhodniki monoaminskih prenašalcev so aminokisliline. V primeru glutamata in GABA pa α -ketoglutarat, ki nastaja med Krebsovim ciklom. Sinteza živčnih prenašalcev z nizko molekulsko maso in tistih z višjo je različna.

Nevrotransmiterji z nizko molekulsko maso se večinoma sintetizirajo v citoplazmi sinaptičnih končičev in se od tam prečrpajo v sekretorne vezikle. Tisti z večjo molekulsko maso se sintetizirajo v telesu nevrona, prenesejo v sekretorne vezikle velike gostote in ob potovanju proti aksonu doživijo še post translacijske spremembe.

Za prečrpanje izdelanih neurotransmiterjev v te sekretorne vezikle, kjer so varni pred razgradnjo encimov in lastnim nenadzorovanim delovanjem, je potrebna pomoč vezikularnega prenašalca.

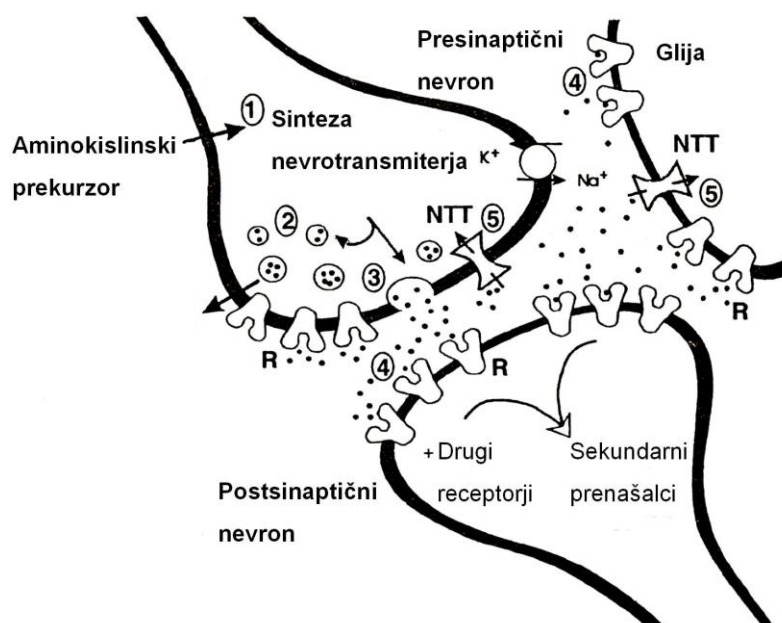
2.1.2 Sproščanje neurotransmiterjev

Vse celice, tudi nevroni, ohranjajo negativno notranje okolje glede na pozitivno zunajcelično okolje. Ob prejemu informacije, se nevron vzburi. Vzburjenje pa se kaže kot izguba negativnega naboja notranjega okolja, oziroma kot sprememba membranskega potenciala. Celična membrana se depolarizira. Do tega pride, ker se polarizirano ionsko ravnotežje, ki ga celica (nevron) aktivno vzdržuje, podre. Če sprememba membranskega potenciala preseže določen prag, se sproži t.i akcijski potencial. Akcijski potencial je hitronapredujoča depolarizacija vzdolž aksonske membrane. Ko akcijski potencial pripotuje do sinaptičnega končiča, tam povzroči odprtje od napetosti odvisnih Ca^{2+} kanalčkov. Tok Ca^{2+} v celico povzroči zlivanje sinaptičnih veziklov s presinaptično membrano in vstop neurotransmiterjev v sinaptično špranjo.

2.1.3 Mehanizem delovanja neurotransmiterjev

Ob zlitju sinaptičnega mehurčka s presinaptično membrano, se neurotransmiterji sprostijo v sinaptično špranjo. Ko z difuzijo dosežejo postsinaptično membrano, se tam vežejo na membranske receptorje. Z vezavo na receptor ta spremeni svojo konfiguracijo, tako da lahko skozenj v celično notranjost vdrejo ioni. Drugi način delovanja receptorjev, na katere

so se vezali neurotransmiterji, pa je preko sekundarnih sporočevalcev na notranji strani celične membrane. Ob vezavi živčnega prenašalca se podenota kanalčka na notranji strani membrane odcepi in aktivira sekundarnega sporočevalca- encim, ki katalizira reakcijo, katere produkti odprejo ionske kanalčke in posledica je enaka kot pri prejšnjem primeru. Ob vdoru ionov v celico se spremeni njen naboj, ki za kratek čas skoči iz negativnega v pozitivno območje (Alberts et al 2002, Randall et al 2002). Shematski prikaz dogodkov v sinapsi prikazuje slika:



Slika 4: Shematski prikaz dogajanj v sinapsi. (1,2) Neurotransmiter se sintetizira in nato uskladišči v presinaptične vezikle s pomočjo vezikularnih transporterjev. (3) Sprostitev neurotransmiterja v sinaptično špranjo. (4) Interakcija neurotransmiterja s presinaptičnimi, postsinaptičnimi receptorji in receptorji celic glije. (5) Sproščeni neurotransmiterji se prenese nazaj v presinaptični nevron in okoliško glijo s pomočjo membransko vezanih proteinov. NTT - transporter za neurotransmiter; R - receptor (povzeto po Papler in Pečavar, 2006: 4)

2.1.4 Inaktivacija neurotransmiterjev

Ko neurotransmiter opravi svojo nalogo prenosa vzbujenja na postsinaptično celico, se mora čim prej inaktivirati, da ne bi prišlo do prekomernega vzbujenja. Celica namreč ne more vzdrževati svojih funkcij, če je njeno notranje okolje ves čas moteno. Stalno delovanje neurotransmiterjev povzroči prekomerno vzdraženost živčnih celic, kar vodi do

poškodb in celo do celične smrti. Temu pojavu pravimo ekscitotoksičnost, ki je posledica delovanja živčnih bojnih strupov, kot tudi posledica možganske kapi.

Inaktivacija neurotransmiterjev poteka na več možnih načinov:

Živčni prenašalec se **z difuzijo** širi v medcelični medij. Njegova koncentracija na mestu, kjer lahko stimulira receptorje, se zmanjša. Če njegova koncentracija v sinaptični špranji pade pod določeno vrednost, vzburjenje na postsinaptični membrani ne bo dovolj veliko, da bi prišlo do učinka tarčne celice. Vzburjenje zamre.

Neurotransmiterje lahko **razgradi encim** v neaktivne metabolite, ki se ne morejo več vezati na receptorje. Encimi so prisotni v sinaptični špranji, na celičnih membranah in znotraj celic. Primer: encim, ki se nahaja v zunajceličnem prostoru, je acetilholin-esteraza, ki inaktivira acetilholin, encima monoamin oksidaza (MAO) in katehol -O-metil-transferaza (KOMT), ki inaktivirata monoaminske transitorje (dopamin, histamin, serotonin, noradrenalin), pa se nahajata v znotrajceličnem prostoru.

S posebnimi transportnimi proteini na membrani nevrona se lahko neurotransmiter **ponovno privzame** v celico – nevron, iz katerega se je prvotno sprostil. Tam se lahko ponovno uskladišči v sekretorne vezikle in uporabi pri naslednjem prenosu vzburjenja (recycling) ali pa ga razgradijo encimi.

Na način privzemanja deluje tudi inaktivacija neurotransmiterjev s pomočjo **celic glije**. Te s specifičnimi prenašalnimi proteini na svoji membrani prenesejo neurotransmiter čeznjo. V notranjosti ga lahko razgradijo in v neaktivni obliki 'vrnejo' nevronu, kot kaže primer glutamata. Ta se po privzemu v glija celice pretvori v glutamin, ki ne deluje kot živčni prenašalec. Glutamin se vrne v nevrone, kjer se porabi za ponovno izdelavo glutamata (Nestler, 2003).

2.1.5 Mehanizmi prehoda molekul čez biološko membrano

1. Pasivna difuzija
2. Olajšana difuzija
3. Transport s pomočjo prenašalca
4. Aktivni transport

Celice so z membrano ločeni tekočinski (vodni) prostori, ki s pomočjo membranskih prenašalcev, kanalčkov in membrano samo v svoji notranjosti ustvarjajo zase najbolj primerno elektrokemično in koncentracijsko ravnovesje raztopljenih snovi. Nekatere snovi lažje prosto difundirajo prek celične membrane, druge težje, tretje pa sploh ne. Z ustvarjanjem razlik med svojim notranjim in zunanjim okoljem - z ustvarjanjem koncentracijskih razlik in razlik v naboju, celica izkorišča energijski potencial, ki ga predstavlja naravna nagnjenost molekul po čim večji entropiji in uravnovešeni razporeditvi naboja na obeh straneh membrane. To predstavlja naravno gonilno silo, ki jo celice stalno uporabljajo za prenos izbranih snovi.

Celična notranjost je glede na njeno okolje negativno nabita. Kar pomeni, da bo prenos pozitivno nabitih delcev v celico termodinamsko ugoden. Velja tudi, da večji kot je koncentracijski gradient, večja je možnost pasivne difuzije. V tak prehod molekul čez membrano niso vključeni nobeni membranski prenašalci, odvija se sam, počasi, snovi pa prehajajo membrano le do vzpostavitve ravnovesja.

Olajšana difuzija je način prehoda prek celične membrane s pomočjo membranskih struktur (kanalčkov in prenašalcev). Poteka hitreje kot pasivna difuzija, prenese večji temperaturni razpon in ni specifična za snov. Transport je nasitljiv in se ujema s kinetiko encimov po Michaelis-Mentenovi (Michaelis L in Menten M, 1913). Stopnja transporta v eno ali drugo smer ponavadi ni enaka, ampak deluje bolje v eno smer.

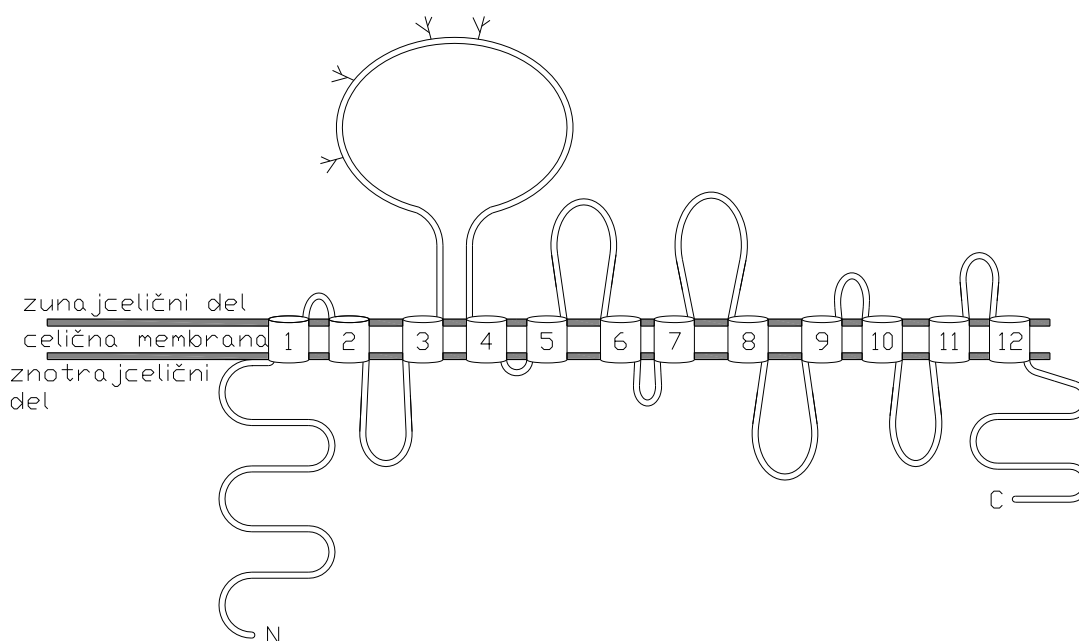
Enako velja za transport s pomočjo prenašalcev, ki so močno selektivni za določene snovi. Prenášalci so transmembranski proteini, ki s svojo zgradbo omogočajo prehod določenih snovi prek membrane (Preusch et al., 2001).

Aktivni transport je posebna oblika transporta s pomočjo prenašalcev, pri katerem energija za prenos molekul izvira direktno iz celičnega metabolizma. S hidrolizo ATP se snovi črpajo v smer večje koncentracije. To je termodinamsko neugodno in zato zahteva porabo energije. Snovi lahko na ta način prehajajo direktno, lahko pa tudi indirektno, kadar gre za kotransport. Pri kotransportu prenos ene molekule v smeri koncentracijskega gradienta omogoča prenos druge v obratni smeri od koncentracijskega gradienta (Štrus 2002).

V splošnem je prenos molekul prek membrane odvisen od različnih faktorjev, med drugim od koncentracije snovi, lipofilnosti oziroma vodotopnosti molekul, pKa in molekulske mase. pKa, je pomemben zato, ker ionizirane oblike molekul težko oz. sploh ne prehajajo membrane s pasivno difuzijo. Zanašati se morajo na druge načine transporta.

2.1.5.1 Transportne molekule

Transportne molekule oziroma transporterji so molekule, ki so zagodene v lipidni dvosloj membrane in s svojo zgradbo omogočajo prehod določenim molekulam, ki drugače membrane ne bi mogle prestopiti. Lahko jih razdelimo v razrede glede na smer transporta (transporterji, ki posredujejo vtok ali iztok snovi in taki, ki posredujejo pri transportu v obe smeri), glede na lokacijo (intracelularni vezikularni transporterji na membrani sekretornih veziklov in transporterji na celični membrani), glede na molekule ki jih prenašajo, glede na njihovo zgradbo in tudi glede na to, kakšen je mehanizem prehoda molekul preko njih.



Slika 5: Shematski prikaz transmembranskega transportnega proteina za kateholamine. Sestavljen je iz 12 transmembranskih domen z značilno zanko med tretjo in četrto. N- in C- terminala sta na notranji strani membrane (prirejeno po Nestler et al, 2003: 178)

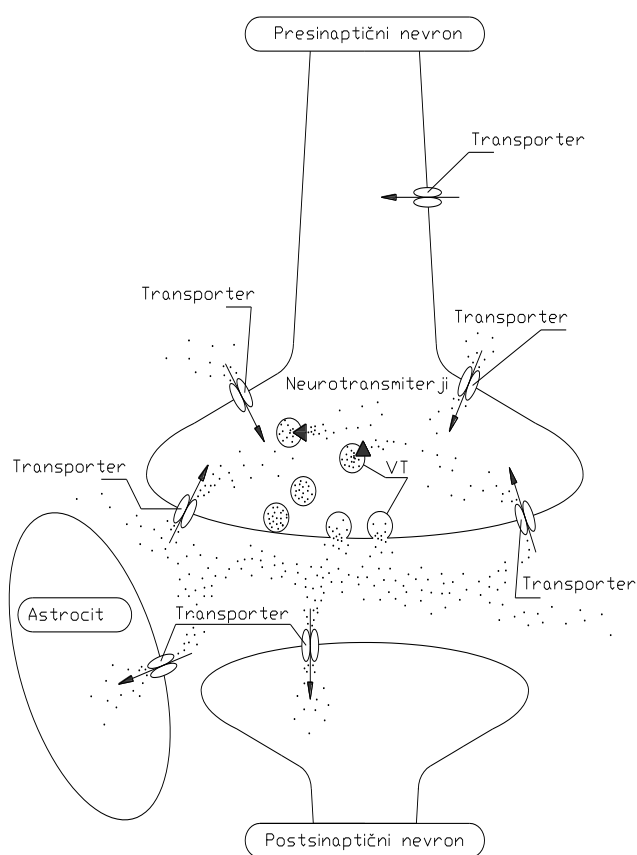
2.1.5.2 Prenos neurotransmiterjev

Živčni prenašalci so molekule, ki prenašajo vzburjenje in s tem informacije, zato je pomembno, da je njihova prisotnost, koncentracija in odsotnost v sinaptični špranji močno nadzorovana. Monoaminski neurotransmiterji, kot so serotonin, dopamin in histamin, imajo v fiziološkem pH pozitivni naboj. Kot je že omenjeno, se prenos takšnih nabitih molekul preko membrane vrši s pomočjo specifičnih skupin transmembranskih prenašalcev na membrani nevronov in glija celic. Ob neustreznem delovanju teh prenašalcev, pride do različnih patoloških stanj.

Plazemski SLC (nagl. solute carrier) transporterji za prenos molekul ne porabljajo ATP, ampak elektrokemijski potencial, ki izvira iz pretoka Na^+ v smeri koncentracijskega gradienta. Na membrani nevronov in glija celic obstajata dva glavna razreda SLC neurotransmiterskih transporterjev: SLC1 je družina transporterjev, ki z visoko afiniteto prenešajo glutamat in SLC6 družina, ki vključuje dopaminski transporter (DAT), serotoninški transporter (SERT), noradrenalinški transporter (NET), glicinski transporter (GLYT) in GABA transporter (GAT). Vsi so prisotni tudi na membranah astrocitov. Njihovo delovanje je odvisno od Na^+ , za delovanje nekaterih predstavnikov družine SLC6 pa je nujna tudi razlika v transmembranski koncentraciji Cl^- ionov. Biogeni amini se preko celične membrane prenašajo tudi s pomočjo družine SLC22 transporterjev, večinoma s prenašalci za organske katione (OCT). Ti so neodvisni od tokov Cl^- in Na^+ . OCT so transportne molekule z nizko afiniteto, toda z visoko kapaciteto prenosa. Predstavljali naj bi prenos monoaminskih molekul ob njihovi povišani koncentraciji oz izhod v sili, če prehod preko drugih membranskih transporterjev zataji. Prenos kateholaminov preko OCT3 predstavlja način inaktivacije, ki so ga včasih imenovali privzem 2. (Perdan K et al, 2008; Gether et al, 2006; Koepsel H., 2004; Koepsel H et al, 2007).

Vezikularni prenašalci transportirajo nastale neurotransmiterje iz citoplazme v sekretorne vezikle, kjer se skladiščijo do izlitja veziklov v sinaptično špranjo. Skupine se imenujejo SLC17, SLC18 in SLC23 (Koepsel H, 2004). V sekretorne vezikle transportirajo monoamine - VMAT, inhibitorne prenašalce GABA in glicin – VGAT in glutamat - VGLUT.

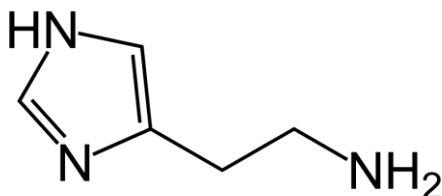
Na splošno membranske transportne molekule prenašajo čez membrano nutriente in endogene molekule, kot so sladkorji, aminokisliline, in vitamini. Vendar pa preko membrane prenašajo tudi snovi, ki niso endogenega porekla (npr. zdravila), a imajo strukturo podobno tistim molekulam, ki pa so endogenega izvora. Posledično igrajo pomembno vlogo pri biološki uporabnosti, farmakokinetiki in terapevtski učinkovitosti zdravil. Velja tudi že prej na primeru OCT predstavljeno dejstvo, da dobijo transportni proteini z nizko afiniteto ob večji koncentraciji molekul pomembnejšo vlogo pri njihovem transportu. Pri večji koncentraciji molekul se tudi selektivnost transporterjev zmanjša.



Slika 6: Mesta, kjer se nahajajo transporterji na nevronih in astrocitih. Večina sproščenega neurotransmiterja se ponovno privzame v presinaptični nevron preko perisinaptičnih transporterjev ter preko transporterjev, ki se nahajajo vzdolž aksonov. Ponovno privzeti neurotransmiter se lahko prek vezikularnega transporterja (VT) privzame v vezikle in se ponovno uporabi pri sinaptičnem prenosu (reciklaža neurotransmiterja). Del sproščenega neurotransmiterja se privzame tudi v postsinaptični nevron in v astrocite (povzeto po Iversen L, 2006: S83)

2.2 HISTAMIN

Histamin je biogeni amin, spada med imidazole z značilnim heterocikličnim obročem z dvema dušikovima atomoma.



Slika 7: Shematski prikaz molekule histamina (povzeto po Nestler et al, 2003: 208)

Prisoten je v skoraj vseh človeških tkivih, v večjih koncentracijah se nahaja v koži, pljučih in gastrointestinalnem traktu (Kandel et al, 1991).

Njegova fiziološka funkcija je zapletena in v tem trenutku še ne do potankosti proučena. Zunaj osrednjega živčevja deluje kot kemični mediator vnetnih in imunskih reakcij, vpliva na izločanje eksokrinih žlez (želodčne kisline), na ožilje (razširjanje žil) in gladke mišice (kontrakcija gladkih mišic v bronhijih, bronhiolih, v spodnjem delu tankega črevesja in maternici).

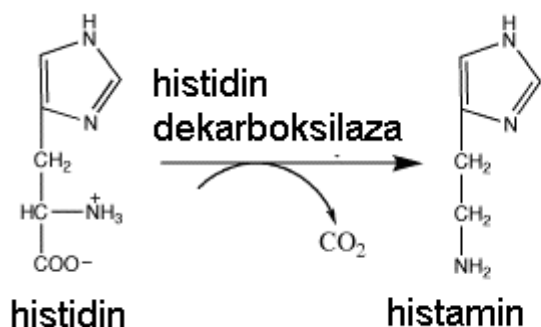
Periferno ima predvsem lokalne učinke, saj deluje kot avtakoid ali lokalni hormon.

V centralnem živčnem sistemu pa deluje tudi kot nevrottransmitter.

2.2.1 Sinteza histamina

Sintetizira se iz esencialne aminokisline L-histidin s pomočjo L-aromatične aminokislinske dekarboksilaze in histidin dekarboksilaze, ki sintetizira histamin v možganih. Na periferiji se histamin sintetizira v Golgijevem aparatu mastocitov in bazofilcev, ki ga nato shranijo v sekretorne granule. Ob vezavi signalnega faktorja na membrano mastocita oz. bazofilca, granule izločijo svojo vsebino (histamin) v medceličnino (Rang et al, 2007).

V centralnem živčnem sistemu se histamin sintetizira v histaminergičnih nevronih. Sinteza je pod nadzorom histaminskega avtoreceptorja H_3 .



Slika 8: Shematski prikaz sinteze histamina s pomočjo encima L-histidin dekarboksilaze (povzeto po Nestler et al, 2003: 208)

2.2.2 Histamin v centralnem živčevju

Histamin je v centralnem živčevju prisoten v manjših količinah kot v nekaterih perifernih tkivih. Prisoten je tako v nevronih kot v mastocitih, ki pa so v možganih redki.

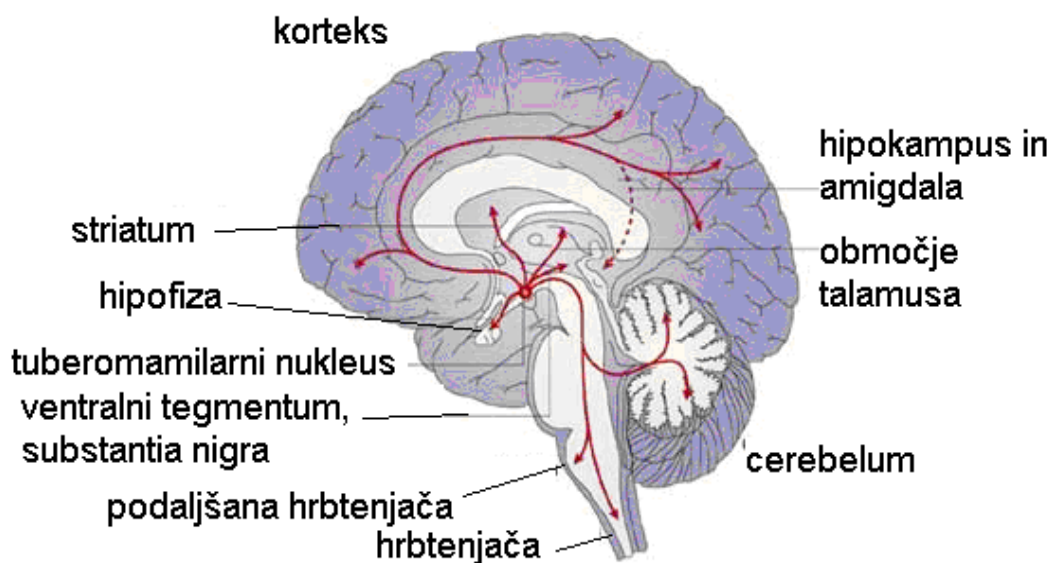
Prisotnost in razporeditev histaminergičnega sistema v možganih so prvič dokazali leta 1984 s protitelesom označeno L-histidin dekarboksilazo (HDC) (Yanai, Tashiro 2007).

Izkazalo se je, da so histaminergični nevroni locirani le v posteriornem hipotalamusu, to je tuberomamilarnem nukleusu, ki oblikuje dno tretjega možganskega ventrikla.

Histaminergičnih nevronov je pri človeku okoli 64.000. Projekcije teh nevronov oživčujejo praktično celotne možgane in del hrbtenjače, po dveh dvigajočih in eni spuščajoči poti.

Dvigajoči poti oživčujeta hipotalamus, Brocovo področje, septum, olfaktorna bulbosa, talamus, hipokampus, amigdalo in rostralni del prednjih možganov. Spuščajoča pot pri podganah teče preko medialnega longitudinalnega fascikulusa in oživčuje možgansko deblo in hrbtenjačo (Brown et al 2001).

Morfološke značilnosti histaminergičnega sistema, s kompaktnimi skupinami celic in široko razvejanostjo, spominjajo na ostale sisteme biogenih aminov, kot sta noradrenalinski in serotoninški. To kaže na delovanje histamina kot regulatorja aktivnosti na nivoju celotnih možganov (Blandina et al 2007).



Slika 9: Shema histaminergičnega sistema z jedri histaminergičnih nevronov v tuberomamilarnem nukleusu in aksonskimi projekcijami v možganskem deblu, hrbtenjači, malih možganih in po celotni možganski skorji (Prirejeno po Nestler et al, 2003: 210)

2.2.3 Histamin kot neurotransmitter

Do spoznanja o neurotransmiterski vlogi histamina je prišlo v petdesetih letih prejšnjega stoletja. Pri uporabi antihistaminikov prve generacije, ki so prehajali krvno možgansko pregrado, so pri bolnikih opazili izrazito sedacijo (Nestler et al, 2001). Od tu izvirajo tudi prva sklepanja o vlogi histamina pri ohranjanju pozornosti/budnosti.

Histaminergični nevroni so namreč spontano aktivni in se v budnem stanju osebkov prožijo s frekvenco približno 3 Hz. Med spanjem se ta frekvenca zniža, proženje pa v REM fazi skoraj popolnoma poneha. Akcijski potenciali teh nevronov so široki, z globokim padcem po hiperpolarizaciji (Brown et al, 2001).

Interakcija histaminergičnih nevronov z oreksinskimi kaže na vlogo histamina pri ohranjanju budnosti. Oreksin je peptidni neurotransmitter, ki vpliva na hranjenje in budnost in čigar pomanjkanje ima ključno vlogo pri narkolepsiji (Blandina et al, 2007).

Histamin se, kot že omenjeno, v nevronih sintetizira s pomočjo L- histidin dekarboksilaze, nato pa se prečrpa v sinaptične vezikle preko vezikularnega monoaminskega prenašalca VMAT2 (Sakurai et al 2006). Vezikli po depolarizacijskem stimulusu sprostijo svojo vsebino v sinaptično špranjo. Od tu pa histamin, kot ostali aminske neurotransmiterji,

priputuje do postsinaptičnega nevrona, kjer se veže na membranski receptor, sklopljen s proteinom G, s sedmimi transmembranskimi enotami. Preko teh receptorjev povzroča svoje učinke.

2.2.4 Histaminski receptorji in učinki ob njihovi aktivaciji

Do sedaj so znani štirje histaminski receptorji, ki so oštevilčeni glede na vrstni red odkritja.

H₁ receptorji so periferno prisotni v gladkem mišičju črevesja in bronhijev, kjer povzročijo krčenje. Vplivajo na vazodilatacijo in povečano prepustnost žilja. V centralnem živčnem sistemu se nahajajo postsinaptično in so pozitivno sklopljeni s fosfolipazo C, ki iz PIP₂ sproži nastanek dveh sekundarnih sporočevalcev DAG in IP₃. DAG potencira aktivnost PKC, medtem ko se IP₃ veže na ustrezajoči receptor na membrani endoplazmatskega retikuluma, kar sproži sprostitvev znotrajceličnih zalog kalcija v citoplazmo. Kalcij posredno aktivira Na/K črpalko, čemur sledi močna depolarizacija posinaptičnega nevrona. H₁ receptorji so glavni "krivci" za sedativni učinek antihistaminikov. V poskusu s transgenimi miškami, brez gena za H₁, se je izkazalo, da se le-te sicer normalno razvijejo, a imajo moten cirkadiani ritem lokomotornih aktivnosti in zmanjšano voljo do raziskovanja novega okolja (Brown et al 2001).

H₂ receptorji so v periferiji odgovorni za stimulacijo izločanja želodčne kisline, povišanje srčnega utripa in povečanje srčnega dela. V CZS se nahajajo na postsinaptičnih nevronih. Sklopljeni so z adenilil ciklazo, ki iz ATP stvori sekundarni sporočevalec cAMP. Že sam cAMP lahko povzroči šibko depolarizacijo z znižanjem aktivacijskega praga za kationski tok, ki je drugače odvisen od hiperpolarizacije. cAMP se veže tudi na regulatorno podenoto PKA, kar povzroči razpad PKA na katalitične podenote. Te lahko fosforilizirajo različne tarčne proteine, med drugim tudi od kalcija odvisne kanale, odgovorne za prevodnost kalija. To vodi v inhibicijo počasne hiperpolarizacije (AHP) in prilagajanja proženja piramidalnih nevronov (Brown et al, 2001).

H₃ receptorji so prisotni le na presinaptičnih nevronih in delujejo kot avtoreceptorji. To pomeni, da vezava histamina na ta receptor nevrona negativno vpliva na produkcijo in

sproščanje histamina tega istega nevrona. Receptor je negativno sklopljen s proteinom Gi/Go. Produkcija sekundarnega sporočevalca cAMP torej upade in s tem tudi njegov vpliv na spremembo membranskega potenciala. Hkrati pa aktivacija teh receptorjev vodi v blokado napetostno odvisnih kalcijevih kanalov (HVACC). Vse to vpliva na zmanjšanje sproščanja neurotransmiterjev iz nevrona. H₃ receptorji so prisotni tudi na nehistaminergičnih nevronih, torej delujejo tudi kot heteroreceptorji in regulirajo sproščanje ter sintezo drugih neurotransmiterjev npr: dopamina, acetilholina, GABA, noradrenalina, serotonina in različnih peptidov. Obstajajo študije, ki kažejo na pomembno vlogo histamina pri pomnjenju in učenju, in sicer z modulacijo izločanja acetilholina (Blandina et al, 2007). Antagoniste histaminskih receptorjev H₃ bi se v bodoče lahko uporabljalo za zdravljenje motenj spanja in kognitivnih motenj.

H₄ receptorje so odkrili in klonirali šele leta 2001. Delovali naj bi podobno kot H₃. Lokalizirani so tako na mastocitih kot tudi v CŽS (Esch et al, 2005).

Tabela 1. Stimulatorne in inhibitorne funkcije živčnega prenašalca histamina (povzeto po Yanai, K in Tashiro M, 2007: 3)

Stimulatorne funkcije v CŽS	
Cikel budnosti-spanja	Ohranjanje budnosti
Gibanje	Povečana lokomotorna aktivnost
Kognicija	Porast sposobnosti pomnjenja in kognicije
Energetika metabolizma	Indukcija hidrolize glikogena v možganih
Nocirepcija	Povečana percepcija bolečine
Inhibitorne funkcije v CŽS	
Hranjenje	Inhibicija vedenja hranjenja
Krči	inhibicija
Stres	Inhibicija stresno inducirane vzburjenosti
Z metamfetaminom izzvana psihoza	Inhibicija induciranih epileptičnih napadov (živalski model)
Živčna plastičnost	Inhibicija supersenzitivnosti, inducirane z denervacijo

2.2.5 Inaktivacija histamina

Inaktivacija histamina v centralnem živčevju poteka po dveh poteh, in sicer z N-metilacijo in oksidativno deaminacijo. Inaktivacijo katalizirajo znotrajcelični encimi histamin *N*-telemetiltransferaza (HNMT), monoamin oksidaza B (MAO B) in aldehyd dehidrogenaza. Histamin se oksidira do imidazol očetne kisline, z metilacijo pa postane N-metilhistamin (Sakurai et al 2006).

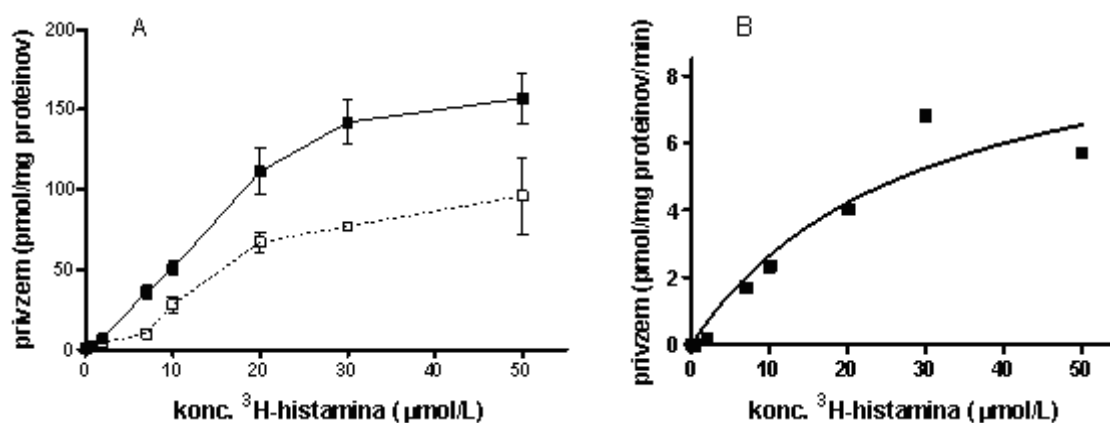
Ker pa so ti encimi intracelularni, je za uspešno deaktivacijo, pretvorbo v neaktivne metabolite, potrebno ta histamin najprej prečrpati iz sinaptične špranje v celico, kjer je inaktivacija mogoča. Histamin se torej privzame v celice, udeležene v sinapsi. To so nevroni in celice glie- astrociti. Histamin se privzema tako v astrocite (Kržan in Schwartz, 2006) kot v nevrone (Sakurai, 2006), čeprav specifičnega transporterja za histamin še niso odkrili. Glede na izsledke Sakurai-a in sodelavcev (2006) transport histamina v nevrone teče v obe smeri in je odvisen od Na^+ , Cl^- in HCO_3^- , medtem ko je transport histamina v astrocite odvisen le od prisotnosti Na^+ (Kržan, 2006). Ker je histamin monoaminski nevrottransmitter, se predvideva, da se njegov transport (vsaj v določeni meri) vrši preko nevrottransmitterskih prenašalcev družine SLC6 in SLC22 (OCT).

2.2.6 Histamin v času

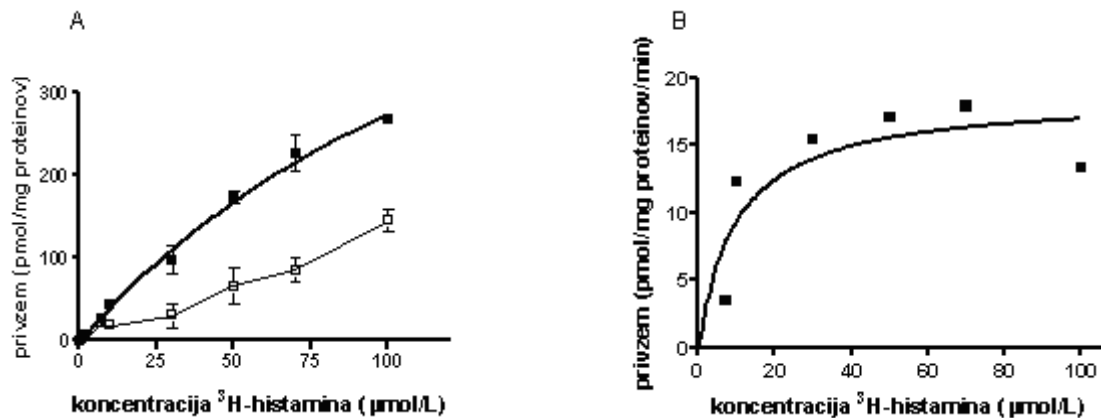
Vloga histamina kot živčnega prenašalca ni več pod vprašajem. Vendar pa se tekom razvoja živčevja obnaša drugače, kot njemu sorodni monoaminski nevrottransmitterji. Razvojni vzorec histamina se razlikuje od vzorcev drugih monoaminskih transmitterjev v tem, da se njihova koncentracija od poznih faz zarodka do odraslega obdobja postopoma povečuje. Koncentracija histamina v centralnem živčevju pa tekom razvoja ne kaže takšne postopnosti. V možganih podganjega fetusa doseže najvišjo vrednost v 17. dnevu brejosti. Do rojstva koncentracija pada in nato okoli petega do desetega dne po rojstvu spet nekoliko naraste. Sledi enakomerno in počasno usihanje koncentracije do odraslega obdobja. Nihanja koncentracije se ujemajo z obdobji najštevilčnejših delitev živčnih celic v času razvoja možganov. Največji sunek rasti živčnih končičev po rojstvu sovpada s skokom koncentracije histamina v CZS. Ta odkritja namigujejo na vpletenost histamina v procese rasti živčnega tkiva (Pearce LA in Schanberg SM, 1969).

2.2.7 Kinetika privzema histamina

Rezultati predhodnih poskusov so dokazali, da je privzem histamina od koncentracije odvisen, nasitljiv proces. Histamin se v neonatalne astrocite privzema s K_m 28,75 μ M in V_{max} 10,3 pmol/mg proteinov /min, privzem v astrocite odraslih podgan: K_m 9,7 μ M in V_{max} 18,6 pmol/mg proteinov/min (Papler T in Pečavar B, 2006)



Slika 10: Privzem naraščajočih koncentracij 3 H-histamina v primarne kulture astrocitov pripravljenih iz 3 dni starih podgan pri 37°C (polni simboli) in 4°C (prazni simboli) (A). Vsaka vrednost na sliki A predstavlja srednjo vrednost treh poskusov opravljenih v triplikatih. B: Odnos hitrosti specifičnega privzema (celokupni privzem [privzem pri 37°C], minus nespecifični privzem [privzem pri 0°C]) v odvisnosti od koncentracije 3 H-histamina. Hitrost privzema je bila za vsako vrednost specifičnega privzema izračuna po formuli Michaelis – Mentenove (Papler T in Pečavar B, 2006: 17).



Slika 11: Privzem naraščajočih koncentracij ^3H -histamina v primarne kulture astrocitov pripravljenih iz odraslih podgan pri 37°C (polni simboli) in 4°C (prazni simboli) (A). Vsaka vrednost na sliki A predstavlja srednjo vrednost dveh preliminarnih poskusov opravljenih v triplikatih. B: Odnos hitrosti specifičnega privzema (celokupni privzem [privzem pri 37°C], minus nespecifični privzem [privzem pri 0°C]) v odvisnosti od koncentracije ^3H -histamina. Hitrost privzema je bila za vsako vrednost specifičnega privzema izračunana po formuli Michaelis – Mentenove (Papler T in Pečavar B, 2006: 16).

2.3 ASTROCITI

2.3.1 Celice glije

Celice v živčevju delimo v dve glavni skupini, nevrone in glija celice. V možganih človeka so glija celice 10 – 50 krat številčnejše od nevronov (Kandel et al 2000). Ime teh celic izvira iz grške besede lepilo in zmotnega prepričanja ob njihovem odkritju, da je njihova funkcija zgolj podpora in 'lepilo' za nevrone. Ob odkritju jih je nemški patolog Rudolf Virchow opisal kot električno pasivno in nevzdražno vezivno tkivo. Danes vemo, da je njihova vloga kompleksna in nikakor ne pasivna (Kržan 2001).

Glija celic je več vrst, ki jih delimo glede na njihove fiziološke in morfološke lastnosti.

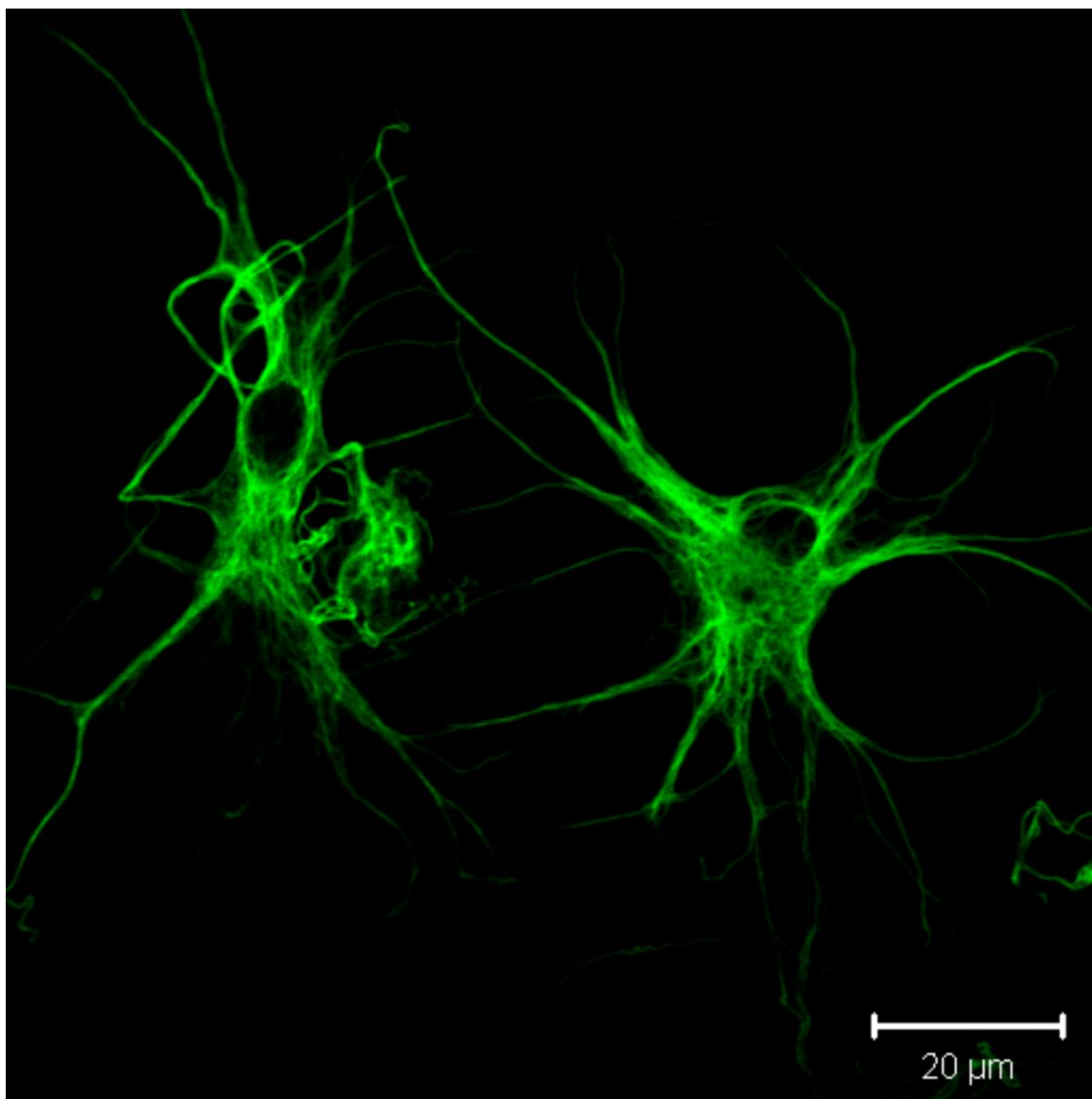
Mikroglija so fagociti, ki se mobilizirajo ob poškodbi, infekciji ali bolezni (Parkinsonova bolezen, Alzheimerjeva bolezen, multipla skleroza). V tej aktivirani fazi delujejo kot pomembna sestavina tako naravnega kot pridobljenega imunskega odziva.

Izvirajo iz makrofagov izven CŽS in so embriološko nesorodni nevronom in ostalim glija celicam.

Makroglija združuje tri glavne skupine celic: oligodendrocite, Schwannove celice in astrocite. Oligodendrocite so manjše glija celice, ki v CŽS tvorijo mielinske ovojnice okoli nevronov. Schwannove celice prav tako tvorijo mielinske ovojnice, vendar v perifernem živčnem sistemu. Najštevilčnejše glija celice pa so astrociti (Kandel et al 2000).

2.3.2 Astrociti

Astrociti zasedajo od 25% do 50% celičnega volumna v možganih in so tako kot nevroni ektodermalnega izvora. Ime izvira iz njihove bolj ali manj nepravilne in spremenljive oblike, ki zaradi daljših izrastkov lahko spominja na zvezdo. Njihovo identiteto in nahajanje lahko določimo s pomočjo imunohistokemijskega barvanja. So namreč edine celice, ki kot del citoskeleta vsebujejo intermediarne filamente iz glijalne fibrilarne kisle beljakovine (GFAP). Astrociti so zaradi visoke koncentracije teh filamentov opora nevronom in tako dajejo možganom strukturo (Nestler et al 2001).



Slika 12: Astrocita vzgojena iz korteksa neonatalnih podgan v primarni kulturi in barvana z GFAP (1:1000). Slika je bila posneta na Referenčnem Carl-Zeiss centru za konfokalno mikroskopijo v Laboratoriju za neuroendokrinologijo in celično fiziologijo, PAFI.

Astrociti tvorijo presledkovne stike, s katerimi vzpostavljajo medcelično komunikacijo, predvsem z uporabo kalcijevih tokov (Kržan 2001). Znano je, da ob proženju nevronov, s katerimi so v stiku, astrociti generirajo kalcijeve tokove, ki se prenesejo na druge astrocite (Nestler et al 2001).

Astrociti ob spremembi okolja lahko spreminjajo svojo obliko in funkcijo in imajo v različnih življenjskih obdobjih različne vloge.

2.3.3 Astrociti v odraslem obdobju

V odraslem obdobju posameznika se oblikujejo različni tipi astrocitov: protoplazmatski v sivi substanci, vlaknasti astrociti v možganski belini in specializirani astrociti (npr. Bergmannova glija v malih možganih, Müllerjeve celice v mrežnici in pituicite v hipofizi).

V tem obdobju imajo astrociti predvsem vlogo ohranjanja zunajceličnega okolja, kar je ključno za preživetje in delovanje nevronov. To dosežejo s privzemom amoniaka in ionov, kot je kalij, ki se sprošča v ta prostor ob proženju nevronov. S privzemom neurotransmiterjev prispevajo k njihovi reciklaži (ponovni uporabi in zmanjšanju potreb sinteze neurotransmiterjev *de novo*) in inaktivaciji, kar je pomembno za zaščito nevronov pred pretirano vzdraženostjo. Neurotransmitter glutamat je povezan s funkcijami učenja in pomnjenja, lahko pa deluje kot nevrotoksin. Prekomerna vzdraženost z glutamatom je lahko vzrok nekaterih neurodegenerativnih bolezni (npr. Huntingova bolezen, Alzheimerjeva bolezen), pojavi se po ishemiji, epileptičnih napadih, hipoksiji ter hipoglikemiji. Ob prekomerni ekscitaciji se koncentracija kalcija znotraj celice tako poveča, da povzroči še večje izločanje glutamata, aktivacijo encimov (proteaz, lipaz), ki nenadzorovano povzročajo škodo na celični membrani, poleg tega nastanejo prosti radikali, ki reagirajo s pomembnimi biomolekulami (DNA, proteini) in jih tako poškodujejo.

Astrociti pa neurotransmiterje tudi sproščajo. S sproščanjem glutamata perisinaptični astrociti modulirajo postsinaptično sproščanje neurotransmiterja na postsinaptičnem nevronu in aktivirajo njegove receptorje. Torej niso le pasivni podporni elementi, ampak enakopravni del tridelne sinapse. Na astrocitih so dokazali transportne proteine za različne neurotransmiterje: aspartat/glutamat, GABA, glicin in biogene amine (Kržan 2001). Še več, gostota transporterjev ekscitatornih neurotransmiterjev je večja na astrocitih kot na samih nevronih (Nestler et al 2001). Čeprav posebni transporter za histamin še ni odkrit, pa ga astrociti dokazano privzemajo in metabolizirajo (Kržan 2001).

Astrocit skupaj z endotelnimi celicami kapilar in periciti gradijo in vzdržujejo krvno možgansko pregrado. Indukcija tesnih medceličnih stikov med endotelijskimi celicami je domena astrocitov. Tesni stiki nefenestriranih kapilar preprečujejo prosto prehajanje snovi iz krvi v možgansko medceličnino. Le močno lipidotopne, nepolarne snovi nizkih

molekulskih mas lahko pasivno preidejo to pregrado, saj morajo prepotovati skozi endotelne celice kapilar. Drug način prestopa te pregrade je s specifičnimi prenašalci, ki pa prehod določenim snovem celo zmanjšujejo z aktivnim prenašanjem snovi nazaj v krvni obtok (Rang, 2007).

Astrociti za nevrone predstavljajo tudi glavno zalogo glikogena. Ta se v perivaskularne astrocite kot glukoza privzema direktno iz možganskih kapilar. Torej so astrociti tisti, ki zalagajo nevrone z glukozo. Glikogen je edina energijska zaloga v CZS (Kržan, 2001).

2.3.4 Astrociti v razvojnem obdobju

V razvojnem obdobju astrociti igrajo drugačno vlogo.

Prvič se diferencirana glija celica v ontogenetskem razvoju človeka pojavi v 6. tednu gestacije. To je radialna glija, ki je embrionalni predhodnik astrocitov (Nestler, 2001). Med 6. in 20. tednom gestacije, se celice radialne gije podaljšajo in tako ustvarjajo pot, po kateri vodijo in usmerjajo rastoče nevrone na njihova ciljna mesta. Tako oblikujejo arhitekturo razvijajočih se možganov. Radialna glija sega od ventriklov preko celotne možganske poloble do pije mater (Kržan, 2001).

Astrociti sintetizirajo in izločajo adhezivne molekule in proteine medceličnega matriksa (živčnocelične adhezijske molekule - NCAM, fibronektin, laminin, taktin, tenascin, janusin). Ti proteini so vključeni v proces migracij nevronov in v usmerjanju rasti njihovih aksonov. Tako se s pomočjo astrocitov oblikujejo živčni spleti, jedra, živčne poti in stiki med posameznimi nevroni (Kržan, 2001; Nestler, 2001).

Radialna glija in kasneje v odraslem obdobju astrociti, pa izločajo tudi nevrotrofične faktorje in citokine. Ti delujejo kot trofična podpora tako nevronom kot glija celicam. Faktorji, kot so: živčni rastni dejavnik - NGF, nevrotrofični dejavnik možganskega izvora - BDNF, ciliarni nevrotrofični dejavnik - CNTF, nevrotrofični dejavnik glialnega izvora - GDNF. Ti v različnih koncentracijah in kombinacijah uravnavajo tako morfološko, rast in diferenciacijo kot tudi samo preživetje določenih skupin nevronov in stikov med njimi (Kržan, 2001).

Tvorba trofičnih dejavnikov se v odrasli dobi osebkov bistveno zmanjša. Enako velja za sposobnost regeneracije živčevja. Vendar pa se določena stopnja sposobnosti obnavljanja ohrani tudi v tem obdobju. Tudi tu igrajo astrociti ključno vlogo.

2.3.5 Astrociti pri patoloških procesih

Patološki procesi v CZS, kot so mehanske poškodbe, virusne okužbe, degenerativni procesi in nekateri nevrotoksini, povzročijo aktivacijo astrocitov. Mirujoči astrociti se spremenijo v reaktivne celice, ki posredujejo pri procesu regeneracije in brazgotinjenja. Ta proces imenujemo reaktivna gliozna, v njem pa sodeluje tako aktivirana mikroglia kot aktivirani astrociti. Posledica tega procesa je regeneracija in/ali odmrtnje poškodovanih nevronov. Reaktivni astrociti so večji kot mirujoči, vsebujejo več glikogena in citoskeletnih proteinov (GFAP), izločati začnejo več rastnih/trofičnih faktorjev, citokinov, encimov, molekul zunajceličnega matriksa in receptorjev. Imajo tudi večjo frekvenco delitev. Torej pridobijo nekatere lastnosti iz neonatalnega obdobja.

Reaktivni astrociti pa izločajo tudi inhibitorne substance: heparan sulfat, hondroitin sulfat, keratin in druge proteoglikane. Astrociti lahko v patoloških razmerah tudi nabrekajo. To povzroči zmanjšanje lumna kapilar - zmanjšano prekrvljenost ter zmanjšanje izvenceličnega prostora, torej povečanje koncentracije ionov v njem, na kar so nevroni občutljivi. Obseg in način reaktivne glioze je odvisen od narave in mesta delovanja noxe ter od starosti prizadetega osebkov. Pri odraslih je namreč ta proces izrazitejši kot pri novorojenih osebkov (Kržan, 2001).

2.4 ANTIDEPRESIVI

Antidepresivna zdravila so snovi, ki spreminjajo (povečajo) koncentracijo neurotransmiterjev v sinaptični špranji. Za razumevanje delovanja teh zdravil je potrebno predhodno poznavanje lastnosti bolezni, ki se s temi snovmi zdravijo in s katero se sreča vsaj enkrat v življenju približno 10% prebivalstva (Williams DA et al, 2008). Za kaj torej gre pri depresiji?

2.4.1 Depresija

Prvi je v 5. stol. n.št. bolezen opisal Hipokrat. Menil je, da je psihično stanje človeka odvisno od ravnotežja štirih telesnih sokov: sluzi, krvi, rumenega in črnega žolča.

Depresijo naj bi povzročalo ekscesno izločanje črnega žolča.

Čeprav je z vidika današnjega časa ta razlaga malce nenavadna, pa je pomembna zato, ker povezuje duševno stanje s telesnimi simptomi, kar za depresijo povsem drži (Kandel et al, 2000).

Depresija je bolezen, ki se torej tiče celotnega telesa in telesnih funkcij, razpoloženja in misli bolnika. Vpliva na to, kako in koliko človek spi, jé, razmišlja in čustvuje. Brez zdravljenja lahko traja mesece in celo leta. Prizadene še enkrat toliko žensk kot moških, vsakega dvajsetega najstnika (od tega je večina deklic), pa tudi vsakega petdesetega otroka (Williams DA et al, 2008). Je glavni vzrok za samomore (Nestler et al 2001).

2.4.1.1 Simptomi

Simptome depresije lahko razdelimo na biološke in emocionalne:

Emocionalni simptomi se na pacientu kažejo kot apatičnost, žalost, trpljenje in bolečina, nizka samozavest, slaba samopodoba, občutki ničvrednosti, omahljivost, nezanimanja, odsotnosti volje do življenja.

Med biološke simptome spadajo: ovirano mišljenje in delovanje, izguba libida, motnje spanja in apetita (Rang et al, 2007).

2.4.1.2 Teorije depresije

Obstajajo različne razlage depresivnega stanja in vzrokov zanj. Vsaka razlaga na svoj način osvetljuje problem.

Monoaminska teorija dr. Josepha Schildkrauta iz leta 1965 pravi, da je depresija posledica pomanjkanja monoaminskih transponderjev (noradrenalina in serotonina) na določenih mestih v možganih, medtem ko je za manjjo značilen presežek teh prenašalcev (Rang et al, 2007).

To teorijo podpira dejstvo, da pri večini pacientov z depresijo po nekaj tednih aplikacije antidepressivnih zdravil dosežemo izboljšanje stanja. V živalskih modelih depresije (izzvanih z rezerpinom, ki blokira transport transponderjev v presinaptične vezikle z inhibicijo VMAT) je le to mogoče zavreti z aplikacijo tricikličnih antidepressivnih zdravil (Williams DA et al, 2008).

Hipoteza, ki govori o občutljivosti receptorjev, zagovarja tezo, da pri depresiji ne gre za premajhno koncentracijo živčnih prenašalcev, ampak za povečano občutljivost receptorjev nanje. Povečanje števila receptorjev in spremembe na receptorjih se zgodijo ob manjših koncentracijah neurotransponderjev in posledično zaradi povratne zanke držijo njihovo koncentracijo nizko, kar vodi v depresijo. Z jemanjem AD zdravil povečamo koncentracije serotonina in noradrenalina in s tem zmanjšamo občutljivost oz. številčnost receptorjev nanje.

Permisivna hipoteza poudarja pomembnost ravnotežja med serotoninom in noradrenalinom in uravnavanjem razpoloženja. Nižje koncentracije serotonina posledično vplivajo na kontrolo ravnotežja adrenergičnega sistema. Koncentracije noradrenalina se abnormalno povečajo. Enako se zgodi s serotoninom, če so koncentracije noradrenalina v sinapsi nizke.

Hormonska teorija govori o vplivu sprememb v hipofizi. Ob stresu hipotalamus izloča stresni hormon CRF, ki stimulira hipofizo k izločanju ACTH. ACTH stimulira adrenalne žleze, da sprostijo kortizol. Ta pa direktno zvišuje nivo noradrenalina in adrenalina. Ob daljšem povišanem izločanju kortizola se pojavi depresija in anksiozna stanja (Williams DA et al, 2008).

AD zdravila praviloma delujejo, a ostaja vprašanje, zakaj je biokemično delovanje teh zdravil zelo hitro, do izboljšanja počutja pa pride šele po nekaj tednih zdravljenja ter zakaj

pri nekaterih pacientih manj selektivna antidepresivna zdravila delujejo učinkovitejše kot pa bolj selektivna.

Dejstva dajejo slutiti, da so za izboljšanje stanja potrebne sekundarne spremembe v možganih in ne le primarni efekt zdravila – povečanje koncentracije nevrotrosmiterjev v sinapsah in da vloga noradrenalina in serotonina pri depresivnih motnjah morda ni tako edinstvena.

Odgovore na prej zastavljena vprašanja iščejo nekateri znanstveniki v vplivu trofičnih faktorjev. Zagovarjajo idejo, da gre pri depresiji predvsem za izgubo nevronov v območju hipokampusa (eno od območij s stalnim nastajanjem novih nevrnalnih celic) in prefrontalnega korteksa (Rang et al, 2007). Izguba nevronov je predvsem posledica zmanjšanja izražanja nevroprotektivnih proteinov potrebnih za rast in delovanje nevronov. Glavni preiskovanec je možganski nevrotrofični dejavnik BDNF. Kot sem omenila v prejšnjem poglavju, pa tega izločajo tudi astrociti. Z antidepresivnimi zdravili, ki na različne načine povečajo koncentracijo monoaminskih nevrotrosmiterjev, dosežemo večjo aktivnost nevronov in večje izražanje nevrotrofičnih faktorjev, kar posledično v roku nekaj tednov pripelje do obnove izgubljenih nevronov v hipokampusu.

Tako lahko gledamo na monoaminske transmierteje kot na nekakšne posrednike, s katerimi manipuliramo primarno spremembo, ki povzroča depresivna (in druga nevro- ter psihopatološka) stanja.

2.4.2 Antidepresivna zdravila

Delimo jih glede na kemično strukturo in na način delovanja:

Starejša razdelitev – glede na kemijsko strukturo:

TCA - triciklični antidepresivi, za katere je značilna triciklična zgradba molekule. Takšno zgradbo imajo: amitriptilin, klomipramin, imipramin, dezipramin. Triciklična antidepresivna zdravila delujejo tako, da ovirajo ponovni privzem serotonina in noradrenalina v presinaptične nevrone. Vsaj del njihove molekule je dovolj podoben nevrotrosmiterju, da se lahko ujema s transportno molekulo, se nanjo veže in s tem onemogoči njeno delovanje. Torej preprečijo prenos dejanskega nevrotrosmiterja preko membrane v celico (nevron ali astrocit). V terapevtskih dozah naj ne bi vplivala na

privzem dopamina. Vendar pa ovirajo delovanje histaminskih, muskarinskih, serotoninskih in α_1 -adrenergičnih receptorjev, za kar terapevtska korist ni dokazana. Stranski učinki pa so med drugim: ortostatska hipotenzija, suha usta, sedacija, zamegljen vid, pridobitev telesne teže, spolna disfunkcija (impotenca, prezgodnja ejakulacija, nezmožnost orgazma). Z njimi uspešno zdravijo panične motnje in nočno mokrenje pri otrocih nad 6 let (konstrikcija notranjega sfinktra v mehurju). Izboljšanje počutja nastopi po dveh do treh tednih po začetku zdravljenja. Pri zdravih osebkih ta zdravila nimajo učinka, pri manično depresivnih pacientih pa lahko sprožijo manično fazo. Njihova uporaba je zaradi ne malo stranskih učinkov, ki jih nove generacije antidepresivnih zdravil nimajo, upadla (Howland in Mycek 2006).

Novejša razdelitev – glede na način delovanja:

MAOI - inhibitorji monoaminoksidaze, kot so: moklobemid in fenelzin.

Monoaminoksidaza je mitohondrijski encim, ki ga najdemo v živčnem, črevesnem in jetrnem tkivu. V nevronih deluje kot inaktivator neurotransmiterjev, ki uidejo iz presinaptičnega vezikla. MAOI inhibitorji, z ireverzibilno vezavo na ta encim, preprečijo njegovo delovanje in s tem omogočijo nakopičenje neurotransmiterja v presinaptičnem nevronu in uhajanje neurotransmiterjev v sinaptično špranjo in s tem povečanje njihove koncentracije v njej. Ob vezavi več molekul neurotransmiterja na tarčne receptorje je signal, ki se prenese na postsinaptični nevron, močnejši. MAOI so močni antidepresivi, ki se večinoma uporabljajo za zdravljenje atipičnih depresij, katerih zdravljenje z novejšimi SSRI zdravili ni bilo uspešno.

SSRI – selektivni inhibitorji ponovnega privzema serotonina kot so: citalopram, fluoksetin, fluvoksamin, sertralin, escitalopram. Specifično inhibirajo le ponovni privzem serotonina in imajo 300 do 3000 krat večjo afiniteto do serotoninskega kot do noradrenalinskega transporterja. Zelo slabo, če sploh, blokirajo dopaminske prenašalce. Enako naj bi imela ta zdravila zelo šibak učinek na H_1 , muskarinske in α_1 in α_2 – adrenergične receptorje, torej naj bi povzročala tudi manj stranskih učinkov. Njihov terapevtski učinek je viden šele po dveh tednih zdravljenja. S SSRI zdravijo tudi obsesivno kompulzivne motnje, anksiozne motnje, bulimijo nervozo, napade panike in predmenstrualno disforijo. Stranski učinki so predvsem motnje spanja in izguba libida. Zdravila povzročajo sedacijo in so zato obetavna

za zdravljenje oseb z nespečnostjo. Predpisovanjem teh zdravil otrokom in najstnikom je problematično. Raziskave kažejo da vsak petdeseti otrok postane bolj suicidalen ob zdravljenju z SSRI.

SNRI – selektivni inhibitorji noradrenalina. Kot že samo ime pove, imajo ta zdravila večjo afiniteto in selektivnost za transportne molekule noradrenalina. Mednje spadajo dezipramin, maprotilin in nortriptilin, ki sem jih tudi uporabila v poskusih. Imajo šibak učinek na histaminske H_1 , muskarinske in α_1 -adrenergične receptorje. Njihovi stranski učinki so milejši od neselektivnih antidepresivnih zdravil.

NSRI - inhibitorji privzema noradrenalina in serotonina, kot so amitriptilin in klomipramin imajo slabšo selektivnost. Zato pričakujemo vpliv na privzeme drugih monoaminov in posledično tudi večje stranske učinke.

Atipični antidepresivi – delujejo na različnih mestih. So enako učinkoviti kot triciklična zdravila ali SSRI. Stranski učinki so zelo različni. Primeri zdravil: bupropion in mirtazapin (Howland in Mycek 2006).

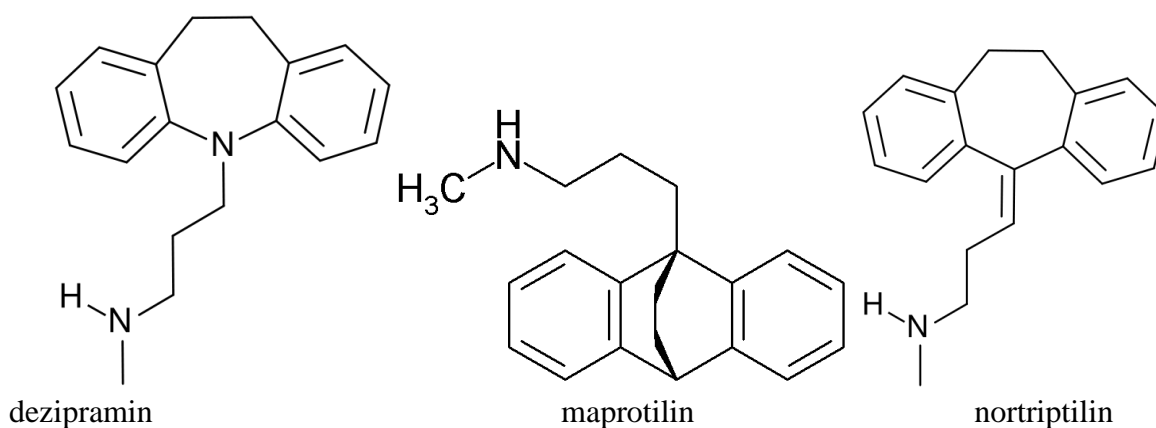
Z izjemo inhibitorjev MAO antidepresivna zdravila delujejo tako, da se vežejo na serotoninski transportni protein (SERT) ali noradrenalinski transportni protein (NET) in s tem blokirajo ponovni privzem neurotransmiterja v presinaptični nevron (Gether et al 2006).

Stranske učinke antidepresivnih zdravil gre pripisati njihovi nepopolni selektivnosti oziroma antagonističnemu delovanju na druge receptorje (muskarinske, histaminske H_1 , α_1 -adrenergične). Prav v njihovi nepopolni selektivnosti pa leži upanje za osvetlitev mehanizmov delovanja in privzema neurotransmiterjev kot je histamin, čigar 5 minut slave šele prihaja. Proučevanje in primerjava vpliva antidepresivnih zdravil različnega kova na privzem histamina nam da pomembne informacije o naravi tega privzema.

2.4.2.1 Predstavitev antidepresivnih zdravil, uporabljenih v poskusih

Tabela 2: Po razredih razdeljena antidepresivna zdravila, ki sem jih uporabila za poskuse (povzeto po Wiliams DA et al, 2008: 554)

Selektivni inhibitor ponovnega privzema noradrenalina	kratica: SNRI	Dezipramin
		Maprotilin
		Nortriptilin
Selektivni inhibitor ponovnega privzema serotonina	kratica: SSRI	Citalopram
		Fluoksetin
		Fluvoksamin
Inhibitor ponovnega privzema noradrenalina in serotonina	kratica: NSRI	Amitriptilin
		Klomipramin

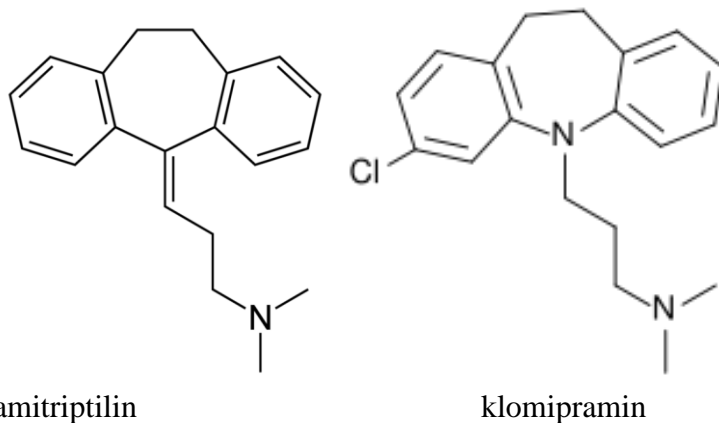


Slika 13: Kemijska struktura uporabljenih selektivnih inhibitorjev ponovnega privzema noradrenalina (SNRI) (povzeto po Wiliams et al, 2008: 562)

Dezipramin: (pKa = 1,5 in 10,2) Ima triciklično molekulsko strukturo (Slika 13) in je aktivna substanca antidepresivnega zdravila imipramin, za katerega je značilna močna sedacija. Njegova biološka uporabnost je enaka ostalim predstavnikom AD s tako strukturo. Dezipramin kaže večjo selektivnost in potenco za inhibicijo NET kot njegovi kolegi. Dolgo jemanje tega zdravila povzroči zmanjšanje števila α_1 -adrenoreceptorjev, desenzitizacijo α_2 -presinaptičnih receptorjev in uravnoteži delovanje noradrenergičnega sistema. Zmanjša tudi število NET, vendar ne SERT.

Nortriptilin (pKa = 9,73) spada v skupino SNRI, vendar je glavni metabolit AD amitriptilina iz skupine NSRI. Tako kot dezipramin, se tudi ta pojavi v materinem mleku. (Slika 13)

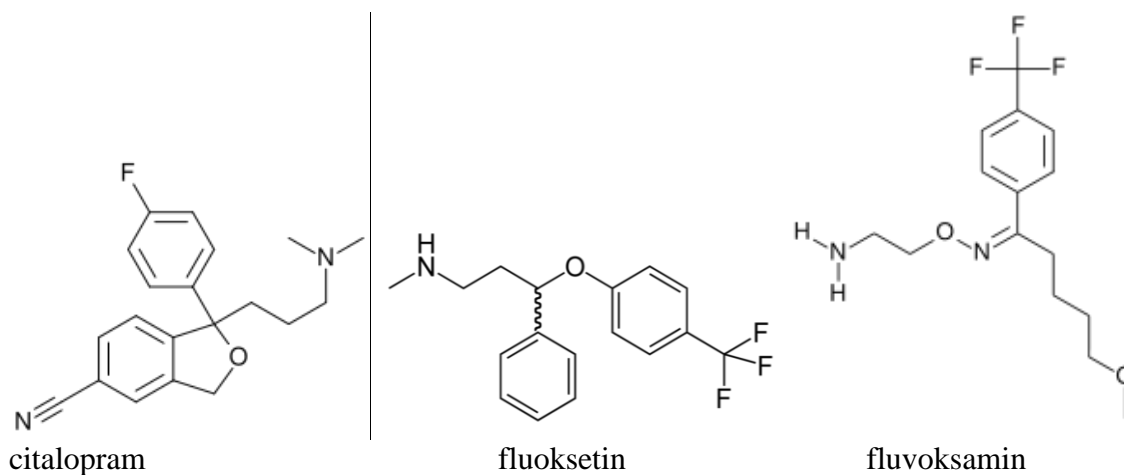
Maprotilin (pKa = 10,2) je po svoji strukturi tetracikličen (Slika 13). Od svojih kolegov v skupini SNRI se razlikuje po etilenskem mostu v centralnem obroču. Rezultat tega je rigidna ciklična struktura. Maprotilin kaže najvišjo afiniteto in selektivnost za NET. Mehanizem njegovega antidepresivnega delovanja je enak mehanizmu dezipramina.



Slika 14: Kemijska struktura uporabljenih neselektivnih inhibitorjev ponovnega privzema noradrenalina in serotonina (NSRI) (povzeto po Williams et al, 2008: 559).

Amitriptilin (pKa 9,4) ima triciklično molekulsko strukturo (Slika 14). Njegov aktivni metabolit je nortriptilin. Kaže enako afiniteto tako do SERT kot NET.

Klomipramin (pKa 9,4) se razlikuje od svojih kolegov iz skupine NSRI (Slika 14) zaradi večje afinitete do SERT kot NET. Vendar pa se njegova učinkovitost inhibicije SERT *in vivo* zmanjša zaradi formacije aktivnega metabolita, ki močno inhibira NET. Posledično pri zdravljenju s klomipraminom pričakujemo podobne stranske učinke kot pri skupini AD SNRT.



Slika 15: Kemijska struktura uporabljenih selektivnih inhibitorjev ponovnega privzema serotonina (SSRI) (povzeto po Wiliams et al, 2008: 572)

Citalopram (pKa 9,5) kaže največjo selektivnost za SERT v svoji skupini (predvsem S-izomera). Ne kaže nobenega učinka na NET in ponovni privzem dopamina. (Slika 15)

Fluvoksamin ima molekulsko strukturo, ki je v skupini SSRI unikat. Dejansko je triciklični AD z razklenjenimi obroči (Slika 15). Elektronegativna skupina (npr. 4-trifluorometilskupina) se je izkazala ključnega pomena za afiniteto in selektivnost SERT. Kljub temu, da jo ima, pa fluvoksamin kaže manjšo potenco pri inhibiciji SERT kot ostali AD iz skupine SSRI. Njegov vpliv na NET in dopaminske transporterje naj bi bil zanemarljivo majhen.

Fluoksetin ima veliko selektivnost za SERT in nizko afiniteto za NET. Substanca je na tržišču kot racemat R- in S-fluoksetina (Slika 15). Njegova selektivnost je odvisna od pozicije fenoksi skupine. Oba enantiomera imata enako afiniteto do človeškega SERT, vendar pa je S-enantiomer bolj selektiven zanj (Wiliams DA et al, 2008).

3 MATERIAL IN METODE

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, ter naslednja antidepresivna zdravila: amitriptilin (Lek, Slovenija), citalopram (Lundbeck, Danska), dezipramin (Sandoz, Švica), fluoksetin, fluvoksamin (oba Sigma, ZDA), klomipramin, nortriptilin, maprotilin (vsi Pliva, Hrvaška).

3.2 METODE

3.2.1 Živali

Za pripravo primarnih kultur astrocitov smo uporabili možganske skorje tri dni starih mladičev podgan obeh spolov in odraslih podgan ženskega spola težkih 220 do 250g seva Wistar (WHI 24-103). 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

Podgane je dekapitaliral tehnik, ki ima dovoljenje za izvajanje evtanazije poskusnih živali. Iz lobanje je nato previdno odstranil možgane ter jih potopil v raztopino Leibowitz L-15. Nato smo z možganov odstranili možganske ovojnice in možgansko skorjo. Po odstranitvi meninge smo s pomočjo pipet in injekcijskih igel različnih svetlin mehansko razdrobili možgansko tkivo v raztopini Leibowitz L-15. Po centrifugiranju suspenzije, smo usedlino prenesli v gojilne posode, ki so vsebovale medij za gojenje astrocitov z naslednjo sestavo: DMEM (po Dulbeccu modificiran Eangelov medij) z visoko koncentracijo glukoze, ki smo mu dodali še 10% govejega fetalnega seruma, 1mM piruvata, 2mM glutamina in 25

$\mu\text{M}/\text{mg}$ gentamicina. Celice smo vzgajali v inkubatorju pri 37°C , v mešanici 95% zraka in 5% CO_2 .

Ko so kulture postale prvič konfluentne, smo jih stresali preko noči pri 225 obratih/minuto. Medij smo zamenjali naslednje jutro. Postopek s stresanjem in menjanjem medija smo trikrat ponovili. S stresanjem se znebimo celic mikroglije, ki se ne morejo pritrčiti na gojitveno posodico tako učinkovito kot astrociti.

Po trikratni ponovitvi tega postopka smo odlili DMEM in celice v posodicah izpostavili tripsinu. Odlepljene celice smo prenesli v nove posode in jih 24 ur kultivirali v prisotnosti $20 \mu\text{M}/\text{mg}$ antimetabolita citozin arabinozida, ki je uničil prisotne fibroblaste. Fibroblasti se namreč začnejo deliti hitreje kot astrociti.

Za poskus uporabimo astrocite po dveh tednih gojenja v drugi pasaži v gojilnih posodah z 12 petrijevskami.

3.2.3 Privzem histamina

Odstranili smo DMEM in celice dvakrat sprali s pufrom za privzem, ki je vseboval 25 mM HEPES, 125 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,2 mM MgSO_4 , 1,7 mM CaCl_2 , 5,6 mM glukoze in je imel pH 7,4. V vsako od petrijevsk s konfluentnimi astrociti smo dodali eno od koncentracij izbranega antidepresivnega zdravila ($1\text{nmol}/\text{L} - 10^{-9}\text{ M}$, $10\text{nmol}/\text{L} - 10^{-8}\text{M}$, $100\text{nmol}/\text{L} - 10^{-7}\text{M}$, $1 \mu\text{mol}/\text{L} - 10^{-6}\text{M}$, $10 \mu\text{mol}/\text{L} - 10^{-5}\text{M}$). Vsaka koncentracija je bila dodana v treh paralelkah. Inkubirali smo 20 minut pri 37°C , nato dodali $125 \text{ nmol}/\text{L}$ ^3H -histamina in inkubirali še 20 minut - enako v fizioloških pogojih. V slepi vzorec smo odpipetirali le pufer, v kontrolni vzorec pa pufer in 125 nM ^3H -histamina. Po dvajsetih minutah smo reakcijo ustavili, s tem da smo posodice položili v ledeno kopel in hitro odstranili inkubacijsko tekočino. Nato smo posodice s celicami hitro trikrat sprali z ledeno mrzlim pufrom, ki ni vseboval CaCl_2 . Celice smo denaturirali z 0,6 ml 0,5M NaOH. V 0,5 ml vsakega vzorca smo izmerili radioaktivnost, v preostanku vsakega vzorca (0,1 ml) pa izmerili koncentracijo proteinov s pomočjo metode BioRad.

3.2.4 Določanje koncentracije proteinov

Za določanje proteinov najprej odpipetiramo albumin (2,5 μ g, 5 μ g, 8 μ g, 10 μ g, 20 μ g, 30 μ g) in vzorce (20 μ L, 40 μ L).

Dodamo 200 μ L 0,5 M NaOH in vzorce premešamo. Čez 10 minut dodamo vode do skupnega volumna 0,6 ml, 200 μ L 0,5 M HCl in 200 μ L reagenta (BioRad; fosforna kislina) ter ponovno premešamo. Pripravljene raztopine pustimo stati 30 minut in nato spektrofotometrično izmerimo absorbcijo pri valovni dolžini 595 nm. Z dobljeno koncentracijo proteinov preverjamo koncentracijo privzetega 3 H-histamina.

3.2.5 Analiza podatkov

Vse poskuse smo izvedli v treh paralelkah in večkratnih ponovitvah. Natančno število ponovitev je omenjeno pod vsako sliko v poglavju Rezultati.

Vse vrednosti so označene kot aritmetična sredina \pm standardna napaka aritmetične sredine (SEM). Statistično razliko smo izračunali s Studentovim t-testom pri primerjavi dveh skupin rezultatov in enosmerno analizo variance (ANOVA) pri primerjavi več skupin. Statistično značilno razliko predstavlja vrednost $p \leq 0,05$.

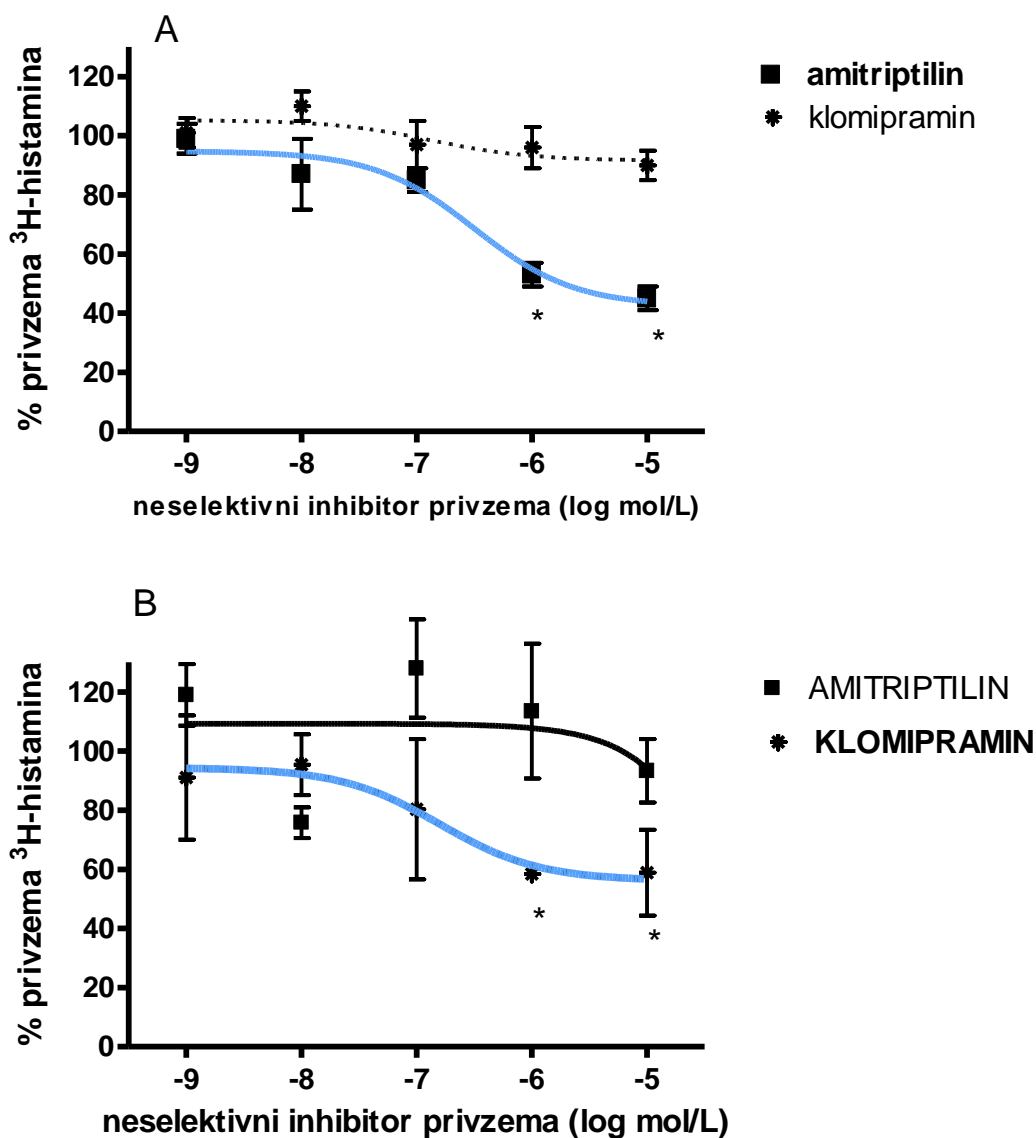
4 REZULTATI

Iz literature je znano, da astrociti privzemajo histamin. Privzem je odvisen od Na^+ , temperature in koncentracije histamina. Astrociti neonatalnih podgan privzemajo histamin z manjšo hitrostjo in manjšo kapaciteto kot astrociti odraslih podgan (Papler T in Pečavar B, 2006).

Raziskovali smo vpliv različnih vrst antidepresivnih zdravil na privzem histamina v primarne kulture astrocitov vzgojenih iz neonatalnih in odraslih podgan. Rezultati so, glede na skupino antidepresivnih zdravil, razvrščeni v tri sklope:

4.1 VPLIV NESELEKTIVNIH ZAVIRALCEV PRIVZEMA

Uporabili smo amitriptilin in klomipramin v koncentracijskem območju 1 nM do 10 μM . Amitriptilin, v koncentracijskem območju od 1 – 10 μM , statistično značilno inhibira privzem histamina v neonatalne astrocite z IC_{50} 0,32 $\mu\text{mol/L}$ (Slika 16 A), medtem ko ne vpliva na privzem histamina v astrocite pripravljene iz odraslih podgan. Nasprotno pa klomipramin, ki ne povzroči značilnega povečanja ali zmanjšanja privzema histamina v astrocite iz neonatalnih podgan, statistično značilno zmanjša privzem histamina v astrocite pripravljene iz odraslih podgan (IC_{50} znaša 0,16 $\mu\text{mol/L}$) (Slika 16 B).



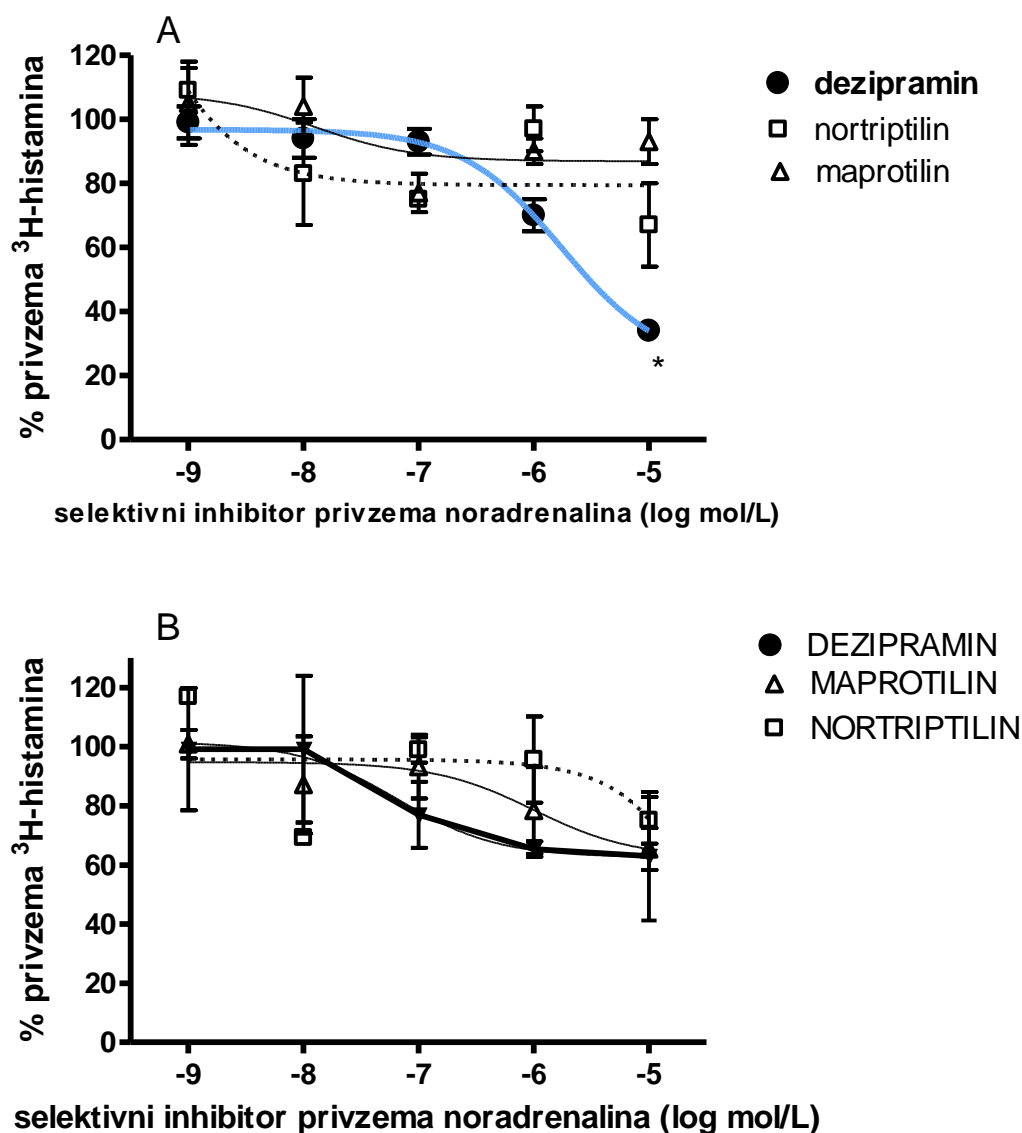
Slika 16: Vpliv privzema ³H- histamina v primarne kulture astrocitov neonatalnih podgan (A) in odraslih podgan (B). Astroците smo predinkubirali z izbranimi koncentracijami NSRI antidepresivnih zdravil (amitriptilin in klomipramin), preden smo dodali 125 nmol/L ³H- histamina. Po 20. minutah smo reakcijo prekinili. Rezultati so predstavljeni kot % privzema samega ³H- histamina v pufru. Vsaka točka predstavlja srednjo vrednost ± SEM poskusa (n=6). Zvezdice označujejo statistično značilnost p < 0,05.

4.2 VPLIV SELEKTIVNIH INHIBITORJEV PONOVNEGA PRIVZEMA NORADRENALINA

Uporabili smo dezipramin, maprotilin in nortriptilin v koncentracijskem območju od 1 nM do 10 μ M. Dezipramin, v koncentracijskem območju od 1 do 10 μ M, statistično značilno inhibira privzem histamina v neonatalne astrocite z IC_{50} 1,75 μ mol/L (Slika 17 A). Pri višjih koncentracijah se delež privzema bistveno zmanjša. Ostali dve zdravili na privzem histamina v astrocite neonatalnih podgan nimata statistično značilnega vpliva.

Deziramin ne kaže statistično značilnega vpliva na privzem histamina v astrocite pripravljene iz odraslih podgan. Pri višjih koncentracijah nortriptilina in dezipramina je sicer opazna manjša inhibicija privzema, ki pa ni statistično značilna (Slika 17 B).

Maprotilin na privzem histamina v astrocite pripravljene iz odraslih podgan nima statistično značilnega vpliva.

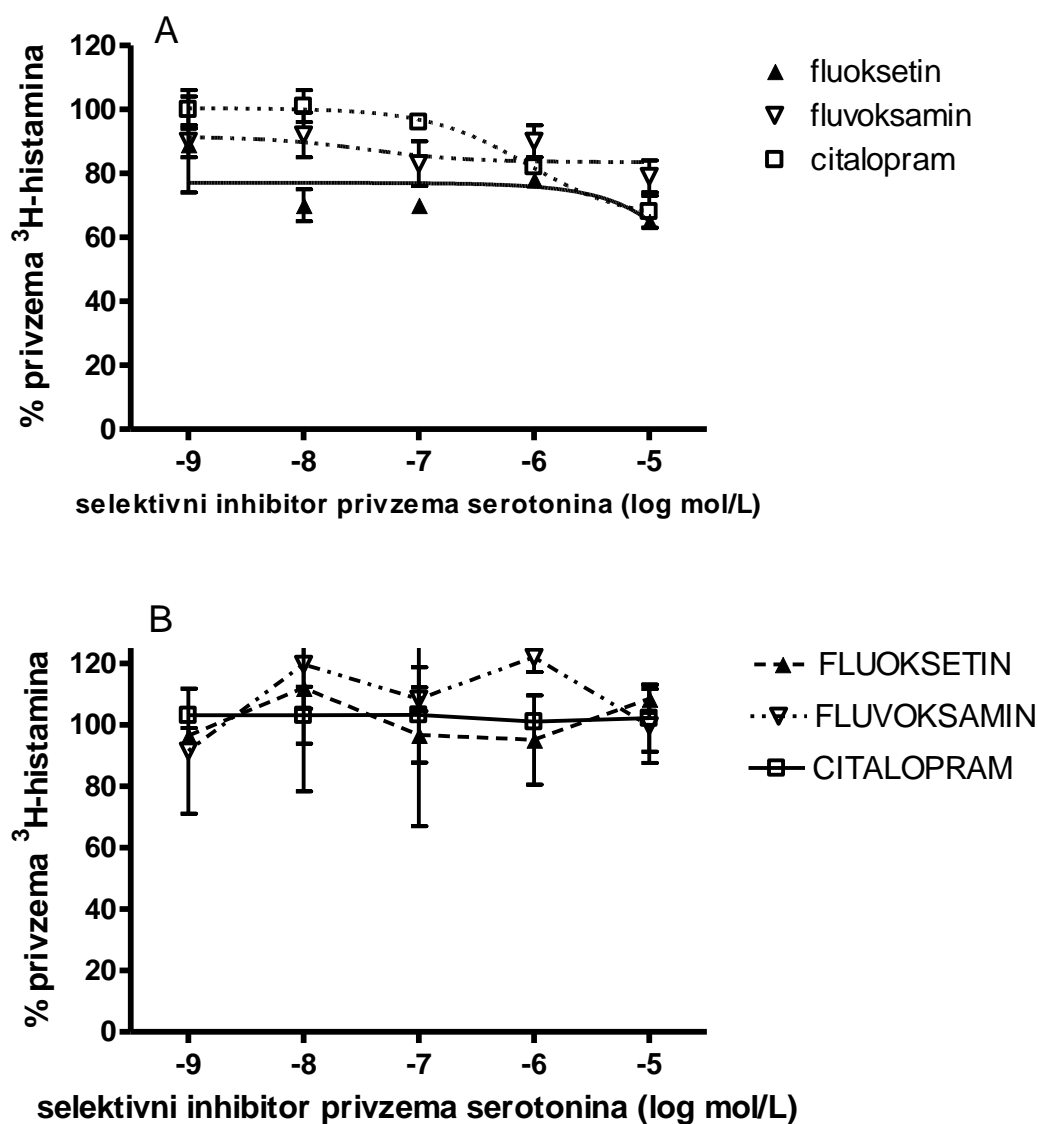


Slika 17: Vpliv privzema ³H- histamina v primarne kulture astrocitov neonatalnih podgan (A) in odraslih podgan (B). Astroците smo predinkubirali z izbranimi koncentracijami SNRI antidepresivnih zdravil, preden smo dodali 125 nmol/L ³H- histamina. Po 20. minutah smo reakcijo prekinili. Rezultati so predstavljeni kot % privzema samega ³H- histamina v pufru. Vsaka točka predstavlja srednjo vrednost ± SEM (n=6), razen nortriptilina pri odraslih podganah (n = 3). Zvezdice označujejo statistično značilnost p < 0,05.

4.3 VPLIV SELEKTIVNIH INHIBITORJEV PRIVZEMA SEROTONINA

Uporabili smo fluvoksamin, fluoksetin in citalopram v koncentracijskem območju 1 nM do 10 μ M. Pri poskusu na kulturah astrocitov neonatalnih podgan ni imelo statistično značilnega vpliva na privzem nobeno antidepresivno zdravilo iz tega razreda. Nekaj inhibicije je opazne pri zdravilih fluoksetin in citalopram, vendar le pri največji koncentraciji 10 μ mol/L (Slika 18 A). Fluvoksamin na privzem histamina v astrocite neonatalnih podgan ni vplival.

Pri poskusih z SSRI na kulturah astrocitov odraslih podgan rezultati ne kažejo nobenega vpliva zdravil na privzem histamina (Slika 18 B).



Slika 18: Vpliv privzema ^3H - histamina v primarne kulture astrocitov neonatalnih podgan (A) in odraslih podgan (B). Astroците smo predinkubirali z izbranimi koncentracijami SSRI antidepresivnih zdravil, preden smo dodali 125 nmol/L ^3H - histamina. Po 20 minutah smo reakcijo prekinili. Rezultati so predstavljeni kot % privzema samega ^3H - histamina v pufu. Vsaka točka predstavlja srednjo vrednost SEM (n = 6), razen fluoksetin pri odraslih (n = 3). Zvezdice označujejo statistično značilnost p < 0,05.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Antidepresivna zdravila delujejo drugače na odrasle kot na otroke. Pri obolelih odraslih lahko delajo čudeže, medtem ko so pri otrocih njihovi učinki nepredvidljivi. Ob zdravljenju otrok s temi zdravili zdravniki poročajo o pojavu suicidalnosti. Pri nas je edino dovoljeno antidepresivno zdravilo, ki se predpisuje za zdravljenje otrok, sertralin, ki spada v skupino SSRI. Indicirano je le za zdravljenje otrok z obsesivno kompulzivno motnjo.

Omenjene klinične ugotovitve dopolnjujejo tudi rezultati mojega diplomskega dela, saj je učinek antidepresivnih zdravil na privzem ^3H -histamina v astrocite neonatalnih podgan drugačen kot pri astrocitih odraslih podgan.

Astrociti privzemajo le manjši del v sinaptično špranjo sproščenega histamina. Večina se ga privzame v pre- in post- sinaptične nevrone, kjer se lahko ponovno uporabi.

Transporter, ki regulira privzem histamina v nevrone, ima večjo afiniteto ($1,2 \mu\text{M}$), a manjšo kapaciteto ($2.95 \text{ fmol/mg prot/min}$) (Sakurai, 2006) za histamin kot transporter, ki regulira privzem histamina v astrocite (Osredkar v tisku). Prvi požarni zid, ki ščiti možgansko okolje pred prebitkom histamina v živčevju, predstavljajo živčne celice, naslednji požarni zid pa predstavlja privzem histamina v nevrone ali celice glije (astrocite) preko OCT3, prej opisovanega kot privzem 2.

Pri neonatalnih podganah se histamin nahaja predvsem v somi možganskih celic, medtem ko ga pri odraslih osebkih najdemo v sinaptičnih končičih (Hugh et al, 1982). Vzorec nepravilno spreminjajoče koncentracije histamina v razvijajočih možganih sovпада z obdobji proliferacije možganskih celic (Pearce LA in Schanberg SM, 1969). Torej ima histamin takrat drugačno vlogo kot v odraslem obdobju osebka. Verjetno je histamin v otroškem življenjskem obdobju nevromodulator.

Poleg lokalizacije v presinaptičnem nevronu, ki je drugačna v različnih življenjskih obdobjih, poznamo še razliko v kinetiki privzema histamina. Histamin se v odrasle astrocite privzema hitreje kot v neonatalne astrocite (Papler T in Pečavar B, 2006). Ko privzem v astrocite neonatalnih podgan doseže svoj maksimum, se ta v astrocitih odraslih podgan še nadaljuje (Pečavar B in Papler T, 2006). Torej imajo astrociti odraslih osebkov večjo kapaciteto privzema, morebiti imajo tudi večjo gostoto transmembranskih transporterjev. Verjetno se v odraslem obdobju sprošča tudi več histamina kot v otroškem življenjskem obdobju, da je potrebna drugačna kinetika privzema.

Pričakovala sem, da bodo imela antidepresivna zdravila večji vpliv na privzem histamina v astrocite odraslih kot neonatalnih podgan. Vendar pa po rezultatih sodeč ni tako.

Antidepresivna zdravila vplivajo tako na privzem ^3H -histamina v astrocite neonatalnih kot v astrocite odraslih podgan. Zanimivo pa je, da vpliva na privzem v ene in druge astrocite ne kažejo ista zdravila. Statistično značilen vpliv na privzem v astrocite odraslih podgan kaže le klomipramin iz skupine NSRI, medtem ko amitriptilin, najbolj neselektivno delujoče antidepresivno zdravilo, ne učinkuje na privzem histamina v kulture astrocitov, pripravljene iz odraslih podgan. Pri astrocitih neonatalnih podgan pa ima, prav obratno, statistično značilen vpliv na privzem amitriptilin, medtem ko ostaja klomipramin brez večjega inhibitornega učinka.

Amitriptilin je neselektivni antidepresiv s tremi obroči v strukturi svoje molekule. Za skupino NSRI so značilni različni stranski učinki zaradi antagonističnega delovanja na muskarinske, α_1 -adrenergične in histaminske H_1 receptorje. Strukturno je amitriptilin zelo podoben imipraminu iz iste skupine antidepresivov, ki pa že pri nizkih koncentracijah zavre privzem histamina v sinaptosome (Sakurai et al, 2006). Klomipramin je strukturno podoben imipraminu, le da ima na enem od obročev klorov ion. Njegov vpliv na privzem ^3H -histamina pa je viden le na celicah odraslih podgan. Molekuli amitriptilina in klomipramina se razlikujeta v malenkostih, a že te so dovolj za spremembe farmakodinamskih lastnosti zdravil. Klorova skupina na klomipraminu ga dela bolj selektivnega za serotoninske prenašalce. Ali je torej v odrasli dobi histaminski transporter za serotonin podoben ali celo enak serotoninskemu? Pritrdilni odgovor je privlačen, a zakaj

potem še druga za SERT selektivna AD zdravila nimajo enakega vpliva na privzem histamina?

Druga razlaga, zakaj npr. amitriplin ne vpliva na privzem histamina v astrocite, vzgojene iz odraslih podgan, je mogoče dejstvo, da imajo astrociti odraslih podgan več transporterjev za histamin kot astrociti, vzgojeni iz neonatalnih podgan. Do bolj izrazite inhibicije privzema histamina v astrocite iz odraslih podgan bi lahko prišlo, če bi uporabili še višje koncentracije antidepresivnih zdravil kot npr. 1- 10 μM koncentracija amitriptilina, ki učinkovito zavre aktivni privzem histamina v astrocite neonatalnih podgan. S koncentracijami antidepresivnih zdravil, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu, nismo želeli bistveno preseči terapevtskih koncentracij antidepresivnih zdravil.

Dezipramin iz skupine SNRI inhibira privzem monoaminov preko NET ter preko transporterjev podtipa OCT1 (Koepsell, 2004). Rezultati mojega eksperimentalnega dela pa so pokazali, da dezipramin statistično značilno zmanjša privzem histamina v astrocite neonatalnih podgan. Pri poskusu z astrociti odraslih podgan je inhibicija privzema histamina z različnimi predstavniki SNRI (dezipramin, maprotilin in nortriptilin) sicer nakazana, a ni statistično značilna. Tako kot dezipramin tudi maprotilin kaže le malo vpliva na privzem. Medtem ko rezultati poskusa z nortriptilinom, ki ima med vsemi tremi AD iz te skupine najmanjšo selektivnost za NET, ne kažejo skoraj nobenega učinka. SNRI so skupina selektivnih AD zdravil, ki imajo sicer največjo afiniteto do NET, a se stranski učinki zaradi afinitete do muskarinskih, adrenergičnih in histaminskih receptorjev vseeno pojavljajo. Dezipramin je dejansko aktivni metabolit imipramina, ki sem ga pravkar omenjala. Njegovi učinki na privzem histamina so bili že opaženi, tako da zmanjšan privzem ^3H -histamina pri mojem poskusu ni presenečenje. Zanimivo je, da tega vpliva pri astrocitih odraslih osebkov ni videti. To zopet kaže na drugačen transportni mehanizem histamina, ki se pojavi v odrasli življenjski dobi. Dezipramin kaže visoko afiniteto do NET, iz česar bi sledilo, da je v neonatalni dobi mehanizem transporta histamina podoben transportu noradrenalina. Izražanje molekul OCT pri miškah doseže odraslo raven šele pri starosti treh tednov (Alenouti Y et al, 2005). Če to velja tudi za podgane, potem dezipramin verjetno ne inhibira privzema histamina v astrocite neonatalnih podgan preko OCT, ampak učinkuje na še nepoznani transporter za histamin.

S poskusi z AD iz skupine SSRI se je potrdila še zadnja hipoteza. Selektivni inhibitorji za privzem serotonina ne vplivajo na privzem ^3H -histamina v astrocite. Opazno je le blažje inhibiranje pri astrocitih neonatalnih podgan ob uporabi fluoksetina, ki ima najmanjšo selektivnost za SERT med njimi, in citaloprama, ki ima največjo selektivnost za SERT. Na privzem v astrocite odraslih podgan nobeno od treh zdravil iz skupine SSRI ni imelo učinka. Selektivni zaviralci ponovnega privzema histamina ob zdravljenju povzročajo manj stranskih učinkov, kar se ujema z lastnostjo visoke selektivnosti za SERT. Pa vendar so med stranskimi učinki SSRI naštet tudi slabost, tesnoba, razdražljivost, motnje spolnih funkcij in nespečnost. Prav nespečnost in občutek slabosti pa povezujejo s povečano aktivnostjo histaminergičnih nevronov (Blandina P et al, 2007) ali pa sta posledica povečanih koncentracij histamina v osrednjem živčevju. Vpliv SSRI na transport histamina očitno ni pomemben, kar pa še ne izključuje možnosti vezave in učinkovanja teh zdravil na histaminske receptorje. SSRI imajo poleg dobrih odzivov pri zdravljenju in manjšega števila stranskih učinkov tudi nekaj manj znanih lastnosti. Študije kažejo, da fluoksetin pri dolgotrajnem jemanju povzroči tudi izboljšanje možganske plastičnosti in povečano proliferacijo nevronov v hipokampusu (Malberg JE et al, 2000).

Razliko pri delovanju antidepresivnih zdravil na privzem histamina bi lahko pripisali tudi lastnosti astrocitov, da se v času spreminjajo. V odraslem obdobju skrbijo za homeostazo in so enakovredni udeleženci tripartitne sinapse. Možgani mlajših osebkov pa so manj občutljivi na spremembe v mikrookolju (Kržan, 2001).

Vsekakor so posledice delovanj antidepresivnih zdravil mnogotere. Razmerja med neurotransmiterji pa so kompleksna. Histamin z vezavo na H_3 receptor ne vpliva le na lastno izločanje, pač pa tudi na izločanje drugih neurotransmiterjev. Študije skupine Blandina iz leta 2007 poročajo o povezavi histaminergičnega sistema s holinergičnim in posledičnimi možnostmi vplivanja na večje kognitivne kapacitete preko manipulacije histaminergičnega sistema. Z aktivacijo H_3 receptorjev naj bi se kognicija poslabšala, ter obratno: z antagonisti teh receptorjev naj bi, po besedah Balandinove skupine, dosegli boljšo kognicijo. Povečano izločanje histamina naj bi bil odgovor na stresne situacije.

Povzamemo lahko, da tako kot se razlikuje kinetika privzema histamina v astrocite neonatalne in odrasle življenjske dobe, se razlikuje tudi vpliv antidepresivnih zdravil na privzem histamina v astrocite vzgojene iz mladih in odraslih podgan. Le nekatera od uporabljenih antidepresivnih zdravil, amitritilin in dezipramin v neonatalni dobi ter klomipramin v odrasli dobi, značilno inhibirajo privzem histamina v astrocite. Sklepamo lahko, da je privzem histamina v neonatalnem obdobju manj specifičen proces, v kasnejši življenjski dobi pa poteka prek do sedaj še nepoznanega transporterja za histamin. Ker histamin regulira budnost in občutek slabosti, bi s sintezo stimulatorjev in inhibitorjev privzema histamina dobili nove možnosti za raziskovalno delo še neznanih funkcij možganov ter potencialna zdravila za zdravljenje nespečnosti, slabosti in nootropična zdravila.

5.2 SKLEPI

V diplomskem delu sem preverjala učinek antidepresivnih zdravil (neselektivnih, selektivnih zaviralcev privzema noradrenalina in selektivnih zaviralcev privzema serotonina) na privzem histamina v astrocite, pripravljene iz možganske skorje neonatalnih in odraslih podgan.

Potrdila sem dve in delno ovrgla eno od zastavljenih delovnih hipotez.

1. Nekatera od antidepresivnih zdravil inhibirajo tudi privzem histamina v astrocite, pripravljene iz neonatalnih in odraslih podgan. Amitriptilin in dezipramin značilno inhibirata privzem histamina v astrocite neonatalnih podgan, medtem ko le klomipramin značilno inhibira privzem histamina v astrocite, pripravljene iz odraslih podgan.
2. Selektivni zaviralci ponovnega privzema serotonina: fluoksetin, fluvoksamin in citalopram, niso vplivali na privzem histamina niti v neonatalne niti v odrasle astrocite.
3. Amitriptilin je statistično značilno inhibiral le privzem histamina v kulture astrocitov, pripravljenih iz neonatalnih podgan. Na privzem histamina v kulture astrocitov odraslih osebkov pa ni imel bistvenega vpliva.
4. Histamin se privzema preko svojega transporterja, ki do sedaj še ni identificiran in ne preko NET ali SERT.
5. Rezultati predstavljajo dodaten dokaz razlik v delovanju astrocitov v otroškem in odraslem obdobju ter tudi podpirajo klinične ugotovitve, da imajo antidepresivna zdravila drugačne klinične učinke pri otroški kot pri odrasli populaciji. Pri uporabi amitriptina in dezipramina pri otrocih ter klomipramina pri odraslih bi bili stranski učinki zdravil lahko povezani tudi s povečano koncentracijo histamina v možganih.

6 POVZETEK

Astrociti so v odraslih možganih odgovorni za vzdrževanje homeostaze. Na svoji membrani izražajo številne transporterje, s katerimi sodelujejo pri privzemu neurotransmiterjev. Histamin igra v odraslih možganih vlogo neurotransmiterja. Specifičen transporter zanj do sedaj še ni bil identificiran. Še razvijajoči možgani niso tako občutljivi na spremembe v svojem mikrookolju. Astrociti imajo vlogo usmerjanja rasti in spodbujanja k tvorbi sinaps.

Histamin se privzema tako v astrocite neonatalnih kot odraslih podgan, vendar se kinetika privzema razlikuje.

V moji nalogi sem določala lastnosti privzema ^3H -histamina v astrocite s pomočjo farmakoloških metod (inhibicija privzema ^3H histamina z različnimi antidepresivnimi zdravili) ter ugotoviti, ali obstoječa antidepresivna zdravila vplivajo na privzem histamina v astrocite.

Uporabila sem antidepresivna zdravila skupine SSRI (fluoksetin, fluvoksamin, citalopram), NSRI (amitriptilin in klomipramin), SNRI (dezipramin, maprotilin in nortriptilin).

Pri poskusih sem kulture astrocitov, pripravljene iz možgan neonatalnih in odraslih podgan, v treh paralelkah 20 minut inkubirala v različnih koncentracijah antidepresivnih zdravil od 1 nM do 10 μM . Nato je sledil dodatek 125 nmol/L ^3H -histamina in 20 minutni privzem v kulture astrocitov.

Ugotovila sem, da antidepresivna zdravila ne vplivajo enako na privzem ^3H -histamin v astrocite odraslih in neonatalnih podgan. V skupini NSRI je AD zdravilo, ki je statistično značilno znižal privzem histamina v astrocite, amitriptilin (IC_{50} je 0,32 $\mu\text{mol/L}$), medtem ko klomipramin ni imel učinka. Na privzem histamina v astrocite odraslih podgan je statistično značilno vplival klomipramin (IC_{50} je 0,16 $\mu\text{mol/L}$), medtem ko amitriptilin ni imel vpliva.

V skupini SNRI je na astrocite neonatalnih podgan vplival le dezipramin (IC_{50} je 1,7 $\mu\text{mol/L}$), ki je statistično znižal privzem histamina. Na privzem histamina v astrocite odraslih podgan ni statistično značilno vplivalo nobeno zdravilo iz skupine SNRI.

Skupina SSRI ni pokazala nobenega vpliva na privzem histamina tako v astrocite neonatalnih kot tudi odraslih podgan.

Glede na to, da vsa AD zdravila iz posamezne skupine ne vplivajo na privzem, lahko sklepam, da se histamin privzema v astrocite preko posebnega transporterja in ne NET in SERT.

Hkrati rezultati kažejo razlike v delovanju astrocitov v otroškem in odraslem obdobju ter tudi podpirajo klinične ugotovitve, da imajo antidepresivna zdravila drugačne klinične učinke pri otroški kot pri odrasli populaciji. Glede na to, da na privzem histamina v astrocite neonatalnih podgan vplivata tako dezipramin iz skupine SNRI kot amitiptilin iz skupine NSRI, na privzem v astrocite odraslih podgan pa le klomipramin iz skupine NSRI, sklepam, da je privzem histamina v neonatalnih možganih manj specifičen proces kot v odraslih.

Zaradi mnogoterih in delno še neznanih funkcij histamina v možganih, bi s sintezo stimulatorjev in inhibitorjev njegovega privzema dobili nove možnosti za raziskovalno delo ter potencialna zdravila za zdravljenje nespečnosti, slabosti in nootropična zdravila.

V zaključku želim zopet igrati na poetično karto in razložiti svoje razmišljanje ob izkušnji pri delu te naloge.

Tako kot sem razložila v poglavju o antidepresivnih zdravilih, obstajajo različne razlage depresivnega stanja in vzrokov zanj. Vsaka razlaga na svoj način osvetljuje problem.

Hkrati pa prav to različno razumevanje bolezni, njeno uspešno in neuspešno zdravljenje ter delovanje AD (tudi na tarče, ki jih nismo pričakovali), daje neprecenljiv vpogled v kompleksno delovanje možganov, ki ga šele odkrivamo. Kar želim povedati, je da je moja naloga eksperimentalno zelo specifične narave in obravnava na videz zelo ozko področje, kjer se je malce osvetlila narava privzema histamina v astrocite. Vendar pa antidepresivna zdravila niso le zdravila za depresijo, histamin ni le snov, ki se privzema v astrocite, in astrociti niso le celice, ki privzemajo histamin, ampak so to entitete, ki delujejo tudi na sistemskem nivoju v zapletenem odnosu z drugimi 'sestavnimi deli' našega živčevja/telesa. Ta vidik se mi zdi enako pomemben kot sami rezultati, saj koščki sestavljanke nimajo smisla, če jih ne vidimo kot delov celote.

7 VIRI

1. Aleouti Y., Petrick JS., Klassen CD. 2005. Tissue distribution and ontogeny of organic cation transporters in mice. *Drug Metabolism and Disposition*, 34: 477-482
2. Štrus J. 2002. Splošna Zoologija. 2. izdaja. Ljubljana, Študentska založba: str 18-19
3. Preusch PC. 2001. Equilibrative and Concentrative Drug Transport Mechanisms. V: *Pharmacology*. Atkinson AJ., Daniels CE., Dedrick RL., Grudzinskas CV., Markey SP. (eds). San Diego, str 201-222
4. Williams DA. 2008. Antidepressants. V: *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. Lemke TL., Roche VF, Zito SW. (eds). Philadelphia. str 547-600
5. Nestler EJ., Hyman SE., Malenka RC. 2001. *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience*. New York, McGraw-Hill Companies, Inc: str 176-211
6. Rang HP., Dale MM., Ritter JM., Flower RJ. 2007. *Rand and Dale's Pharmacology*, 6th edition, Philadelphia, Elsevier Limited: 829 str
7. Gether U., Anderson PH., Larsson OM., Schousboe A. 2006. Neurotransmitter Transporters: Molecular Function of Important Drug Targets. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27: 375-83
8. Koepsel H. 2004. Polyspecific Organic Cation Transporters: Their Functions and Interactions with Drugs. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25: 375-381

9. Koepsel H., Lips K., Volk C. 2007. Polyspecific Organic Cation Transporters: Structure, Function, Physiological Roles and Biopharmaceutical Implications. *Pharmaceutical Research*, 24: 1227-1251
10. Kržan M., Schwartz JP. 2006. Histamine Transport in Neonatal and Adult Astrocytes. *Inflammation Research*, 55: Supplement I: S36-7
11. Kržan M. 2001. Funkcija Astrocitov. *Zdravniški vestnik*, 70: 553-9
12. Osredkar D., Burnik-Papler T., Pečavar B., Kralj-Iglič V., Kržan M. 2008. Kinetic and Pharmacological Properties of [³H]-Histamine Transport into Cultured Type 1 Astrocytes from Neonatal Rats. *Inflammation Research* (poslano)
13. Brown RE., Stevens DR., Haas HL. 2000. The Physiology of Brain Histamine. *Progress in Neurobiology*, 63: 637-672
14. Sakurai E., Sakurai E., Oreland L., Nishiyama S., Kato M., Watanabe T., Yanai K. 2006. Evidence of the Presence of Histamine Uptake into Synaptosomes of Rat Brain. *Pharmacology*, 78: 72-80
15. Yanai K., Tashiro M. 2007. The Physiological and Pathophysiological Roles of Neuronal Histamine: An Insight from Human Positron Emission Tomography Studies. *Pharmacology & Therapeutics*, 113: 1-15
16. Howland RD., Mycek MJ. 2006. *Pharmacology*, 3rd edition, Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins: str 139-47
17. 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
18. Goodwin GM., 2006. Diagnosis. *The Institute Magazine*, 10: 13-5

19. Kandel ER., Schwartz JH., Jessel TM. 2000. Principles of Neural Science. 4th edition. New York, McGraw-Hill: 280-286; 894-895, 1210-26 str
20. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. The Cell. 4th edition. New York, Garland Science: 645 str
21. Randall D., Burggren W., French K. 2002. Eckert Animal Physiology, Mechanisms and Adaptations. 5th edition. New York, W.H. Freeman and Company: 186-94 str
22. Anderson IM., Edwards JG. 2001. Guidelines for Choice of Selective Serotonin Reuptake Inhibitor in Depressive Illness. *Advances in Psychiatric Treatment*, 7: 170-180
23. Reid I., Stewart C., 2001. How Antidepressants Work: New Perspectives on Pathophysiology of Depressive Disorder. *British Journal of Psychiatry*; 178: 299-303.
24. Kališnik M., 2007. Slovenski medicinski slovar, 3. izdaja, Ljubljana, Medicinska fakulteta: str 84
25. Papler T., Pečavar B., 2007. Vpliv antidepressivnih zdravil na privzem histamina v astrocite. Študentsko raziskovalno delo, Medicinska fakulteta
26. Perdan K., Lipnik-Štangelj M., Kržan M. 2008. The Impact of Astrocytes in the Clearance of Neurotransmitters by uptake and inactivation. *Advances in Phospholipid Bilayers and Liposomes* (poslano)
27. Michaelis L., Menten M. 1913. Die Kinetik der Invertinwirkung, *Biochem. Z.* 49:333-369

28. Hugh LB., Khandelwal JK., Green JP. 1982. Ontogeny of Subcellular Distribution of Rat Brain tele-Methylhistamine. *Journal of Neurochemistry*, 38: 1593-9
29. Malberg JE., Eisch AJ., Nestler EJ., Duman RS. 2000. Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat. *Journal of Neuroscience*, 20: 9104-9110
30. Pearce L., Schanberg SM., 1969. Histamine and Spermidine Content in Brain During Development. *Science*, 166: n1301-03
31. Iversen L. 2006. Neurotransmitter Transporters and Their Impact on the Development of Psychopharmacology. *British Journal of Pharmacology*, 147: S82-S87
32. de Esch IJP., Thurmond RL., Jongejan A., Leurs R. 2005. The Histamine H4 Receptor as a new Therapeutic Target for Inflammation, *Trends in Pharmacological Sciences*, 26, 9: 461-469
33. Tavzes M., 2002. Veliki slovar tujk. 1. izdaja. Ljubljana, Cankarjeva založba: str. 786

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof.dr. Mojci Kržan za strokovno vodstvo, pomoč in nasvete ter temeljit pregled diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi tehnični sodelavki Jožici Košir, za pomoč in bdenje nad menoj ob izvajanju poskusov.

Zahvaljujem se Katji Perdan, za pregled diplomskega dela.

PRILOGE

Priloga 1: rokopis prispevka: Nature of histamine transport in neonatal rat cultured type 1 astrocytes – organic cation transporters are not involved;

Prispevek spisan za revijo Inflammation research: Pri prispevku sem sodelovala kot soavtorica.

**Nature of histamine transport in neonatal rat cultured type 1 astrocytes –
organic cationic transporters are not involved**

K. Perdan, Z. Kobe and M. Kržan

Department of Pharmacology and Experimental Toxicology, Faculty of Medicine, University
of Ljubljana, Korytkova, Si-1000 Ljubljana, Slovenia

Corresponding author: Mojca Kržan

Department of Pharmacology and Experimental Toxicology,
Faculty of Medicine

Si-1000 Ljubljana

Slovenia

tel. +386 1 543-7349

fax +386 1 543-7331

e-mail: mojca.limpel@mf.uni-lj.si

Introduction

Astrocytes play a prominent role in the uptake of various neurotransmitters, including histamine [1, 2]. However, a specific histamine transporter has not been elucidated yet and the exact nature of histamine transport into astrocytes remains an unresolved issue. Organic cationic transporters (OCTs), especially OCT3, are involved in handling of monoamines across biologic membranes and their role in histamine transport has been demonstrated in various cell types, e.g. basophils [3, 4]. OCTs, which are expressed both in the brain [5] and in cultured neonatal rat astrocytes [6], could therefore plausibly mediate histamine uptake into astrocytes as well. The aim of our present work was to establish whether OCTs take part in histamine transport into cultured type 1 neonatal rat astrocytes.

Materials and methods

Preparation of astrocyte cell cultures

Astrocyte cultures were prepared from the cortex of 3-day old neonatal Wistar rats as previously described [7] and cultured for at least three weeks. Rats were used in accordance with Permission for Use of Laboratory Animals 323-02-232/2005/2 issued by Veterinary Administration of Republic of Slovenia.

Histamine uptake

Monolayer cultures in 12-well clusters were preincubated for 30 min in uptake buffer (25 mM HEPES, 125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 1.4 mM CaCl_2 , and 5.6 mM glucose, pH 7.4) at 37°C (total uptake) and at 4°C (non-specific uptake). Test compounds, 0.06 mL of decynium-22 and corticosterone in concentration range from 10

nmol/L to 0.5 mmol/L were added and incubated for 20 minutes at 37°C and 4°C before histamine transport was initiated by the addition of 0.125 μ M [3 H]-histamine. After 20 min, the reaction was stopped by placing the dishes into an ice-water bath. The buffer was quickly removed and the dishes were washed twice with ice-cold uptake buffer. The cells were lysed in 0.6 mL of 0.5 M NaOH. 0.5 mL of each sample was transferred to a scintillation vial and the radioactivity was measured. Total protein content was determined in the remaining aliquots by Bio-Rad Protein Assay.

Statistics

The uptake experiments were routinely carried out in triplicates and each experiment was repeated three times. Statistical analysis was carried out using either ANOVA and Bonferroni's *post hoc* test to test for differences between several groups or Student's independent-samples t-test, if only two groups were compared.

Results and discussion

As it was previously shown cultured type 1 astrocytes take up histamine in a time- and concentration-dependant manner by electrodiffusion and active transport [unpublished results]. In order to assess the possible involvement of OCTs in transport of histamine into cultured type 1 astrocytes, we studied the influence of decynium-22 (cationic inhibitor of OCTs) and corticosterone (uncharged inhibitor of OCTs) on the uptake of [3 H]-histamine (125 nM). [3 H]-histamine uptake at 37 °C was not inhibited neither by decynium-22 (Fig. 1) nor corticosterone (Fig. 2). Although [3 H]-histamine transport was maximally reduced to 365 ± 84 fmol/mg protein (decynium-22) and 455 ± 26 fmol/mg protein (corticosterone) (mean \pm SEM), none of the observed differences was statistically

significant compared to control (498 ± 24 fmol/mg protein) (ANOVA). Moreover, decynium-22 did not affect [3 H]-histamine uptake occurring at 4 °C (Fig. 1).

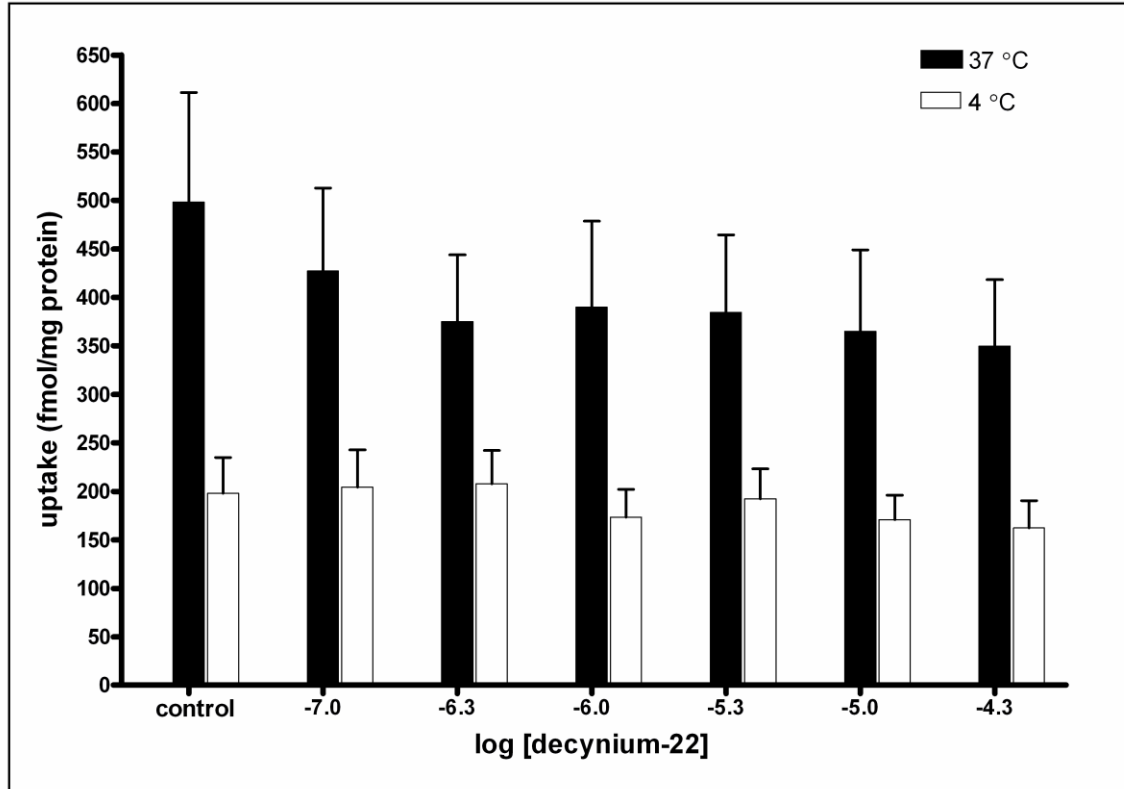


Fig. 1. Influence of OCT-inhibitor decynium-22 on [3 H]-histamine uptake into neonatal cultured rat type 1 astrocytes at 37 °C (black bars) and 4 °C (open bars). Results are presented as mean \pm SEM, $n = 9$. There was no statistical difference between control and treated groups (ANOVA). Differences would be considered significant at $p < 0.05$. The [3 H]-histamine uptake at 4 °C was significantly lower than uptake occurring at 37 °C (ANOVA, Bonferroni t-test, $p < 0.05$)

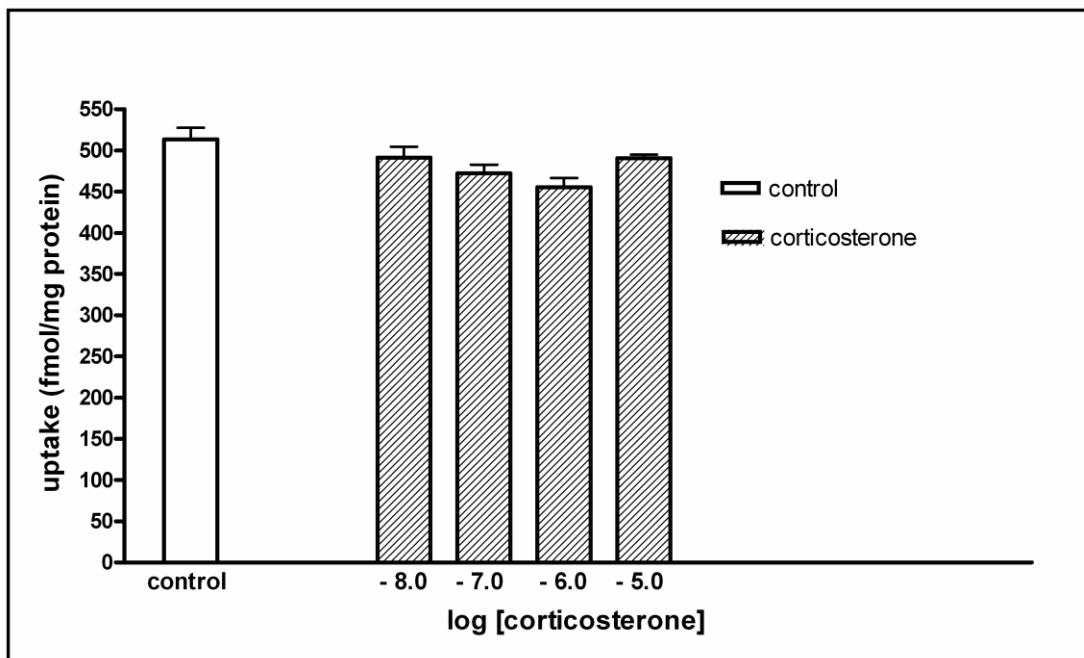


Fig. 2. Influence of corticosterone on [³H]-histamine uptake into cultured neonatal rat type 1 astrocytes at 37 °C. Results are presented as mean ± SEM, n = 9. There was no statistical difference between control (open bar) and treated groups (stripped bars) (ANOVA). Differences would be considered significant at p < 0.05.

These results provide additional evidence that histamine is cleared into cultured astrocytes by an unidentified carrier, which is not OCT.

Acknowledgements: This work was supported by the research grants P3-067 of Ministry of Higher Education, Science and Technology, Republic of Slovenia. We appreciate technical assistance of Jožica Košir.

References

- [1] Huszti Z, Prast H, Tran MH, Fischer H, Philippu A. Glial cells participate in histamine inactivation *in vivo*. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1998; 357: 49-53.
- [2] Kržan M, Schwartz JP. Histamine transport in neonatal and adult astrocytes. Inflamm Res 2006; 55: Supplement I: S36-7.
- [3] Koepsell H, Lips K, Volk C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles and biopharmaceutical implications. Pharm Res 2007; 24:1227-51.
- [4] Schneider E, Machavoine F, Pleau JM, Bertron AF, Thurmond RL, Ohtsu H, et al. Organic cation transporter 3 modulates murine basophil functions by controlling intracellular histamine levels. J Exp Med 2005; 202: 387-93.
- [5] Wu X, Kekuda R, Huang W, Fei YJ, Leibach F, Chen J et al. Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake₂) and evidence for the expression of the transporter in the brain. J Biol Chem 1998; 273: 32776-86.
- [6] Inazu M, Takeda H, Matsumiya T. Molecular and functional characterization of an Na⁺- independent choline transporter in rat astrocytes. J Neurochem 2005; 94: 1427-37.
- [7] Schwartz JP, Wilson DJ. Preparation and characterization of type 1 astrocytes cultured from adult rat cortex, cerebellum and striatum. Glia 1992; 5: 75-80.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Zala KOBE

**VPLIV ANTIDEPRESIVNIH ZDRAVIL NA PRIVZEM
HISTAMINA V ASTROCITE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008