

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASMINA MIS

**PRISPEVEK NESELEKTIVNIH TRANSPORTERJEV PRI  
PRIVZEMU HISTAMINA V ENDOTELIJSKE CELICE  
ČLOVEKA**

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASMINA MIS

**PRISPEVEK NESELEKTIVNIH TRANSPORTERJEV PRI  
PRIVZEMU HISTAMINA V ENDOTELIJSKE CELICE  
ČLOVEKA**

**CONTRIBUTION OF NONSELECTIVE TRANSPORTERS  
TO HISTAMINE UPTAKE INTO HUMAN ENDOTHELIAL  
CELLS**

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

Diplomsko naložbo sem opravljala na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Mojce Kržan, dr. med. in somentorstvom asist. dr. Katarine Černe, univ. dipl. biol.

### Zahvala

Iskrena hvala mentorici prof. dr. Mojci Kržan za vse napotke, spodbudo in vero v moje znanje, asist. dr. Katarini Černe za vodenje celotne diplomske naloge, strokovno pomoč in vse koristne napotke.

Zahvaljujem se tehnični sodelavki Nevenki Dolžan za ves čas in trud, pomoč pri eksperimentalnem delu in prijetno druženje v laboratoriju.

Prisrčna hvala vsem prijateljem, ki so, vsak na svoj edinstven način, pripomogli k nepozabnim študentskim letom ter mi v zabavnih in težkih trenutkih stali ob strani.

Največja zahvala gre moji družini, ki so mi omogočili študij, verjeli vame in me podpirali na vsakem koraku. Še posebno pa toda raba Yanivu za nenehno vzpodbudo, potrežljivost in neskončno zaupanje vame.

### Izjava

**Izjavljam, da sem diplomsko naložbo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Mojce Kržan, dr. med. in somentorstvom asist. dr. Katarine Černe, univ. dipl. biol.**

Jasmina Mis

Predsednik komisije: prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm.

Član diplomske komisije: asist. dr. Bojan Doljak, mag. farm.

# KAZALO VSEBINE

<b>1 UVOD .....</b>	1
1.1 HISTAMIN .....	1
1.2 BIOSINTEZA HISTAMINA .....	2
1.3 SPROŠČANJE HISTAMINA .....	3
1.4 FARMAKOLOŠKO DELOVANJE HISTAMINA .....	4
1.5 UČINKI RAZLIČNIH KONCENTRACIJ HISTAMINA V PLAZMI IN V KRVI NA PATOLOŠKE REAKCIJE PRI LJUDEH .....	6
1.6 INAKTIVACIJA HISTAMINA .....	7
1.6.1 Encimska razgradnja .....	7
1.6.2 Načini prehajanja snovi skozi biološko membrano .....	9
1.6.3 Monoaminski transporterji .....	12
1.6.4 Privzem histamina v celice .....	16
1.6.5 Privzem histamina v HUVEC .....	17
1.7 ENDOTELNE CELICE IZ POPKOVNIČNE VENE ČLOVEKA .....	21
<b>2 NAMEN DELA .....</b>	22
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	23
3.1 MATERIALI .....	23
3.2 METODE .....	24
3.2.1 POPKOVNICA .....	24
3.2.2 IZOLACIJA PRIMARNIH ENDOTELNIH CELIČNIH KULTUR IZ POKOVNIČNE VENE ČLOVEKA .....	25
3.2.3 TRIPSINIZACIJA ENDOTELNIH CELIČNIH KULTUR IZ POPKOVNIČNE VENE ČLOVEKA .....	26
3.2.4 PRIVZEM HISTAMINA V ENDOTELNE CELICE POKOVNIČNE VENE ČLOVEKA .....	26
3.2.5 DOLOČEVANJE PROTEINOV .....	27
3.2.6 ANALIZA PODATKOV .....	28
<b>4 REZULTATI .....</b>	29
4.1 VPLIV $\text{Na}^+$ IN OUABAINA NA PRIVZEM HISTAMINA V HUVEC .....	29
4.2 VPLIV MONOAMINOV NA PRIVZEM HISTAMINA V HUVEC .....	33
<b>5 RAZPRAVA .....</b>	40

5.1	Ugotavljanje aktivnega in/ali pasivnega transporta s prenašalcji pri privzemu histamina v HUVEC .....	41
5.2	Vpliv monoaminov na privzem histamina v HUVEC .....	42
<b>6</b>	<b>SKLEP</b> .....	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>VIRI IN LITERATURA</b> .....	<b>46</b>

# KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Struktura histamina.....	1
<b>Slika 2:</b> Tvorba histamina iz aminokisline L-histidin z encimom L-histidin dekarboksilazo (HDC) .....	3
<b>Slika 3:</b> Degranulacija mastocita .....	4
<b>Slika 4:</b> Biotransformacija histamina.....	9
<b>Slika 5:</b> Pasivni transport s prenašalc i aktivni transport.....	11
<b>Slika 6:</b> Primerjava transportne in membranske hipoteze pri privzemu histamina v endotelijске celice. ....	16
<b>Slika 7a:</b> Povečanje privzema $^3\text{H}$ -histamina v HUVEC ob prisotnosti 20% FCS oz. 1 U/mL DAO v pufru za privzem .....	19
<b>Slika 7b:</b> Koncentracijska odvisnost privzema $^3\text{H}$ -histamina v HUVEC ob prisotnosti 20% FCS oz. 1 U/mL DAO v pufru za privzem.....	20
<b>Slika 8:</b> Endotelne celice iz popkovnične vene človeka .....	21
<b>Slika 9:</b> Popkovnica .....	24
<b>Slika 10:</b> Vpliv $\text{Na}^+$ in ouabaina na privzem $^3\text{H}$ - histamina v HUVEC .....	30
<b>Slika 11:</b> Vpliv $\text{Na}^+$ in ouabaina na privzem $^3\text{H}$ - histamina v HUVEC ob prisotnosti 20% FCS.....	31
<b>Slika 12:</b> Vpliv $\text{Na}^+$ in ouabaina na privzem $^3\text{H}$ - histamina v HUVEC ob prisotnosti 1U/mL DAO .....	32
<b>Slika 13:</b> Vpliv 1mM dopamina na privzem $^3\text{H}$ -histamina v HUVEC ob prisotnosti 20% FCS, 1U/mL DAO in v pufru A1 brez FCS in DAO. ....	34
<b>Slika 14:</b> Vpliv 1 mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 1000 nM, 10 nM, 0,1 nM dopamina na privzem $^3\text{H}$ -histamina v HUVEC .....	35
<b>Slika 15:</b> Vpliv 1mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 1000 nM, 10 nM, 0,1 nM dopamina na privzem $^3\text{H}$ -histamina v HUVEC ob prisotnosti 1U/ml DAO. ....	36
<b>Slika 16:</b> Vpliv 1mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 1000 nM, 10 nM, 0,1 nM dopamina na privzem $^3\text{H}$ -histamina v HUVEC ob prisotnosti 20% FCS. ....	37
<b>Slika 17:</b> Vpliv 1mM, 0,1 mM serotonin na privzem $^3\text{H}$ -histamina v HUVEC ob prisotnosti 20% FCS.....	38
<b>Slika 18:</b> Vpliv 1mM noradrenalina na privzem $^3\text{H}$ -histamina v HUVEC ob prisotnosti 20% FCS .....	39

# KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica I:</b> Povzetek pomembnih karakteristik histaminskih receptorjev .....	5
<b>Preglednica II:</b> Učinek različnih plazemskih koncentracij histamina na patološke reakcije pri ljudeh .....	6
<b>Preglednica III:</b> Patološki procesi in zapleti nosečnosti pri povečanju koncentracije histamina v krvi od referenčnih vrednosti .....	7
<b>Preglednica IV:</b> Specifičnost različnih substratov in inhibitorjev na nevronske monoaminske transporterje .....	12
<b>Preglednica V:</b> Razlika v specifičnosti substratov/inhibitorjev pri nenevronskih monoaminskih transporterjih.....	15
<b>Preglednica VI:</b> Michaelisova-Montonova konstanta (KM) in maksimalna hitrost (V <sub>max</sub> ) privzema <sup>3</sup> H-histamina v HUVEC po 5 ali 45 min inkubacije. ....	20

## POVZETEK

Histamin ima izven osrednjega živčevja ključno vlogo kot mediator vnetja in imunskih reakcij. Po sprostitvi histamina v krvni obtok se ta zelo hitro odstrani. Povišana plazemska koncentracija histamina v žilnem sistemu vpliva na prepustnost kapilar in na tonus gladkih mišic direktno ali preko endotelija, pri daljši izpostavljenosti endotelnih celic histaminu pa deluje proaterogeno. Že majhna odstopanja od referenčnih vrednosti v krvi lahko izzovejo patološke procese, med drugimi povečano nastajanje želodčne kisline, znižanje arterijskega tlaka ali celo zastoj srca. Tudi med nosečnostjo lahko histamin sproži različne zaplete, kot so preeklampsija, nezadržno bruhanje nosečnic ali celo spontani splav. Zato so pomembni vsi mehanizmi, ki sodelujejo pri njegovi inaktivaciji. Pri inaktivaciji histamina s privzemom sodelujejo tudi endotelne celice s privzemom histamina. Histamin je edini monoamin, ki še nima znanega selektivnega prenašalca, zato je mehanizem njegovega privzema v celico še neznanka.

V diplomskem delu so nas zanimale nekatere značilnosti privzema histamina v endotelne celice popkovnične vene človeka (HUVEC). Želeli smo ugotoviti prispevek neselektivnih transporterjev, kot so organski kationski transporterji (OCT) in plazmalemski transporter za monoamine (PMAT), na privzem. Pri poskusih smo primarne kulture HUVEC inkubirali s  $^3\text{H}$ -histaminov 45 min pri 37 °C v pufrih z različno sestavo. Količino privzetega  $^3\text{H}$ -histamina smo izmerili s tekočinsko scintilacijskim števcem. Glede na to, da na privzem histamina v HUVEC vplivata tako serum kot zunajcelična diamin-oksidaza (DAO), smo večino poskusov naredili v treh različnih sistemih. V prvem smo celice inkubirali v pufru za privzem z dodanim fetalnim telečim serumom (FCS), v drugem z dodanim DAO in v tretjem brez dodanega FCS in DAO. Vpliv aktivnega transporta na privzem histamina smo preverili z inkubacijo kulture HUVEC v pufru brez  $\text{Na}^+$  in s pomočjo ouabaina, inhibitorja  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, ki smo ga dodali v inkubacijsko tekočino. Da bi še dodatno preverili prispevek neselektivnih transporterjev OCT in PMAT, smo kulture HUVEC inkubirali z drugimi monoamini (dopaminom, serotoninom in noradrenalinom), ki so znani substrati/inhibitorji OCT in PMAT pri drugih vrstah celic. Ugotavljalci smo njihov vpliv na privzem pri različnih koncentracijah, in sicer z 1 mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 1000 nM, 10 nM, 0,1 nM dopaminom, z 1 mM, 0,1 mM serotoninom in z 1 mM noradrenalinom. Rezultati raziskav kažejo, da privzem histamina v HUVEC poteka preko več mehanizmov. Odvisnost od zunajceličnega  $\text{Na}^+$  ob prisotnosti FCS lahko nakazuje vpletene sekundarne aktivne transportne mehanizme, saj smo

s pomočjo ouabaina izključili možnost mehanizma privzema s primarnim aktivnim transportom. V prisotnosti FCS ali zunajceličnega DAO se mehanizmi privzema tudi različno izrazijo. Privzem ob prisotnosti FCS kaže značilnost transporta preko OCT2 ali OCT3 ali PMAT, kot so inhibicija privzema z dopaminom, serotoninom in noradrenalinom. Inhibicija privzema histamina z dopaminom ob prisotnosti DAO pa nakazuje verjetnost privzema histamina še preko drugih načinov privzema s pomočjo drugih transporterjev.

Lahko rečemo, da je privzem histamina v HUVEC kompleksen. Nanj vplivajo različne komponente in mehanizmi, ki se različno izrazijo v odvisnosti od FCS in DAO v zunajceličnem okolju.

*Ključne besede:* histamin, HUVEC, neselektivni transporterji, privzem

## ABSTRACT

Histamine is one of the many mediators involved in allergic inflammatory responses. After histamine has been released into the blood, it disappears very fast from the circulation. Histamine has the ability to greatly increase capillary permeability. The effects of histamine in vascular system are complex and result from a direct action on smooth muscle cells (vasoconstriction) and indirect action, via substances produced by endothelium, like NO. However, there is evidence for pro-atherogenic effects of histamine. If plasma histamine concentration exceeds normal level, it may induce pathological reactions as increased gastric acid secretion, hypotension and heart failure. Elevation of blood histamine during pregnancy can cause complications like preeclampsia, hyperemesis gravidarum (irrepressible vomiting) or even abortion. That is why, all the histamine inactivation mechanisms are so important. The endothelial cells can participate in histamine clearance by promoting its rapid uptake via yet unidentified transport system(s).

In research we studied the uptake mechanisms of histamine into human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Our purpose was to confirm the contribution of nonselective transporters and with that to confirm eventual involvement of organic cation transporters (OCT) and plasma membrane monoamine transporter (PMAT) in this process.

In our experiments the confluent HUVEC monolayers were incubated with  $^3\text{H}$ -histamine for 45 min at 37 °C in different uptake buffers. The radioactivity of  $^3\text{H}$ -histamine was measured with a liquid scintillation counter. The experiments were made in three different systems: 1. in the presence of fetal calf serum (FCS); 2. in the presence of diamine oxidase (DAO) and 3. in the absence of FCS and DAO. The influence of active transport on the uptake was examined by incubating HUVEC in buffer with absence of  $\text{Na}^+$  and by incubating HUVEC with ouabain (inhibitor of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATP). For testing whether OCTs and PMAT are involved in the clearance of histamine by HUVEC we incubated them with dopamine in a concentration range from 1000 nM to 1 mM, with serotonin (1 mM and 0,1 mM) and with noradrenaline (1 mM).

The results of experiments are showing that histamine is taken up into HUVEC by many uptake mechanisms.

As we proved with ouabain, there is no influence of primary active transport on histamine uptake into HUVEC. Dependence of the histamine uptake on extracellular  $\text{Na}^+$  proves that beside this uptake mechanism also secondary active transport might be involved.

In the presence of FCS or exogenous DAO the uptake mechanisms express and/or recover differently. The uptake in the system with added FCS shows some characteristics of transport by OCT2 or OCT3 or PMAT like for an example dependence on uptake inhibition by dopamine, serotonin and noradrenaline. Dependence on uptake inhibition by dopamine in the system with added DAO doesn't show characteristics of OCTs and PMAT.

In conclusion we can say that histamine uptake into HUVEC is complex and includes different components, which are differently expressed in dependence of FCS and DAO in extracellular environment.

*Keywords:* histamine, HUVEC, nonselective transporters, uptake

## **SEZNAM OKRAJŠAV**

- ATP – adenozin-5'-trifosfat
- cAMP – ciklični adenozin-3',5'-monofosfat
- cGMP – ciklični gvanozin-3',5'-monofosfat
- DA – dopamin
- DAG – diacilglicerol
- DAO – diamin-oksidaza
- DAT – prenašalec za dopamin
- E – adrenalin
- EDTA – etilendiaminetetraacetilna kislina
- ENT – (equilibrative nucleoside transporter) transporter, ki uravnotežuje nukleozide
- FCS – (fetal calf serum) fetalni telečji serum
- GIT – gastrointestinalni trakt
- HDC – histidin-dekarboksilaza
- HNMT – histamin-N-metiltransferaza
- HUVEC – (human umbilical vein endothelial cells) endotelne celice iz popkovnične vene človeka
- MAO B – monoamin-oksidaza B
- MIAA – (methylimidazoleacetic acid) 1-metil-4-imidazolacetilna kislina
- MPP<sup>+</sup> – 1-metil-4-fenilpiridin
- mRNA – informacijska ribonukleinska kislina
- NE – noradrenalin
- NET – prenašalec za noradrenalin
- NO – dušikov oksid
- NOS – NO-sintaza
- NSRI – inhibitorji ponovnega privzema noradernalina in serotoninina
- OCT – (organic cation transporter) organski kationski transporter
- PGI<sub>2</sub> – prostaciklin
- PKC – protein-kinaza C
- PLA<sub>2</sub> – fosfolipaza A<sub>2</sub>
- PMAT – ( plasma membrane monoamine transporter) plazmalemski transporter za monoamine

PŽS – periferni živčni sistem

RT-PCR – reverzna transkripcija z verižno reakcijo s polimerazo

SEM – standardna napaka aritmetične sredine

SLC – (solute carrier) transporter, ki sodeluje pri olajšanem transport

SLC22A – družina transporterjev za olajšano difuzijo, ki vključuje organske kationske, dodatne organske kationske in organske anionske transporterje

SNRI – selektivni inhibitor ponovnega privzema noradrenalina

SSRI – selektivni inhibitor ponovnega privzema serotoninina

TEA – tetraethylamonijev bromid

VMAT – (vesicular monoamine transporters) vezikularni monoaminski transporterji

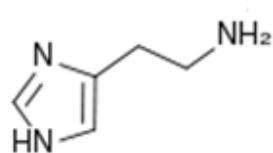
5HT – serotonin

# 1 UVOD

Histamin je biogeni amin, ki je prisoten v večini telesnih tkiv in igra pomembno vlogo tako pri fizioloških kot tudi pri patofizioloških procesih. S sproščenim histaminom v krvnem obtoku imajo poleg krvnih celic prvi stik tudi endotelne celice (1-5). Pri daljši izpostavljenosti endotelnih celic histaminu obstajajo dokazi o njegovem proaterogenem učinku. Histamin med drugim poviša izražanje adhezijskih molekul endotelnih celic in s tem okrepi interakcije med levkociti in endotelijem ter poveča proliferacijo gladkih mišičnih celic in njihovo migracijo (6). Znano je, da se histamin v razmerah *in vivo* zelo hitro odstrani iz krvnega obtoka. Njegov razpolovni čas v krvi je od 0,5 do 2 min. Del te inaktivacije naj bi prevzele endotelne celice. O mehanizmih inaktivacije histamina na nivoju endotelnih celic obstaja zelo malo raziskav in do sedaj so tovrstne raziskave potekale tudi na endotelnih celicah iz popkovnične vene človeka (HUVEC) (1-4, 7). Privzem v celice je tesno povezan z encimsko razgradnjo in nanj vplivajo številne endogene substance (1-3). Transportni sistem, ki je odgovoren za privzem, poteka s pomočjo organskih kationskih transporterjev (OCT) in s pomočjo plazmalemskega transporterja za monoamine (PMAT), saj je decinij 22, specifični inhibitor OCT (7) in PMAT (8), zmanjšal privzem histamina v HUVEC. Verjetno je v privzem vpletenih več mehanizmov.

## 1.1 HISTAMIN

Histamin je endogena hidrofilna molekula iz 17 atomov, ki sta jo leta 1910 odkrila znanstvenika Dale in Laidlaw (9). Kemijsko je 2-(imidazol-4-il) etilenamin, v strukturi vsebuje alifatski primarni amin ( $pK_a=9,4$ ) in imidazol ( $pK_a=5,8$ ) (Slika 1).



Slika 1: Struktura histamina (Povzeto po 10)

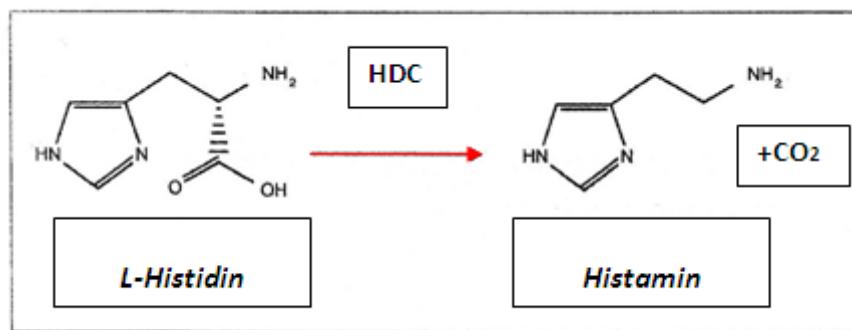
Molekula histamina ima dva bazična centra. Pri fiziološkem pH se nahaja v ravnotežni zmesi različnih oblik - monokation je zastopan v več kot 96%, dikation v približno 3%, zelo majhen delež pa predstavlja neprotonirana oblika. Biološko aktivni sta najverjetneje obe protonirani oblici (10, 11).

V telesu se večina histamina nahaja v veziklih mastocitov (v koži, sluznici dihal, prebavilih in izločalih ter tkivih v neposredni bližini krvnega in limfatičnega obtoka), bazofilcev in trombocitov. Ostali histamin je shranjen v enterokromafinih celicah želodca in v možganih, kjer ima vlogo nevrotransmitorja (9, 10).

Histamin posreduje številne učinke v organizmu, ki so odvisni od tkiva ter podtipa receptorja ( $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$  in  $H_4$ ), na katerega se veže histamin. Izven osrednjega živčevja ima ključno vlogo kot mediator vnetja, saj vnetni dražljaj sproži degranulacijo mastocitov in sprostitev histamina v kri. Tam se veže na receptorje  $H_1$  gladkih mišic in endotelijskih celic žil in povzroči razširjanje žil, povečano prepustnost žil in posledično izločanje sluzi, krčenje gladkih mišičnih celic in v večjih koncentracijah lahko tudi vzdraženje bolečinskih živčnih vlaken in s tem bolečino. Preko receptorjev  $H_2$  v gladkih mišicah povzroči relaksacijo gladkih mišic maternice. Sodeluje pri oblikovanju imunskega odgovora pri alergijskih reakcijah, povzroča alergijski rinitis, urtikarijo in ima pomembno vlogo pri anafilaktičnem šoku. Z vezavo na receptorje  $H_2$  v srcu povzroči motnje srčnega ritma, v želodcu pa stimulira izločanje želodčne kisline. Poleg perifernih učinkov ima histamin pomembno vlogo tudi v osrednjem živčevju kot prešalec, pri tvorbi krvnih celic, celjenju ran, ritmu dan in noč, črevesni ishemiju in pri uravnavanju s histaminom in drugimi poliamini stimulirane celične proliferacije in angiogeneze v modelih tumorjev (9, 11, 12).

## 1.2 BIOSINTEZA HISTAMINA

Tvorba histamina v telesu nastaja v Golgijem v aparatu z dekarboksilacijo aminokisline L-histidina pod katalitičnem vplivom encima histidin-dekarboksilaze (HDC), ki vsebuje koencim piridoksal fosfat (vitamin  $B_6$ ). Encim prekine močno kovalentno vez med dvema ogljikoma in sprosti se ogljikov dioksid (13) (Slika 2). Biosinteza poteka v mastocitih, bazofilcih, trombocitih, histaminergičnih nevronih in enterokromafinih celicah (9, 13, 14).



**Slika 2:** Tvorba histamina iz aminokisline L-histidin z encimom L-histidin dekarboksilazo (HDC)  
(Povzeto po 5)

Pri raziskavah so ugotavljali prisotnost histamina v endoteljiskih celicah s pomočjo aktivnosti HDC. Potrdili so prisotnost histamina v endotelijskih celicah aorte človeka (13) in pa v endotelijskih celicah pri številnih vrstah, in sicer v aorti goveda (15), podgane (16) in žabe (17), v mikrovaskularnih endotelijskih celicah podgan in buder (18) ter v človeški (19, 22) in zajčji popkovnični veni (21). Ta histamin je verjetno vpletен v lokalno regulacijo in funkcijo žil.

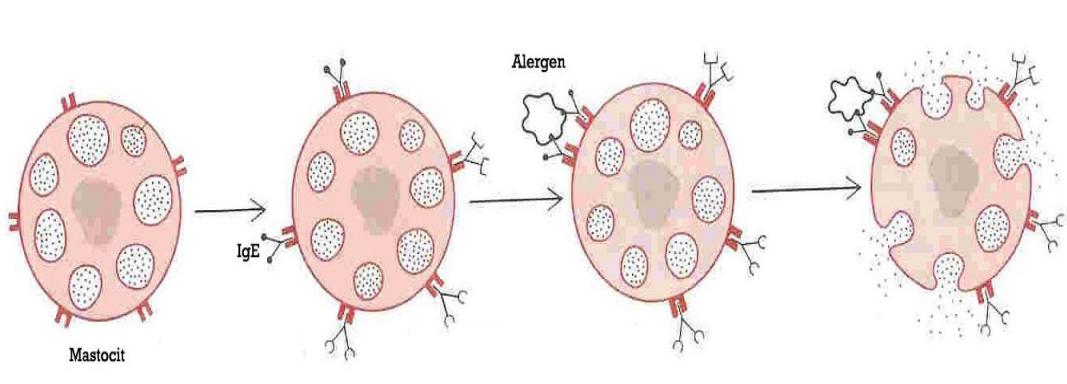
Iz endoteljiskih celic podganje aorte, ki dokazano nima prisotnih mastocitov, so s pomočjo molekule, ki prenaša ione preko celične membrane (ionofor A23187) stimulirali sproščanje histamina. S to raziskavo so potrdili prisotnost histamina in s tem verjetno tudi njegovo sintezo znotraj endotelijskih celic (12).

Pri drugi raziskavi so potrdili prisotnost histamina kar na 40% endoteljiskih celic popkovnične vene (HUVEC) in na 2% endotelijskih celic popkovnične arterije človeka (22).

### 1.3 SPROŠČANJE HISTAMINA

Sproščanje histamina, ki je shranjen znotraj celic v veziklih, stimulirajo različni dejavniki. Poznamo dva tipa stimulacije (9):

- **Imunološka:** specifičen antigen se veže na imunoglobulin IgE, nastali kompleks pa se nato veže na številne receptorje na površini mastocitov. Nato se preko aktivacije proteina G sproži eksocitoza granul, v katerih so shranjeni številni mediatorji, med njimi tudi histamin (Slika 3)
- **Neimunološka:** izločanje histamina pa lahko povzročijo tudi fragmenti komplementa (C3a,C4a, C5a), citokini (interlevkin-1, interlevkin-3), nevropeptidi (nevropeptid Y, substanca P), nevrotransmitorji (adrenalin, serotonin, dopamin), različna zdravila (tubokurarin, sukcinilholin, morfin, vankomicin) ter določene razmere v organizmu (hipoksija, hiperosmolarnost, travma, mehanske poškodbe tkiva) (10).



**Slika 3: Degranulacija mastocita**

(Povzeto po: <http://citologia0910.wikispaces.com/Esther>, dostop 6.12.2010)

## 1.4 FARMAKOLOŠKO DELOVANJE HISTAMINA

Učinek histamina se pokaže po vezavi na specifične histaminske receptorje ( $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$ ,  $H_4$ ), ki se nahajajo na membranah celic. Vsi spadajo med receptorje s sedmimi transmembranskimi domenami in so skopljeni z G- proteinsko signalno potjo (11). V HUVEC so z RT-PCR našli mRNA za  $H_1$  in  $H_2$  receptor (6).

V krvožilnem sistemu sproščeni histamin deluje posredno na gladke mišične celice v steni žil s sproščanjem substanc iz endotelnih celic in pa neposredno ter s tem vpliva na tonus žil. Posledica njegovega delovanja je znižanje sistoličnega in diastoličnega arterijskega

tlaka. Vezava histamina na receptorje H<sub>1</sub> na gladkih mišičnih celicah aktivira fosfolipazo C (PLC) in s tem povzroči povečanje koncentracije fosfatidilinozitol-4,5-difosfata (PIP<sub>2</sub>), ki se razcepi v inozitol-1,4,5-trifosfat (IP<sub>3</sub>) in diacilglicerol (DAG). IP<sub>3</sub> povzroči povišanje znotrajcelične koncentracije Ca<sup>2+</sup>, DAG pa aktivacijo protein-kinaze C (PKC). To povzroči krčenje gladkih mišic. Preko receptorjev H<sub>2</sub> na gladkih mišičnih celicah pa pride do porasta cAMP in posledično relaksacije gladkih mišic.

Vezava histamina na receptorje H<sub>1</sub> na endotelnih celicah aktivira fosfolipazo A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) in sprosti arahidonsko kislino. V nadaljnji presnovi pride do sinteze prostaciklinov (PGI<sub>2</sub>). Poleg PGI<sub>2</sub> nastaja tudi dušikov oksid (NO) s pomočjo endotelne NO-sintaze (eNOS), ki jo aktivira histamin preko H<sub>1</sub> receptorja na endotelnih celicah. Sproščena PGI<sub>2</sub> in NO iz endotelnih celic relaksirata gladke mišice preko nastanka cGMP in cAMP v gladkih mišičnih celicah (1, 6).

**Preglednica I: Povzetek pomembnih karakteristik histaminskih receptorjev** (Povzeto po 10, 11)

RECEPTOR	IZRAŽANJE V TKIVIH	GLAVNI UČINKI
H <sub>1</sub>	gladke mišice (žil, prebavnega trakta, dihalnih poti) endotelijске celice sredica nadledvične žlez srce imunske celice osrednji živčni sistem	vazodilatacija povečana prepustnost žil kontrakcija gladkih mišic emetični učinek vzdrževanje budnosti
H <sub>2</sub>	gladke mišice (žil, maternice) parietalne celice želodca imunske celice srce osrednji živčni sistem	stimulacija nastajanja HCl relaksacija gladkih mišic pozitivni inotropni in kronotropni učinek vloga pri učenju in spominu
H <sub>3</sub>	periferni živčni sistem osrednji živčni sistem srce pljuča	zmanjšano sproščanje nevrotransmitorjev (histamin, acetilholin, noradrenalin, serotonin)
H <sub>4</sub>	levkociti, mastociti pljuča jetra vranica tanko in debelo čревo	vloga pri vnetju in kemotaksi

Učinke histamina preko aktivacije specifičnih receptorjev se že uspešno izkorišča pri zdravilih. Antagonisti receptorjev H<sub>1</sub> se uporablajo za lajšanje simptomov pri alergijskih reakcijah (kihanje, rdečica, srbenje, solzenje, oteklost) in kot antiemetiki pri potovalni bolezni. Kot stranski učinek se pojavlja sedacija, vendar je ta z razvojem novejših generacij antihistaminikov prisotna le v majhni meri. Antagonisti receptorjev H<sub>2</sub> pa se uporabljajo kot zdravila za zmanjšanje izločanja želodčne kisline pri želodčnih razjedah in tovrstnih težavah (10).

## 1.5 UČINKI RAZLIČNIH KONCENTRACIJ HISTAMINA V PLAZMI IN V KRVI NA PATOLOŠKE REAKCIJE PRI LJUDEH

Območje normalne koncentracije histamina v plazmi je od 1 do 10 nM. Ob ustreznem dražljaju pa lahko njegova koncentracija preseže normalno vrednost in sproži patološke reakcije (9) (Preglednica II).

**Preglednica II:** Učinek različnih plazemskih koncentracij histamina na patološke reakcije pri ljudeh  
(Povzeto po 9)

KONCENTRACIJA [nM]	UČINEK
< 9	-
9 -18	povečano nastajanje želodčne kisline
27-45	povečanje srčne frekvence
54-72	znižanje arterijskega tlaka
63-108	bronhokonstrikcija
približno 900	zastoj srca

Koncentracija histamina v krvi se poveča pri nosečih ženskah, saj je takrat histamin pomemben za rast celic v zarodku. Odstopanja od referenčnih koncentracij histamina v krvi lahko izzovejo patološke procese in zaplete nosečnosti (preeklampsija, nezadržno

bruhanje, prezgodnji porod, prekinitev posteljice, grozeči ali spontani splav) (23) (Preglednica III).

**Preglednica III:** Patološki procesi in zapleti nosečnosti pri povečanju koncentracije histamina v krvi od referenčnih vrednosti (povzeto po 23)

KONCENTRACIJA [nM]	UČINEK
<b>470 ± 109,8</b> (normalna koncentracija pri zdravem odraslem človeku)	-
<b>500,94 ± 1,611</b> (normalna koncentracija pri nosečih ženskah)	-
<b>567,3-786,1</b> -	preeklampsija nezadržno bruhanje
<b>706,9 ± 294,5</b>	prezgodnji porod
<b>&lt;/= 225-315</b> -	prekinitev posteljice grozeči ali spontani splav

## 1.6 INAKTIVACIJA HISTAMINA

### 1.6.1 Encimska razgradnja

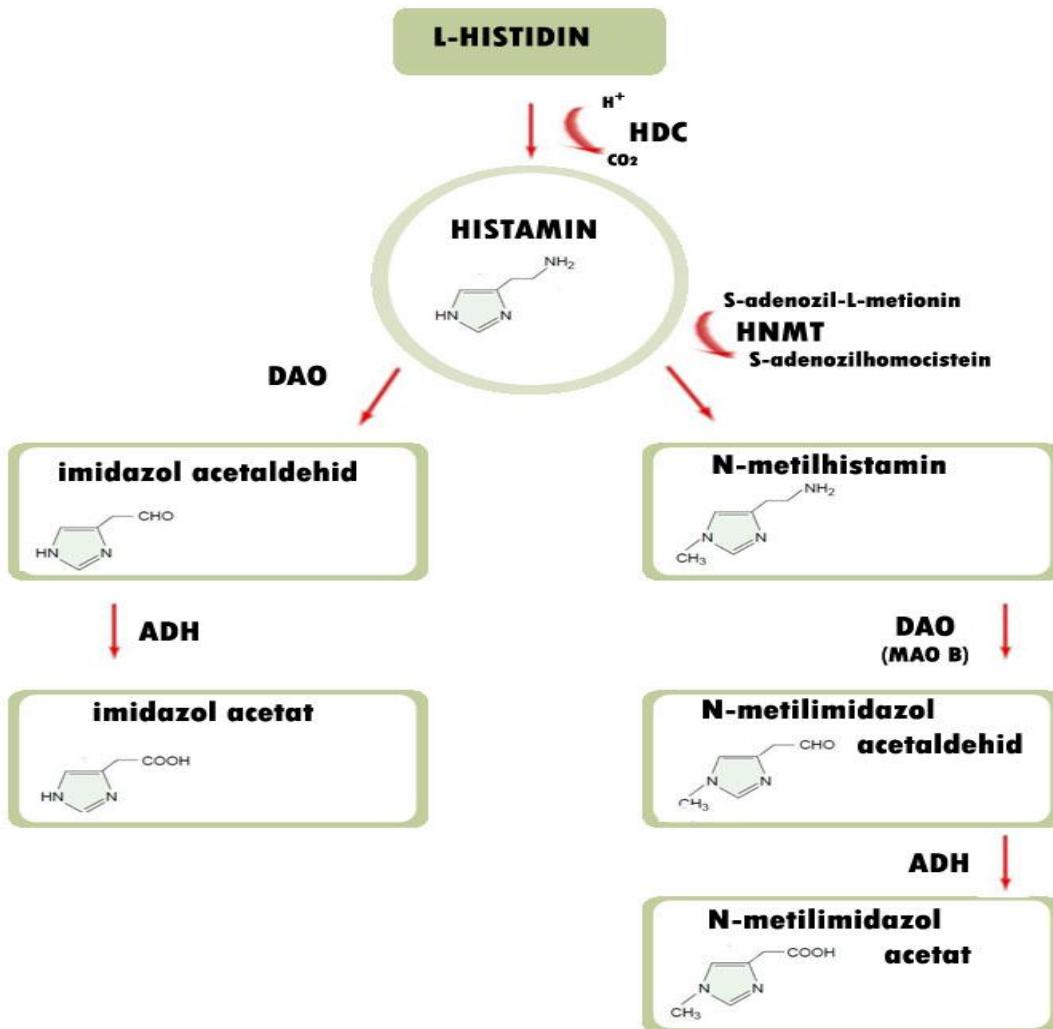
Encimska razgradnja poteka po dveh glavnih poteh, ki sta odvisni od mesta sprostiteve histamina.

1.pot: Oksidativna deaminacija primarne amino skupine histamina z molekularnim kisikom poteče pod vplivom encima **diamin oksidaza** (DAO). To povzroči nastanek imidazol acetaldehyda. V nadaljnji presnovi pa encim **aldehid-dehidrogenaza** (ADH) pretvori imidazol acetaldehid v imidazol acetat (3, 9, 10, 18) (Slika 4). Ta pot poteka predvsem v zunajceličnem prostoru, saj so pri poskusih v HUVEC, kjer so določili metabolit v celici, ugotovili, da DAO ni prisoten v znotrajceličnem prostoru. Ob prisotnosti eksogenega DAO, so v celicah določili metabolit N-metilimidazol acetat, kar pomeni, da

oksidativna deaminacija ni potekala neposredno, ampak preko nastanka N-metilhistamina (1, 2). Encim DAO je shranjen v veziklih sklopljenih s plazemsko membrano epitelnih celic in se sprošča v krvni obtok po ustrezni stimulaciji. Prisoten je le v določenih tkivih, najbolj se izraža v črevesju, ledvicah in posteljici. Našli so ga tudi v telesnih tekočinah in sicer v plazmi nosečnic, limfi in semenski tekočini ( 10, 24).

2.pot : Reakcijo metilacije na dušikov atom v imidazolskem obroču histamina katalizira encim **histamin-N-metiltransferaza** (HNMT). Donor metilne skupine je S-adenozil-L-metionin. Nastane neaktivni N-metilhistamin, katerega primarni amin nato oksidativno deaminira DAO ali **monoamin-oksidaza B** (MAO B) v N-metilimidazol acetaldehid. S pomočjo ADH pa nato nastane končni produkt N-metilimidazol acetat (Slika 4).

HNMT v primerjavi z DAO nastaja v citosolu in vpliva na znotrajcelični histamin. Prisoten je v mnogih tkivih, v večjih koncentracijah pa predvsem v ledvicah, jetrih, vranici, debelem črevesju, prostatni, jajčnikih, hrbtenjači. Prisoten je tudi v citosolu HUVEC, kar so dokazali z določanjem N-metilhistamina v celicah z inhibitorjem HNMT, ki je za vrl nastanek metabolita (9, 24).



Slika 4: Biotransformacija histamina (Pov zeto po 9)

### 1.6.2 Načini prehajanja snovi skozi biološko membrano

Skozi membrano neprestano poteka prenos snovi. Plazmalema je selektivna membrana, zato skoznjo snovi večinoma ne prehajajo prosti. Poglavitni načini prehajanja snovi skozi membrano so *difuzija*, *osmoza*, *več vrst transportov s pomočjo prenašalcev* ter *prenos snovi z membranskimi mešički* (25).

- **Difuzija** majhnih in/ali nepolarnih molekul skozi membrano poteka pretežno v smeri od področja z večjo koncentracijo proti področju z manjšo koncentracijo snovi. Gre za enostaven, termično ugoden prenos, kjer se energija ne porablja (25) (Slika 5).
- **Osmoza** označuje prehajanje vode skozi semipermeabilno membrano (omejuje prehajanje topljencev) zaradi razlik v koncentraciji topljencev med predelki. Molekule vode prehajajo iz področja z manjšo koncentracijo topljencev v področje z večjo koncentracijo topljencev (25).
- **Prenašalci** so membranski proteini, ki preko celične membrane prenašajo različne molekule, netopne v lipidnem dvosloju. Za ta proces sta značilna specifičnost (prenašalci vežejo samo določene molekule) in nasičenost (pri veliki koncentraciji bodo zasedena vsa prosta mesta za prenos). Prenos substrata na drugo stran membrane poteka s pomočjo konformacijske spremembe prenašalnega proteina. Za to sta potrebna koncentracijski gradient ali energija v obliki molekule ATP. Hitrost prehajanja snovi je odvisna od gostote prenašalcev v membrani in od koncentracije snovi, ki se prenaša (25).

Prenos s pomočjo prenašalcev delimo na:

**PASIVNI TRANSPORT** s prenašalci oz. **olajšana difuzija** je pasivni prenos snovi z membranskimi prenašalci, saj se energija pri tem ne porablja. Prenos izkorišča koncentracijski gradient (iz področja z višjo koncentracijo v področje z nižjo koncentracijo) in električni potencial (olajšan prehod kationov iz pozitivno nabite zunanjosti v negativno nabito notranjost). V primerjavi z difuzijo poteka hitreje in je bolj specifična. Omogoča uniport (prenašanje ene snovi), simport (prenašanje dveh snovi v isto smer) in antiport (prenašanje dveh snovi v nasprotno smer) snovi (25) (Slika 5)

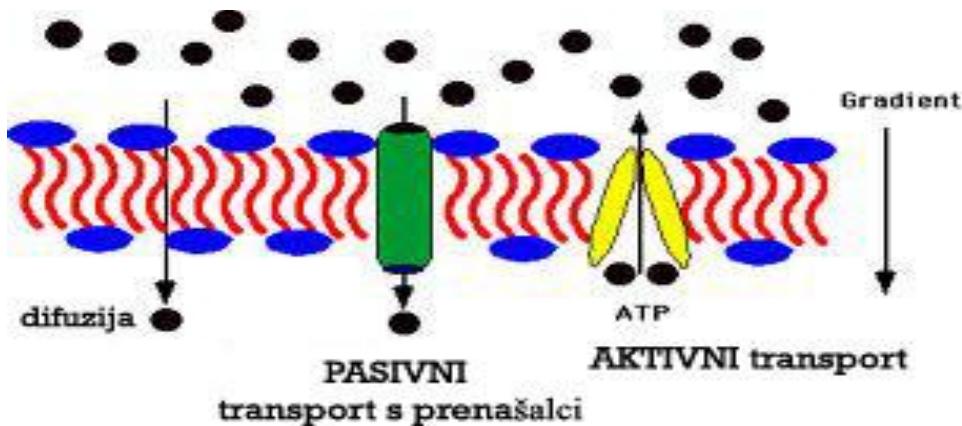
**AKTIVNI TRANSPORT** prenaša snovi v smeri od nižje koncentracije proti višji koncentraciji in pri tem porablja energijo iz različnih virov ( hidroliza molekule ATP, svetlobna energija). Omogoča kopiranje snovi na eni strani membrane (26) (Slika 5)

Poznamo dve obliki aktivnega transporta:

a) primarni aktivni transport (energijo dobi s hidrolizo molekule ATP; prenašalec je hkrati encim, ki hidrolizira molekulo ATP in se imenuje ATPaza; npr.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaza,  $\text{H}^+/\text{K}^+$  ATPaza)

Pri raziskavah *in vitro* se kot inhibitor  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPaze največ uporablja **OUABAIN**, kardiotonični glikozid, ki ga pridobivajo iz semen afriške rastline (*Strophanthus gratus*) in iz debla *Acokanthera ouabaio* (38).

b) sekundarni aktivni transport (sklopljena sta dva načina prenosa, kjer prenos ene molekule v smeri koncentracijskega gradiента omogoča prenos druge v obratni smeri od koncentracijskega gradiента; imenujemo ga tudi kotransport; npr.  $\text{Na}^+$ -glukozni kotransport) (25).



Slika 5: Pasivni transport s prenašalci in aktivni transport

(Povzeto po: [http://www.nicksnowden.net/images/Membranes\\_and\\_Transport/simple,facilitated,active.html](http://www.nicksnowden.net/images/Membranes_and_Transport/simple,facilitated,active.html), dostop: 5.12.2010)

- Pri prenosu z membranskimi mešički potujejo preko membrane velike molekule, ki bi sicer težko prečkale membrano. Pri *endocitozi* (pinocitoza, fagocitoza) se membrana vboči v notranjost celice in nastane mešiček, ki potuje v notranjost celice, medtem ko se pri *eksocitozi* mešiček iz citosola zlije s plazmalemo, vsebina pa se izlije v zunajcelični prostor. Z eksocitozo poteka npr. sekrecija hormonov, sproščanje nevrotransmiterjev (25).

### **1.6.3 Monoaminski transporterji**

Monoamini so pomembni mediatorji tako pri fizioloških kot tudi pri patofizioloških procesih v telesu. Za razliko od drugih substanc se monoamini bolj pogosto inaktivirajo s pomočjo privzema v celico kot pa z encimsko inaktivacijo. Specifični membranski transportni proteini uravnavajo privzem monoaminov tako iz sinaptične špranje kot tudi iz izvenceličnih tekočin in jih nato kopičijo znotraj celice (8).

Monoaminske transporterje razdelimo na tri glavne družine:

- ***NEVRONSKI MONOAMINSKI TRANSPORTERJI***
  - ***NENEVRONSKI MONOAMINSKI TRANSPORTERJI***
  - ***VEZIKULARNI MONOAMINSKI TRANSPORTERJI (VMATs)***
- **NEVRONSKI MONOAMINSKI TRANSPORTERJI:**

Že leta 1960 so ugotovili, da se noradrenalin v centralnem živčnem sistemu (CŽS) privzema s pomočjo **aktivnega transporta**. Kemična signalizacija v živčnih celicah se prekine s pomočjo privzema monoamina iz sinaptične špranje v presinaptični nevron preko transporterjev. Aktivnost transporterjev je odvisna od gradiента  $\text{Na}^+$  in od temperature. Poznamo specifične transporterje za noradrenalin (NET), dopamin (DAT) in serotonin (SERT), za histamin pa še ni znanega specifičnega transporterja. Te transporterje lahko najdemo tudi izven živčnega sistema (8, 27) (Preglednica IV).

**Preglednica IV:** Specifičnost različnih substratov in inhibitorjev na nevronske monoaminske transporterje (Povzeto po 8)

transporter	specifičnost substrata	inhibitor	tkivo
NET	DA>NE>E	kokain, reboksetin, bupropion	CŽS, nadledvična žleza, pljuča, maternica, posteljica
DAT	DA>NE>E	kokain, SSRI, bupropion	CŽS, GIT, ledvica
SERT	5HT	SSRI (fluoksentin), kokain	CŽS, PŽS, posteljica

- **NENEVRONSKI MONOAMINSKI TRANSPORTERJI:**

Za razliko od nevronskih monoaminskih transporterjev, ki prenašajo bolj specifične substrate, pa preko nenevronskih poteka transport številnih endogenih in eksogenih substratov. Pomagajo pri eliminaciji organskih kationov z različnimi strukturami. Prenašajo tudi zdravila, toksične ksenobiotike ter njihovime metaboliti. Njihova glavna naloga je inaktivacija in s tem omejitve koncentracije teh substanc v krvnem obtoku. Imajo visoko kapaciteto in nizko afiniteto vezave. Transport organskih kationov preko njih poteka s **pasivnim transportom s prenašalci** v obeh smereh. Sila pogona je koncentracijski gradient transportirane substance ter membranski potencial. Aktivnost pa je neodvisna od gradiента  $\text{Na}^+$  (8, 27, 28).

Poznamo družino organskih kationskih transporterjev (OCT) in plazmalemski transporter za monoamine (PMAT).

- **Organski kationski transporterji (OCT)**

Že nekaj let je znano, da so OCT odgovorni za privzem monoaminov iz krvnega obtoka. Gre za tri polispecifične organske kationske transporterje oziroma OCT1-3. So predstavniki SLC22A družine SLC transporterjev (omogočajo pasivni transport s prenašalci in sekundarni aktivni transport). Vse tri izoblike imajo podobno transmembransko topologijo, skupno skupino prednostnih substratov in skupen osnoven mehanizem transporta. Gre za transmembranski protein z 12 domenami. Ima dve veliki zanki, eno zunajcelično N-glikozilirano in eno znotrajcelično fosforilirano. Transmembranske domene so pomembne za prepoznavanje substratov. Večina substratov za OCT ima relativno molekulsko maso pod 500. Torej prenašajo organske kationske molekule z nizko molekulsko maso in hidrofilnimi lastnostmi, a z zelo različno strukturo molekule. Transport preko OCT inhibirajo številne druge snovi, ki pa se ne transportirajo (29) (Preglednica IV ).

**OCT1:** Nahaja se v glavnem v jetrih in ostalo v skeletnih mišicah, nadledvični žlezi, srcu, pljučih, posteljici, jajčnikih. Odgovoren je za privzem številnih organskih kationov v sinusoide jeter (metabolizem prvega prehoda) in tako distribucijo zdravil v jetrih, kjer potem pridejo v stik z metabolnimi encimi v jetrih ali pa so vodeni v žolčno izločanje (30).

**OCT2:** Nahaja se predvsem v ledvicah. Odgovoren je za privzem številnih organskih kationov skozi bazolateralno membrano v proksimalne tubule ledvic in predstavlja prvi korak v aktivni tubularni sekreciji substratov. Najdemo ga lahko tudi v posteljici, nadledvični žlezi, jačnikih (8, 29).

**OCT3:** Izraža se v številnih tkivih (skeletne mišice, srce, posteljica, jetra, ledvica, pljuča, čревa, jajčniki, nevroni v možganih in hrbtenjači). Je bolj razpršen po telesu in ima unikaten profil selektivnosti. Poleg tega prenaša druge molekule kot OCT1 in OCT2. (29, 30).

- **Plazmalemski transporter za monoamine (PMAT)**

Številni endogeni in eksogeni organski kationi se eliminirajo iz telesa s pomočjo polispecifičnih membranskih transporterjev OCT. Transport pa naj bi potekal tudi preko novejše odkritega polispecifičnega PMAT, ki je del ENT (transporter, ki uravnoteže nukleozide) in predstavnik družine SLC29. ENT1-3 vplivajo na transport nukleozidov in njihovih analogov, ENT4 (PMAT) pa ne vpliva na ta transport. Na transport preko PMAT zelo vpliva struktura molekule. Večjo afiniteto vezave imajo substrati/inhibitorji, ki so pozitivno nabiti in so bolj hidrofobni. Molekula, ki se veže na PMAT, mora imeti vsaj eno planarno aromatsko strukturo, saj samo tako lahko pride do  $\pi$ - $\pi$  interakcije s triptofanom ali s tirozinom v PMAT (27, 28).

**PMAT:** mRNA nivo je najvišji v možganih, kjer regulira koncentracijo monoaminov v določenih razmerah, v skeletnih mišicah, maternici in pa manj v jetrih in ledvicah, kjer pa je njegova vloga še neznana (8, 29). V novejši raziskavi so potrdili prisotnost PMAT tudi v HUVEC (31, 32).

PMAT in OCT so polispecifični transporterji, ki si genetsko niso podobni, vendar imajo številne funkcionalne podobnosti. PMAT vpliva na transport številnih organskih kationov vključno na substrate/inhibitorje od OCT. Zaradi vseh teh številnih podobnosti je težko ločiti transport preko OCT med transportom preko PMAT. Kortikosteron ima večjo (10-1000-krat) afiniteto do OCT kot do PMAT. Opazili so nekatere funkcionalne razlike med PMAT in OCT3 in sicer med različno afiniteto do monoaminskih nevrotransmiterjev. Serotonin (5HT) in dopamin (DA) imata večjo afiniteto vezave na PMAT kot pa adrenalin (E) in noradrenalin (NA) in ravno obratno je pri OCT3. Lahko rečemo, da se pojavljajo samo minimalne razlike (33) (Preglednica IV).

**Preglednica V: Razlika v specifičnosti substratov/inhibitorjev pri nenevronskih monoaminskih transporterjih** (Povzeto po 8, 33)

transporter	specifičnost substrata	inhibitor
OCT1	DA=E>>NE; 5HT, MPP+, TEA	kortikosteron, 17β-estradiol, progesteron, cimetidin, prazosin, decinij 22
OCT2	DA>>NE>E; 5HT, His, MPP+, TEA, gvanidin, holin	kortikosteron, 17β-estradiol, progesteron, cimetidin, decinij 22
OCT3	E>NE>DA; 5HT, His, MPP+, holin	kortikosteron, 17β-estradiol, progesteron, cimetidin, decinij 22
PMAT	5HT>DA>NE>His>E, MPP+, gvanidin, holin	nikotin, klonidin, amantadin, decinij 22, kortikosteron (manjša afiniteta)

## VEZIKULARNI MONOAMINSKI TRANSPORTERJI (VMAT)

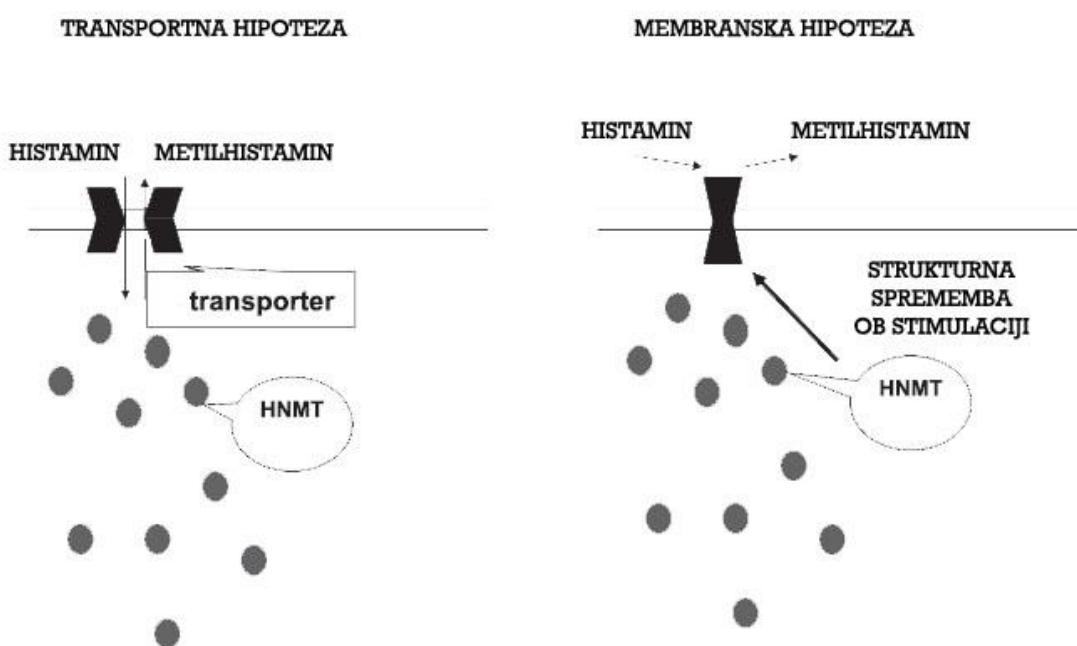
V citoplazmi se monoamini preko VMAT zbirajo v vezikule (mehurčke) iz katerih se nato s pomočjo specifične stimulacije tudi sprostijo. Zaradi tega so VMAT del metabolizma monoaminov. Poznamo VMAT1 in VMAT2.

**VMAT1:** Najdemo ga v nadledvični žlezi in gastrointestinalnem traktu.

**VMAT2:** Nahaja se predvsem v celicah CŽS in pa v nadledvični žlezi (8).

#### **1.6.4 Privzem histamina v celice**

Privzem histamina so potrdili pri raziskavi na mišjih in podganjih celicah s pomočjo transportne hipoteze (34). Histamin inaktivira znotrajcelični encim HNMT. Sam histamin pa zaradi svoje kationske oblike ne gre enostavno preko celične membrane. Postavili so dve hipotezi. Prva je bila membranska hipoteza, kjer naj bi se HNMT translaciral na površino celice ob stimulaciji. Druga bolj verjetna pa je bila transportna hipoteza, kjer so potrdili privzem histamina s pomočjo pasivnega transporta preko OCT2 in OCT3 v celice (34) (Slika 6 ).



**Slika 6:** Primerjava transportne in membranske hipoteze pri privzemu histamina v endotelijске celice.

(Povzeto po 34)

Tudi raziskava na možganskih endotelijskih celicah je potrdila pomembnost celic pri inaktivaciji histamina s privzemom. Pri ishemičnih pogojih se sprosti veliko histamina v delih možganov in ravno endotelijiske celice igrajo pomembno vlogo pri regulirjanju prevelikih koncentracij (5).

### **1.6.5 Privzem histamina v HUVEC**

HUVEC tudi aktivno sodelujejo pri inaktivaciji histamina s privzemo, še posebno v območju koncentracij, ki so do 10-krat večje od normalne fiziološke koncentracije (10 nM). Privzem je koncentracijsko, časovno in temperaturno odvisen nasitljiv proces (4, 14). Rezultati pri raziskavi kažejo, da na privzem histamina v HUVEC vplivajo nekateri antidepresivi. Poskus so naredili z dezipraminom, ki je selektivni inhibitor ponovnega privzema noradrenalina (SNRI), citalopramom, ki je selektivni inhibitor ponovnega privzema serotoninu (SSRI) in amitriptilinom, ki je inhibitor ponovnega privzema noradrenalina in serotoninu (NSRI). Dezipramin je v območju terapevtske koncentracije znižal privzem histamina, citalopram ni imel vpliva, amitriptilin pa je povišal privzem histamina v HUVEC. Glede na to, da je dezipramin povročil inhibicijo privzema histamina v HUVEC, predvidevajo, da je v transport histamina vpletен OCT3 (4). Pri drugi raziskavi so potrdili inhibicijo PMAT z dezipraminom (35), tako da bi lahko dodali, da privzem histamina v HUVEC lahko poteka tudi preko PMAT.

Transport histamina v HUVEC poteka preko vsaj dveh mehanizmov. (Preglednica VI). Prvi deluje v začetni fazи privzema (v času prvih 5 minut), drugi pa v kasnejši (v času do 45 minut). Triprolidin in decinij 22 sta imela inhibitorni vpliv le na začetno fazо privzema. Iz tega lahko sklepamo, da so v začetni mehanizem privzema vključeni OCT2 ali/in OCT3 ali/in PMAT (7, 8, 28). Drugi še neopredeljen(i) sistem(i) je/so vključen(i) v kasnejšo fazо privzema (7).

- Kinetika privzema histamina v HUVEC**

**Preglednica VI:** Michaelis-Montonova konstanta (KM) in maksimalna hitrost (Vmax) privzema  $^3\text{H}$ -histamina v HUVEC po 5 ali 45 min inkubacije.

Prikazane so vrednosti aritmetična sredina  $\pm$  SEM 3 neodvisnih poskusov narejenih v treh ponovitvah.  
 $^{***}p<0,001$  v primerjavi s 5 min (povzeto po 7).

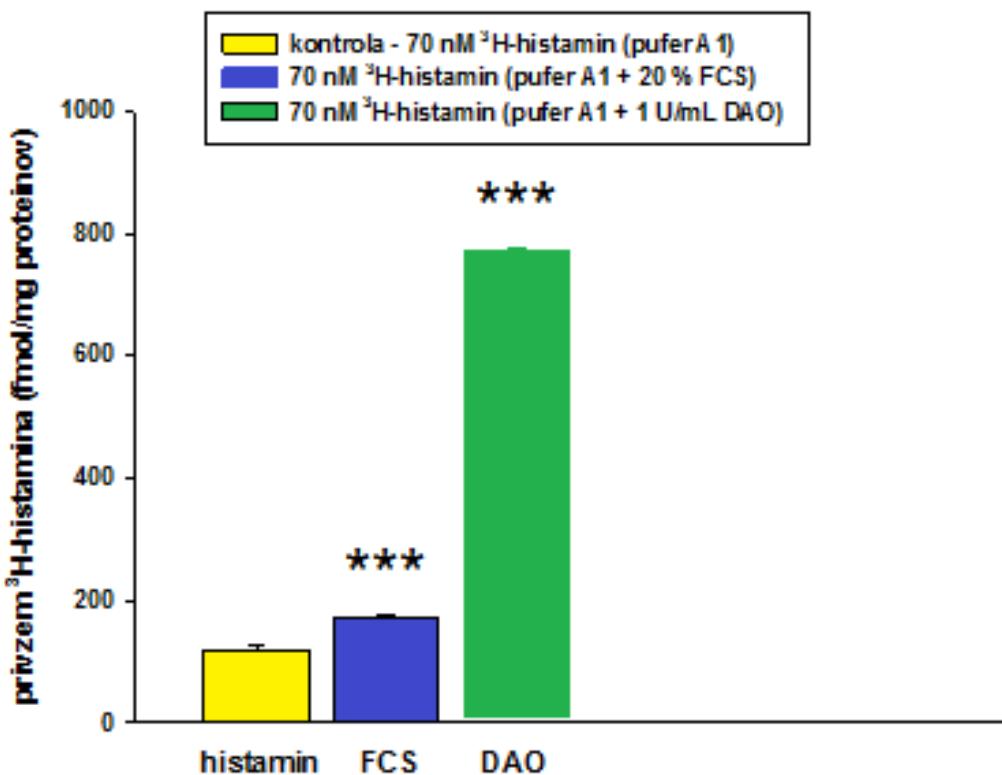
Čas inkubacije [min]	KM [nM]	V <sub>max</sub> [fmol/min/mg proteinov]
5	48,1 $\pm$ 8,1	14,5 $\pm$ 0,4
45	60,2 $\pm$ 10,1	3,7 $\pm$ 0,9***

- Vpliv zunajceličnega DAO in FCS na privzem histamina v HUVEC**

Privzem v HUVEC je tesno povezan s stopnjo encimske razgradnje. V raziskavah so ugotovili, da na privzem v HUVEC vplivata zunajcelični DAO in FCS. Ugotovili so, da FCS skrajša dobo tahifikaksije, ki traja več ur in se razvije v nekaj minutah po vezavi histamina na H<sub>1</sub> receptor. DAO, ki je prisoten v FCS je odgovoren za povečan privzem histamina ter kopiranje oksidiranega metabolita 1-metil-4-imidazolacetilne kisline (MIAA) v HUVEC. Očiščen encim DAO je povečal privzem histamina za 2-krat v primerjavi z 20 % FCS (3). Privzem histamina v prisotnosti DAO je odvisen od zunajceličnega Na<sup>+</sup> in Cl<sup>-</sup> in se kaže kot kopiranje MIAA v celicah (1, 2, 3).

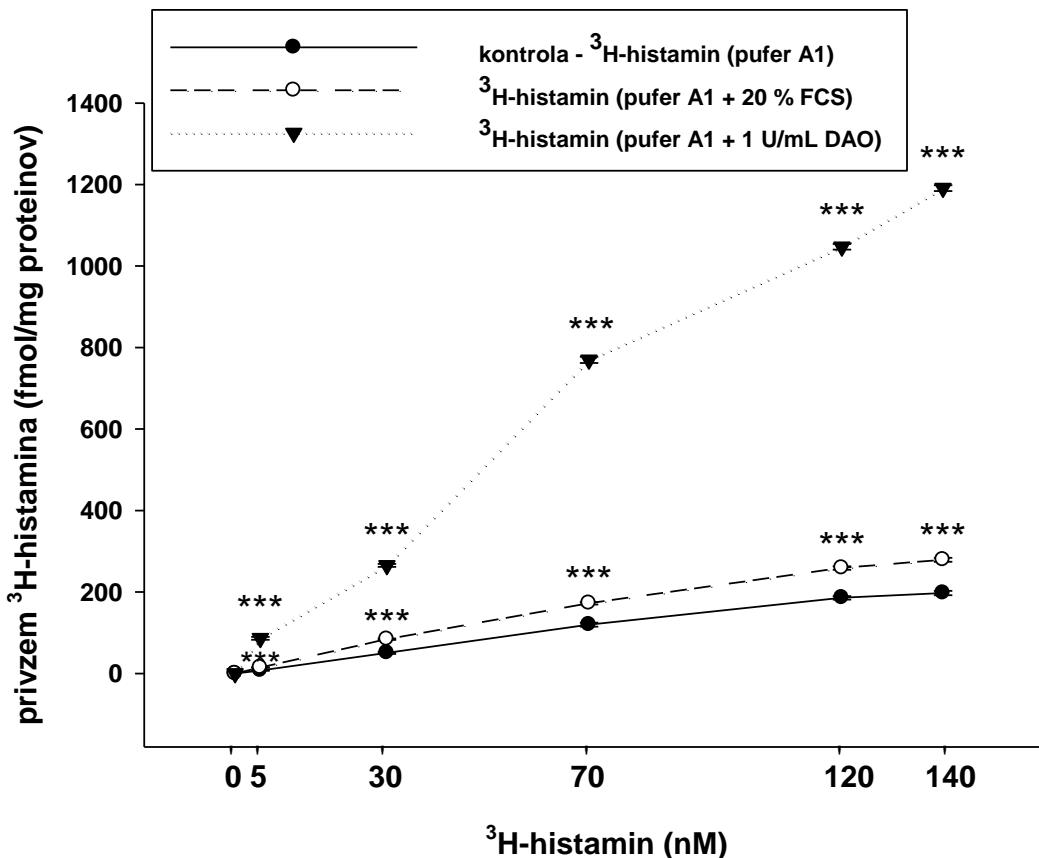
Pri drugi raziskavi so ugotavliali, če dodatek FCS ali DAO v pufer za privzem poveča privzem različnih koncentracij  $^3\text{H}$ -histamina (5-140 nM) v HUVEC. Pufer s FCS in pufer z DAO sta statistično značilno povečala privzem  $^3\text{H}$ -histamina v HUVEC v vseh koncentracijskih točkah v primerjavi s kontrolo (Slika 7). Naraščanje privzema  $^3\text{H}$ -histamina z višanjem njegove koncentracije je veliko večje ob prisotnosti DAO.

Ob prisotnosti FCS je povečanje dokaj vzporedno kontroli. Pri 70 nM koncentraciji je FCS povišal privzem  $^3\text{H}$ -histamina za faktor 1,4, DAO pa za 6,4 (20) (Slika 7a, 7b).



**Slika 7a:** Povečanje privzema  $^3\text{H}$ -histamina v HUVEC ob prisotnosti 20% FCS oz. 1 U/mL DAO v pufru za privzem.

Celice so inkubirali s 70 nM  $^3\text{H}$ -histaminom 45 min pri 37 °C v pufru A1 brez dodatkov oz. v pufru A1 z dodanim FCS oz. DAO. Točke so prikazane kot srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=9). \*\*\*p<0,001 v primerjavi s kontrolo (Povzeto po 20)



**Slika 7b: Koncentracijska odvisnost privzema  ${}^3\text{H}$ -histamina v HUVEC ob prisotnosti 20% FCS oz. 1 U/mL DAO v pufru za privzem.**

Celice so inkubirali s 70 nM  ${}^3\text{H}$ -histamino m 45 min pri 37 °C v pufru A1 brez dodatkov oz. v pufru A1 z dodanim FCS oz. DAO. Točke so prikazane kot srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=9). \*\*\*p<0,001 v primerjavi s kontrolo (Povzeto po 20)

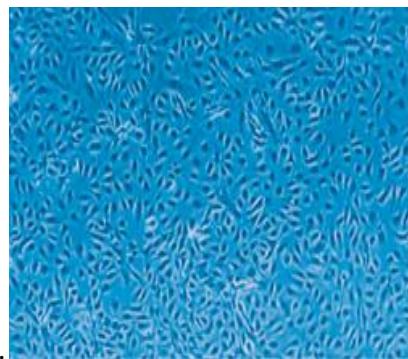
Med raziskavama se pojavlja razlika v učinkovitosti FCS in DAO. To si lahko razlagamo kot posledica različnega vira DAO oz. FCS in s tem njune aktivnosti ali pa na rezultate vplivajo metodološke razlike. Npr.: čas inkubacije histamina, koncentracija histamina, pasaža celic. Lahko pa tudi sklepamo na možnost, da v FCS na privzem ne vpliva le DAO, ampak tudi kakšna druga sestavina. Sestava FCS je namreč zelo kompleksa.

## 1.7 ENDOTELNE CELICE IZ POPKOVNIČNE VENE ČLOVEKA

HUVEC izoliramo iz popkovnične vene človeka. So ene izmed najbolj uporabljenih modelov endotelnih celic za preučevanje bioloških procesov, ker je popkovnična vena veliko lažje dostopna kot ostale žile človeka in navadno ni bolezensko spremenjena. Primarne kulture HUVEC so fiziološko ustreznajše kot celične linije iz endotelnih celic. Uporabljamo jih pri preučevanju naslednjih bioloških procesov:

- aterom (omejena zadebelitev v intimi arterij, zaradi kopičenja lipidov)
- navzkrižno komuniciranje med endotelnimi in imunskimi celicami (so rezultat ekspresije adhezijskih molekul in citokinov)
- adhezija levkocit-endotelij (ključni korak pri limfocitnem kroženju, migraciji imunskih celic proti vnetim tkivom in alergijam)
- transmigracija levkocitov skozi krvno žilo
- nastanek metastaz (je pod vplivom adhezijskih interakcij med cirkulirajočim tumorjem in endotelnimi celicami).

Celice so homogene, ploske, poligonalne, zgoščeno razporejene in rastejo v enem sloju (Slika 8). So od 30 do 50  $\mu\text{m}$  velike in imajo dobro vidna dva ali tri jedra in granule, ki obdajajo jedro (36)



**Slika 8:** Endotelne celice iz popkovnične vene človeka (Povzeto po:  
[http://www.dddmag.com/uploadedImages/Articles/2010\\_10/HUVEC.jpg&imgrefurl=](http://www.dddmag.com/uploadedImages/Articles/2010_10/HUVEC.jpg&imgrefurl=), dostop:17.12.2010)

## 2 NAMEN DELA

Inaktivacija histamina je nujno potrebna, saj povišana koncentracija histamina v krvi lahko povzroči številne patološke reakcije. V razmerah *in vivo* biološko aktiviran histamin zelo hitro izgine iz krvnega obtoka ( $t_{1/2}=0,5\text{--}2$  min), kar je za pasivni transport v celice prehitro (4, 37). Zato želimo raziskati mehanizme privzema, s katerimi endotelne celice sodelujejo pri inaktivaciji histamina v krvnem obtoku.

Z dodajanjem ouabaina, kardiotoničnega glikozida in inhibitorja  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPaze in z inkubacijo celic v pufru brez  $\text{Na}^+$  želimo pojasniti vlogo aktivnega transporta pri privzemu histamina v endotelijske celice popkovnične vene. Ugotoviti želimo vpletenost OCT in PMAT v inaktivacijo histamina, zato bomo dodajali dopamin, serotonin in noradrenalin, ki so znani substrati/inhibitorji OCT in PMAT. Zanimajo nas tudi morebitne spremembe privzema ob prilagajanju zunajceličnega okolja ( prisotnost FCS oz. DAO)

V diplomskem delu bomo preverili naslednje delovne hipoteze:

- histamin se v endotelne celice človeka privzema predvsem s pasivnim transportom s prenašalci,
- drugi monoamini bodo zmanjšali privzem histamina ob prisotnosti FCS, saj pasivni transport posredujejo neselektivni transporterji,
- prisotnost DAO bo vplivala le na privzem histamina, ne pa na inhibicijo privzema histamina z dopaminom.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

- antibiotik (streptomicin in penicilin; GIBCO ZDA, tekočina 100 ml, P5000 U/ml / S5000 ug/ml)
- raztopina M199 (rastni medij-gojišče) (GIBCO)
- kolagenaza A (22 U/100 ml, Sigma)
- fetalni goveji serum (Cambrex)
- rastni faktor za endotelne celice (ECGS, Sigma)
- tripsin-EDTA (Sigma)
- $^3\text{H}$ -histamin (66,7 GB q/mmol; specifična aktivnost 14,2 Ci/mmol; Perkin Elmer, ZDA)
- DAO (Sigma)
- scintilacijska tekočina Aquasol (NEN)
- dopamin (Sigma)
- noradrenalin (Sigma)
- serotonin (Sigma)
- ouabain (Serva)

## 3.2 METODE

### 3.2.1 POPKOVNICA

Potrebovali smo nepoškodovane dele popkovnic (dolžina približno 15 cm) otrok porodnic, ki so normalno donosile in rodile (Slika 9). Čim prej po porodu smo segmente popkovnice vložili v sterilno posodo napolnjeno z 10-krat razredčenim transportnim pufrom (1,4 M NaCl, 5,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 110 mM glukoza in destilirana voda, pH 6,5) in dodanim antibiotikom (streptomicin, penicilin) ter jih shranili pri temperaturi 4 °C. Vse poškodovane dele smo izrezali in nato pripravili primarno celično kulturo najkasneje 12 ur po porodu.



Slika 9: Popkovnica (Povzeto po:

<http://www.topnews.in/health/files/cutting%2520umbilical%2520cord.jpg>, dostop: 10.12.2010)

Za raziskave nismo uporabili popkovnice porodnic, ki so imele patološko nosečnost npr. preeklampsijo, hipertenzijo, diabetes, infekcijske ali druge manifestne bolezni ali so rodile s carskim rezom ali imele vakuumski porod.

Opomba: Strokovni poslovni svet Ginekološke klinike se je sestrinjal z odstopom svežih popkovnic Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo. Za poskuse smo dobili tudi odobritev od Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko.

Pred porodom so morali izjavo o dovoljenju, da se del popkovnice porabi za raziskave, podpisati porodnica, porodničar in raziskovalka.

### **3.2.2 IZOLACIJA PRIMARNIH ENDOTELNIH CELIČNIH KULTUR IZ POKOVNIČNE VENE ČLOVEKA**

Endotelne celične kulture iz popkovnične vene človeka smo pripravili po prilagojenem protokolu, ki zagotavlja pridobitev čiste kulture endotelnih celic (36). Postopek za dokazovanje čistosti kulture je opisan v sledečem poglavju. Od popkovnice smo odrezali končna dela in izrezali vse poškodovane dele. V veno na enem koncu popkovnice smo vstavili topo iglo in jo pričvrstili v popkovnici s peanom in kirurško nitjo. Nato smo iz vene sprali kri s približno 15 mL raztopine M199 s pomočjo 30 mL injekcije. Vsa raztopina je morala odteči v petrijevko. Drugi konec vene v popkovnici smo nepropustno zaprli s peanom, in zatem skozi topo iglo s pomočjo 30 mL injekcije veno napolnili z 10 do 15 mL tople kolagenaze A. Popkovnico z injekcijo in peanoma na obeh koncih smo položili na petrijevko in inkubirali točno 20 min. Po inkubaciji smo popkovnico nežno pregnetli in tako pomagali celicam, da se odlepijo. Iz popkovnične vene smo s 30 mL injekcijo posesali vsebino (endotelne celice in kolagenazo) in jo vbrizgali v 15 mL centrifugirko. Po 5 min centrifugiranju pri frekvenci 1500 obratov/min smo zavrgli raztopino in sediment (celice) dispergirali v 10 mL sveže raztopine M199. Izolirane endotelne celice smo dali v steklenice za gojenje kulture in jim dodali gojišče sestavljeno iz raztopine M199, 25 % fetalnega govejega seruma in 1,5 % raztopine antibiotika (streptomicin, penicilin) ter zatem inkubirali pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> atmosferi. Po 24 urah smo prvič zamenjali gojišče in nato po enem tednu. Gojišču smo dodali 100 µL/mL rastnega faktorja za endotelne celice.

### **3.2.3 TRIPSINIZACIJA ENDOTELNIH CELIČNIH KULTUR IZ POPKOVNIČNE VENE ČLOVEKA**

Konfluentno kulturo smo sprali z raztopino M199 in nato inkubirali s 5 mL tripsina-EDTA 3 min pri 37 °C, da se celice odlepijo. Delovanje tripsina smo zaustavili z dodatkom 8 mL gojišča. S pomočjo pipete smo prenesli suspenzijo v 15 mL centrifugirko. Po 5 min centrifugiranju pri frekvenci 1500 obratov/min smo supernatant zavrgli in sediment (celice) dispergirali v 12 mL sveže raztopine M199. S pipeto smo večkrat posesali gojišče, da so se celice enakomerno porazdelile po gojišču in nato smo jih prenesli v 12-prostorske testne posodice. V vsak prostor smo dali po 1 mL pripravljene suspenzije. Gojišče smo menjali na 2 dni.

### **3.2.4 PRIVZEM HISTAMINA V ENDOTELNE CELICE POKOVNIČNE VENE ČLOVEKA**

Konfluentne celice smo najprej 2-krat sprali s pufrom za privzem (**pufer A1** – 25 mM HEPES, 125 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,7 mM CaCl<sub>2</sub>, 5,6 mM glukoza in destilirana voda; pH 7,4).

Poskuse smo nadaljevali v dveh skupinah:

- vpliv Na<sup>+</sup> (zunajceličnega okolja) na privzem histamina v HUVEC,
- inhibicija privzema histamina v HUVEC.

#### **Vpliv Na<sup>+</sup> (zunajceličnega okolja) na privzem histamina v HUVEC**

Celice smo inkubirali v pufru brez NaCl, ki smo ga zamenjali s holinom kloridom (holinCl) (pufer- 25 mM HEPES, 125 mM **holinCl**, 4,8 mM KCl, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,7 mM CaCl<sub>2</sub>, 5,6 mM glukoza in destilirana voda; pH 7,4). Ta poskus smo

nato ponovili še z dodanim 20% FCS in z dodanim 1U/ml DAO v pufru. Najprej smo inkubirali 15 min v izbranem pufru za privzem in šele nato smo dodali 70 nM  $^3\text{H}$ -histamin ter inkubirali 45 min pri 37 °C.

### **Inhibicija privzema histamina v HUVEC**

Celicam smo dodali pufer A1 oz. pufer A1 z 20 % FCS oz. pufer A1 z 1U/ml DAO in snovi, za katere smo predvidevali, da bi lahko vplivale na privzem histamina.

Uporabili smo ouabain (0,1 mM), dopamin (1 mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 1000 nM, 10 nM, 0,1 nM), serotonin ( 1 mM, 0,1 mM) in noradrenalin (1 mM).

Vse omenjene koncentracije so končne koncentracije v pufru za privzem. Najprej smo dodali inhibitorje ter inkubirali 15 min pri 37 °C in šele nato smo dodali 70 nM  $^3\text{H}$ -histamin ter inkubirali nadaljnjih 45 min pri 37 °C.

Vse reakcije smo po preteku časa inkubacije prekinili tako, da smo plošče postavili na led in hitro odstranili inkubacijsko tekočino. Nato smo 4-krat sprali z 1 mL mrzlega pufra za privzem brez  $\text{CaCl}_2$  in zatem smo lizirali celice s 600  $\mu\text{L}$  0,5 M NaOH. Plošče smo 10 min stresali pri frekvenci 200 obratov/min. V 500  $\mu\text{L}$  končnega vzorca, ki smo mu dodali še 10 mL scintilacijske tekočine, smo izmerili količino  $^3\text{H}$ -histamina s tekočinsko scintilacijskim števcem za določanje specifične aktivnosti beta sevalcev. V preostanku končnega vzorca pa smo določili koncentracijo proteinov.

### **3.2.5 DOLOČEVANJE PROTEINOV**

Koncentracijo proteinov smo določili z metodo po Bradfordu z reagentom za barvanje (Bio-Rad Protein Assay). Za določanje proteinov smo v epruvete najprej odpipetirali standard albumina (2,5  $\mu\text{g}$ , 5  $\mu\text{g}$ , 8  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$ , 20  $\mu\text{g}$ , 30  $\mu\text{g}$ ) in 40  $\mu\text{g}$  vzorca. Dodali smo 200  $\mu\text{L}$  0,5 M NaOH in vzorce premešali. Čez 10 minut smo dodali vodo (da bo končni

volumen 600  $\mu\text{L}$ ), 200  $\mu\text{L}$  0,5 M HCl in 200  $\mu\text{L}$  reagenta za barvanje ter ponovno premešali. Pripravljene raztopine smo pustili stati 30 min in nato spektrofotometrično izmerili absorpcijo pri 595 nm valovne dolžine. Dobljeno koncentracijo proteinov smo uporabili pri podajanju koncentracij privzetega histamina.

### **3.2.6 ANALIZA PODATKOV**

Vse podatke, ki smo jih dobili iz poskusov izvedenih v treh paralelkah in večkratnih ponovitvah, smo statistično obdelali. Natančno število ponovitev je omenjeno pod vsako sliko v poglavju Rezultati.

Vse vrednosti so izražene kot aritmetična sredina  $\pm$  standardna napaka aritmetične sredine (SEM).. Statistično značilno razliko med aritmetičnimi sredinami smo izračunali z enosmerno analizo variance (ANOVA) pri primerjavi več skupin hkrati. Statistično značilno razliko bo predstavljal stopnja tveganja največ 0,05. Statistično značilne razlike smo označili takole: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  in \*\*\* $p<0,001$ .

Za izračun smo uporabili računalniški program SigmaStat verzije 3,5, za risanje grafov pa SigmaPlot verzije 10,0.

## 4 REZULTATI

### 4.1 VPLIV $\text{Na}^+$ IN OUABAINA NA PRIVZEM HISTAMINA V HUVEC

S prvimi poskusi smo želeli preveriti osnovne lastnosti transporta histamina v HUVEC, ki so bile inkubirane v pufru za privzem, katerega sestava je podobna zunajcelični tekočini. Ker je za primarni aktivni transport značilna odvisnost od aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPaze, smo le-to inhibirali z ouabainom in preverili, koliko histamina se prizvame v HUVEC. Ker je za sekundarni aktivni transport značilna odvisnost od  $\text{Na}^+$ , smo  $\text{NaCl}$  v inkubacijskem mediju nadomestili s holin $\text{Cl}$  in preverili količino privzetega histamina v HUVEC.

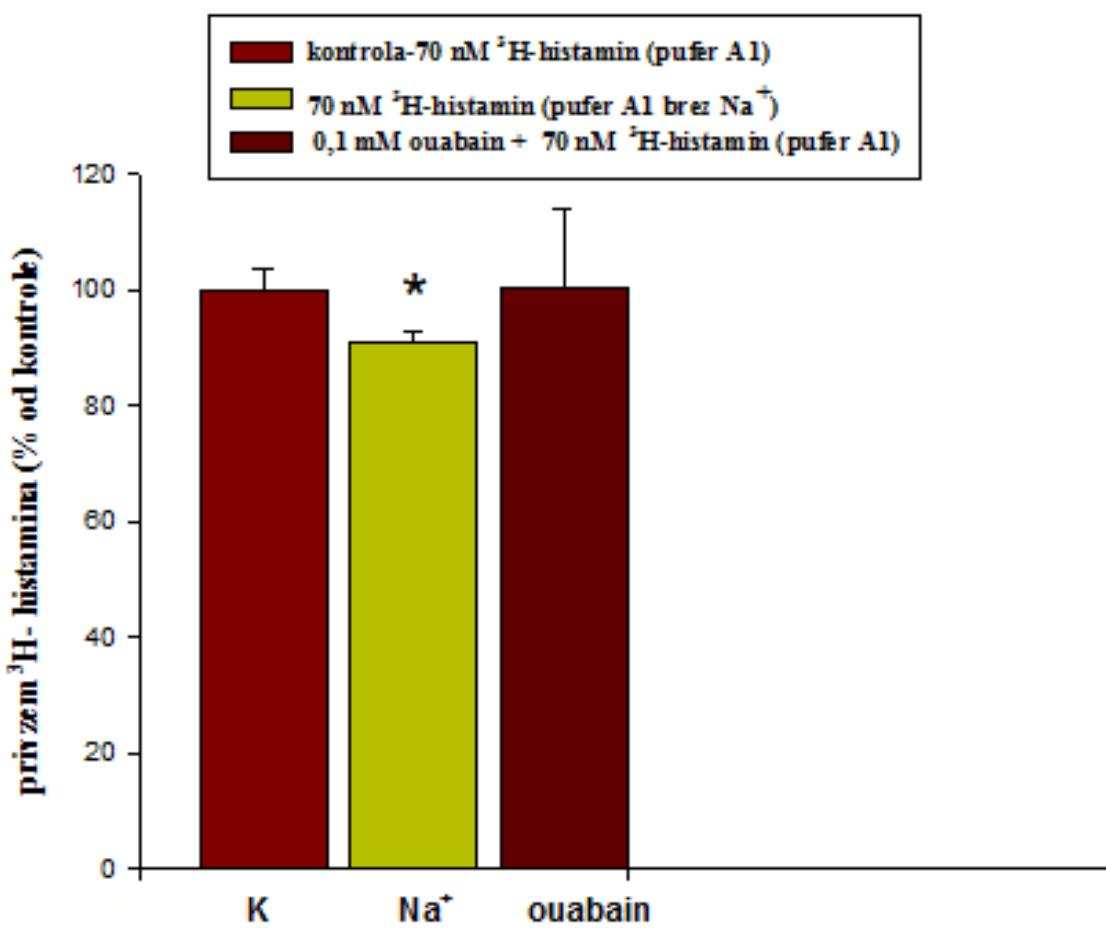
Kot je razvidno iz Slike 10, zamenjava  $\text{NaCl}$  s holin $\text{Cl}$  v inkubacijskem mediju statistično značilno zmanjša privzem histamina v HUVEC, medtem ko inhibicija encima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPaze z ouabainom ni vplivala na količino privzetega histamina v HUVEC. V razmerah, ko so HUVEC le v inkubacijskem mediju, se histamin privzema delno s sekundarnim aktivnim transportom (9%), večina pa s pasivnim transportom s prenašalci.

Ker plazma ne vsebuje le ionov, marveč tudi serumske proteine, smo v naslednji seriji poskusov preverili, če prisotnost proteinov v serumu spremeni osnovne lastnosti privzema histamina v HUVEC. Ponovno smo določevali odvisnost privzema histamina od  $\text{Na}^+$  in aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPaze. Kot medij pa smo uporabili pufer za prizem z dodatkom 20% FCS.

Na Sliki 11 je prikazano, da prisotnost serumskih proteinov v inkubacijskem mediju povzroči, da se večji del histamina (približno polovica) privzema v HUVEC s sekundarnim aktivnim transportom, ker je odvisna od prisotnosti  $\text{Na}^+$  ionov, polovica pa s pasivnim transportom s pomočjo prenašalcev. Ker aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPaze nima vpliva na količino privzetega histamina v HUVEC, se histamin v HUVEC ne privzema s primarnim aktivnim transportom.

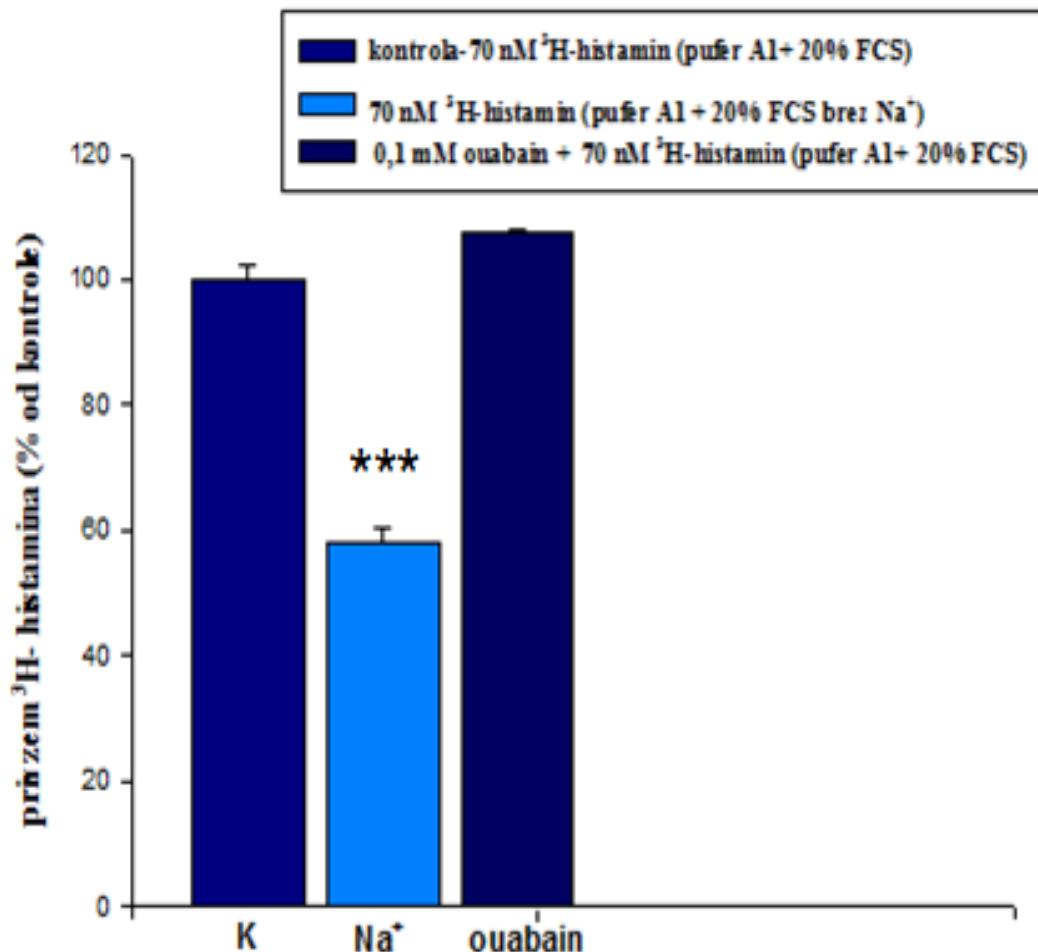
Ker serum vsebuje tudi encim DAO, nas je zanimalo, če encim, ki je vpletен v razgradnjo histamina, vpliva na količino privzetega histamina v HUVEC. Ugotovili smo, da v

razmerah, ko pufer vsebuje DAO, zamenjava NaCl s holinomCL in inhibicija Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPaze ne vplivata na količino privzetega histamina v HUVEC. Privzem v teh razmerah ponazarja le pasivni transport s pomočjo prenašalcev (Slika 12)



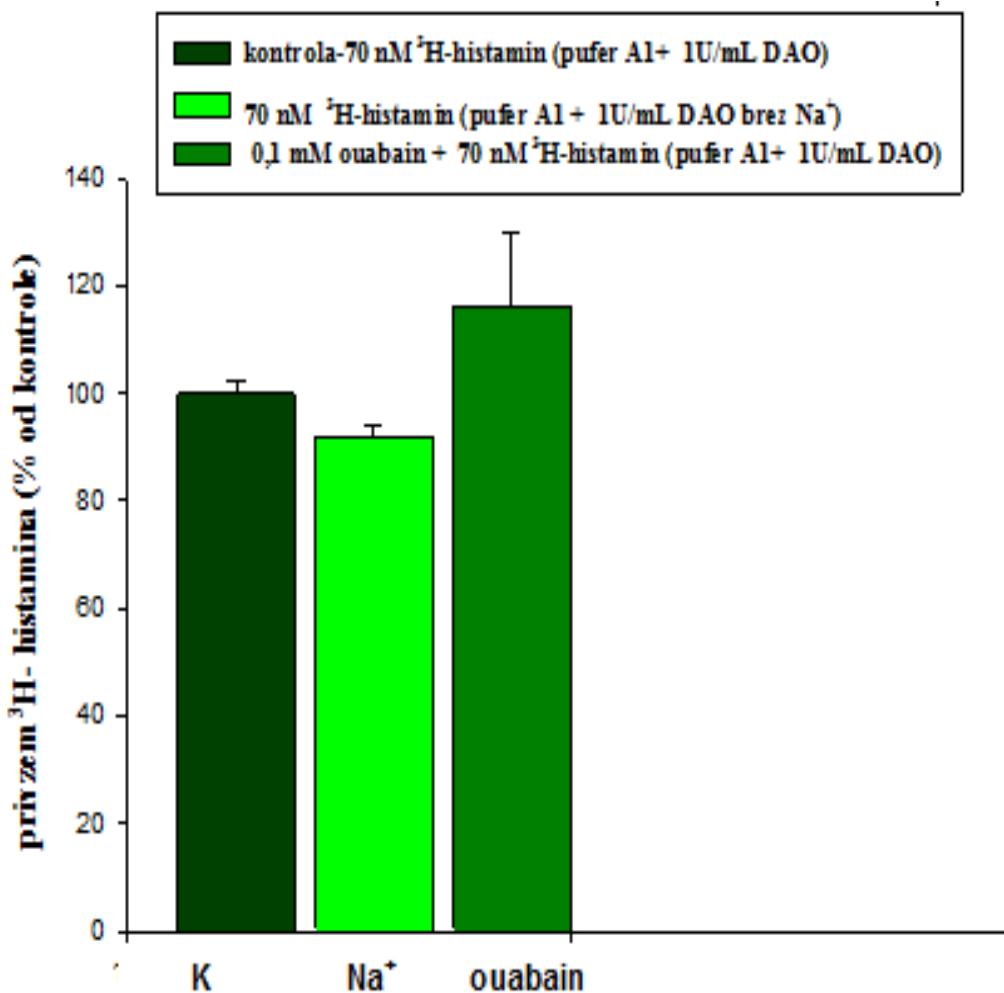
**Slika 10:** Vpliv Na<sup>+</sup> in ouabaina na prizem <sup>3</sup>H- histamina v HUVEC

Celice sмо najprej inkubirali s 70 nM <sup>3</sup>H-histamino m 45 min pri 37°C v pufru A1 brez Na<sup>+</sup> (125 mM holinCl/4,8 mM KCl, pH 7,4). Pri poskusu inhibicije z ouabainom pa sмо jih najprej inkubirali z 0,1 mM ouabainom za 15 min, nato smo dodali 70 nM <sup>3</sup>H-histamin in inkubirali še dodatnih 45 min pri 37°C najprej v pufru A1. Točke so prikazane kot srednja vrednost ± SEM (n=3-9). \*p<0,05 v primerjavi s kontrolo.



**Slika 11:** Vpliv Na<sup>+</sup> in ouabaina na prizem  $^3\text{H}$ -histamina v HUVEC ob prisotnosti 20% FCS.

Celice sмо najprej inkubirali s 70 nM  $^3\text{H}$ -histamino m 45 min pri 37 °C v pufru A1 brez Na<sup>+</sup> (125 mM holinCl/4,8 mM KCl, pH 7,4) s FCS. Pri poskusu inhibicije z ouabainom pa sмо jih najprej inkubirali z 0,1 mM ouabainom za 15 min, nato smo dodali 70 nM  $^3\text{H}$ -histamin in inkubirali še dodatnih 45 min pri 37 °C najprej v pufru A1 z dodanim FCS. Točke so prikazane kot srednja vrednost ± SEM (n=3-9). \*\*\*p<0,001 v primerjavi s kontrolo.



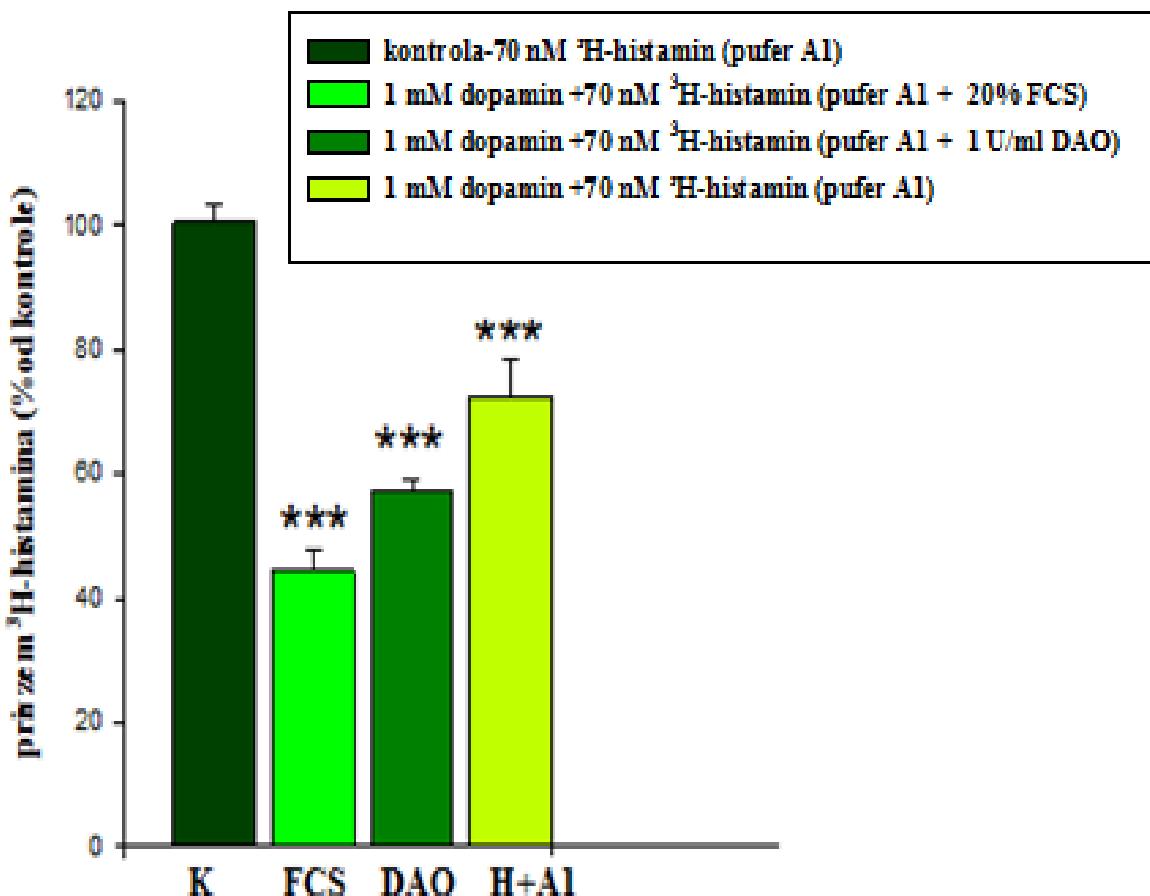
**Slika 12:** Vpliv  $\text{Na}^+$  in ouabaina na privzem  $^3\text{H}$ -histamina v HUVEC ob prisotnosti 1U/mL DAO.

Celice sмо najprej inkubirali s 70 nM  $^3\text{H}$ -histamino m 45 min pri 37°C v pufru A1 brez  $\text{Na}^+$  (125 mM holinCl/4,8 mM KCl, pH 7,4) z **DAO**. Pri poskusu inhibicije z ouabainom pa sмо jih najprej inkubirali z 0,1 mM oubainom za 15 min, nato smo dodali 70 nM  $^3\text{H}$ -histamin in inkubirali še dodatnih 45 min pri 37°C najprej v pufru A1 z dodanim **DAO**. Točke so prikazane kot srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=3-9).

## 4.2 VPLIV MONOAMINOV NA PRIVZEM HISTAMINA V HUVEC

Diplomsko delo smo nadaljevali s proučevanjem vpliva drugih biogenih aminov (dopamina, serotonina in noradrealina) na privzem histamina v HUVEC. Ker se vsi našteti biogeni amini privzemajo v različne celice tudi s pomočjo neselektivnih prenašalcev (OCT in PMAT), ki sodelujejo pri t.i. privzemu<sub>2</sub> v celice, smo želeli preučiti, če obstaja interakcija pri prenosu histamina v HUVEC. Najprej smo preverili vpliv dopamina na privzem histamina v HUVEC. Poskuse smo opravili v pufru za privzem, ki ni vseboval FCS in DAO, v pufru za privzem, ki je vseboval DAO in v pufru za privzem, ki je vseboval FCS.

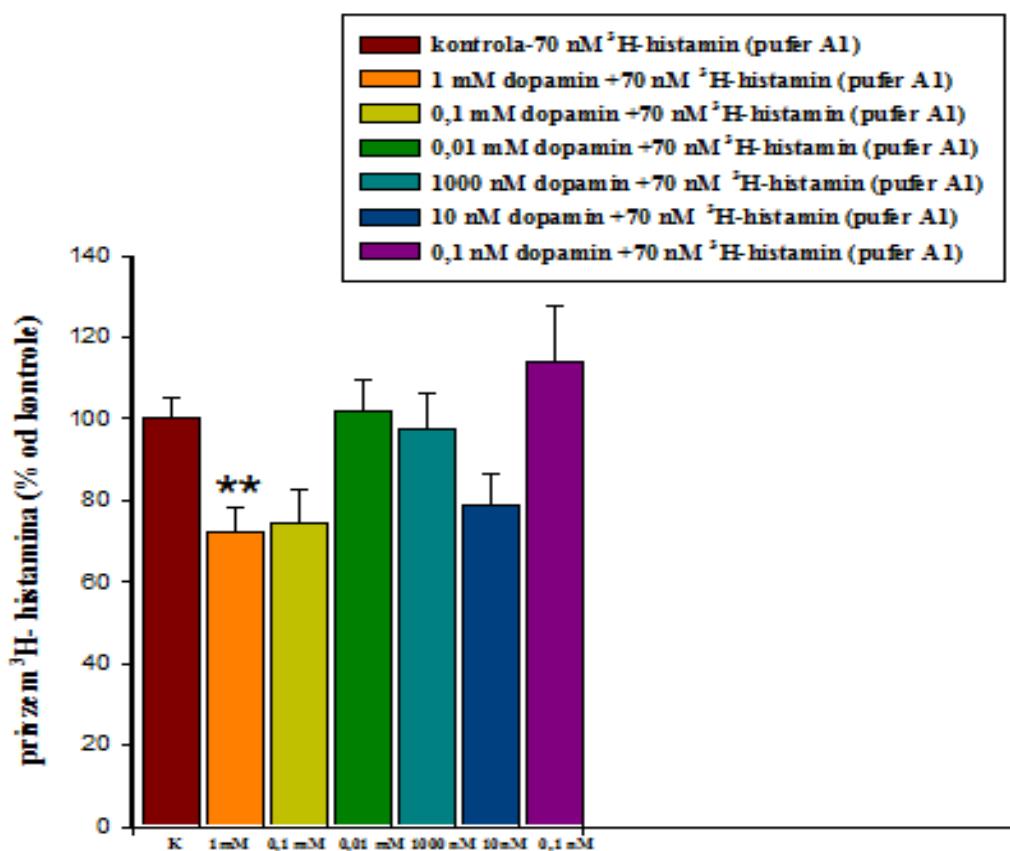
Na Sliki 13 je prikazan vpliv dopamina na privzem histamina v HUVEC v pufru za privzem, ki vsebuje FCS, v pufru za privzem, ki vsebuje DAO in v pufru brez FCS in DAO. Od vseh preučevanih koncentracij je le 1mM dopamin statistično značilno zmanjšal ( $p<0,001$ ) privzem histamina v HUVEC v vseh opazovanih razmerah. V pufru za privzem brez FCS in DAO je 1mM dopamin zmanjšal privzem histamina na 72 % kontrolne vrednosti, v prisotnosti DAO pa na 57% kontrolne vrednosti. Največji vpliv dopamina na privzem histamina v HUVEC je bil, ko je bil pufru za privzem dodan FCS, se pravi v razmerah, ki ponazarjajo razmere v plazmi. Takrat je dopamin zmanjšal privzem histamina na 44% kontrolne vrednosti.



**Slika 13:** Vpliv 1mM dopamina na prizem <sup>3</sup>H-histamina v HUVEC ob prisotnosti 20% FCS, 1U/mL DAO in v pufru A1 brez FCS in DAO.

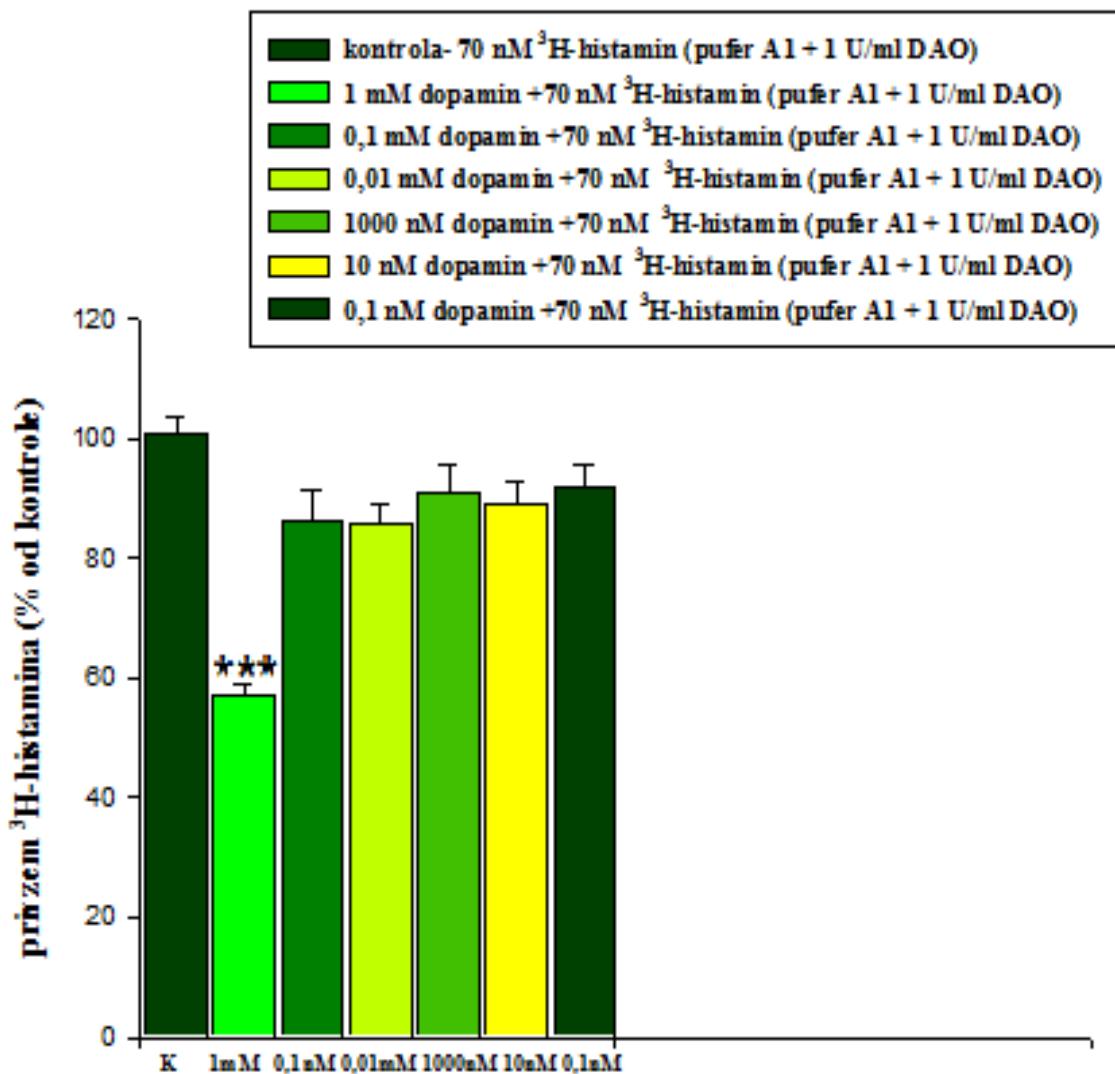
Celice smo predhodno inkubirali z 1 mM dopaminom za 15 min, nato smo dodali 70 nM <sup>3</sup>H-histamin in inkubirali še dodatnih 45 min pri 37 °C najprej v pufru A1 z dodanim FCS, nato isti postopek v pufru z dodanim DAO in še z dodanim pufrom A1 brez DAO in FCS. Točke so prikazane kot srednja vrednost ±SEM (n=9-12). \*\*\*p<0,001 v primerjavi s kontrolo.

V naslednjem poskusu smo opazovali, kako različne koncentracije dopamina vplivajo na privzem histamina v HUVEC. Proučili smo koncentracijsko območje od 0,1 nM - 1 mM. Najprej smo naredili poskus v pufru za privzem, ki ni vseboval FCS in DAO (Slika 14), nato v pufru za privzem ob prisotnosti DAO (Slika 15) in nazadnje še v pufru ob prisotnosti FCS (Slika 16). Ugotovili smo, da statistično značilno v pufru brez DAO in FCS zmanjša privzem histamina le koncentracija 1 mM (na 72%) (Slika 14), v pufru ob prisotnosti DAO tudi samo najvišja koncentracija 1 mM (na 57% kontrolne vrednosti privzema). V pufru, ki vsebuje FCS, pa statistično značilno zmanjšata privzem histamina koncentraciji 0,01 mM (na 75%) in 1 mM (na 44% kontrolne vrednosti privzema) (Slika 15). Nižje koncentracije dopamina niso statistično značilno spremenile količine privzetega histamina v HUVEC (Slika 14, 15, 16)



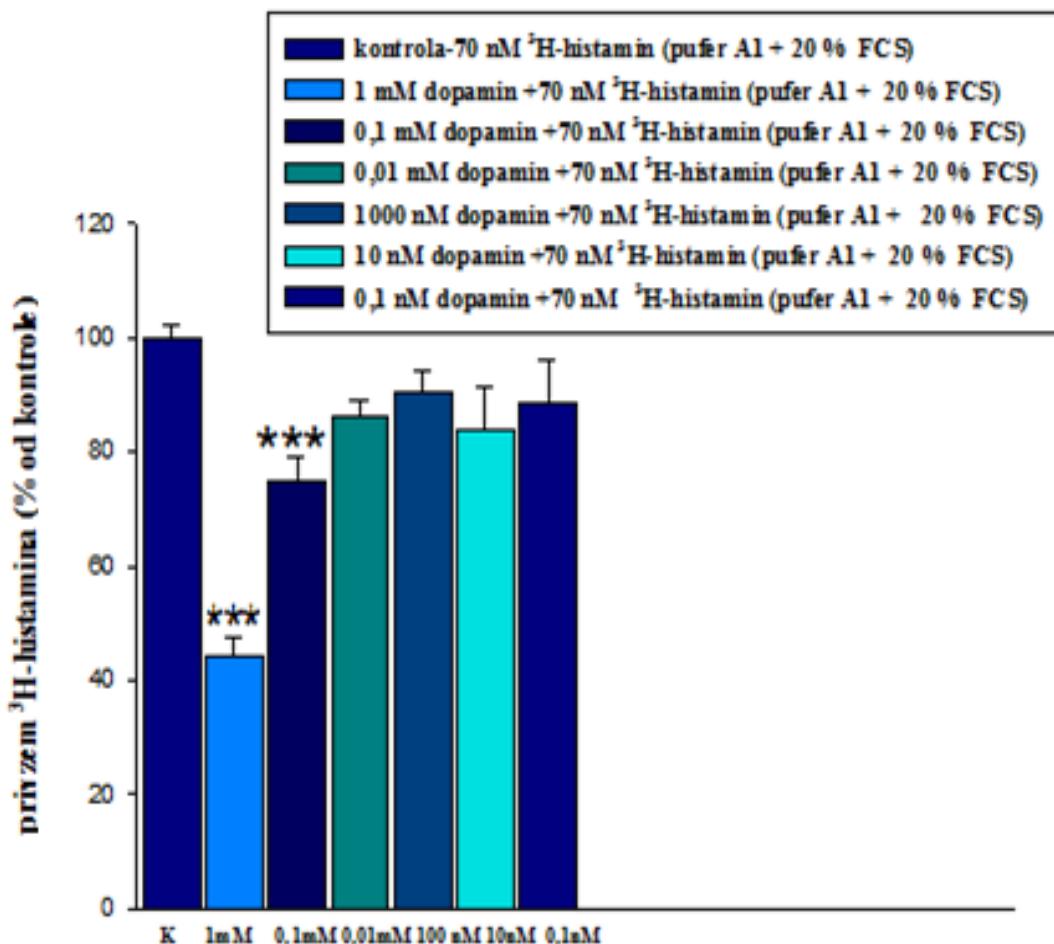
**Slika 14: Vpliv 1 mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 1000 nM, 10 nM, 0,1 nM dopamina na privzem  $^3\text{H}$ -histamina v HUVEC .**

Celice smo predhodno inkubirali z 1 mM oz. 0,1 mM oz 0,01 mM oz. 1000 nM oz. 10 nM oz. 0,1 nM dopamino m za 15 min, nato smo dodali 70 nM  $^3\text{H}$ -histamin in inkubirali še dodatnih 45 min pri 37 °C v pufru A1. Točke so prikazane kot srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=3-18). \*\*p<0,01 v primerjavi s kontrolo.



**Slika 15:** Vpliv 1mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 1000 nM, 10 nM, 0,1 nM dopamina na prizem  $^3\text{H}$ -histamina v HUVEC ob prisotnosti 1 U/ml DAO.

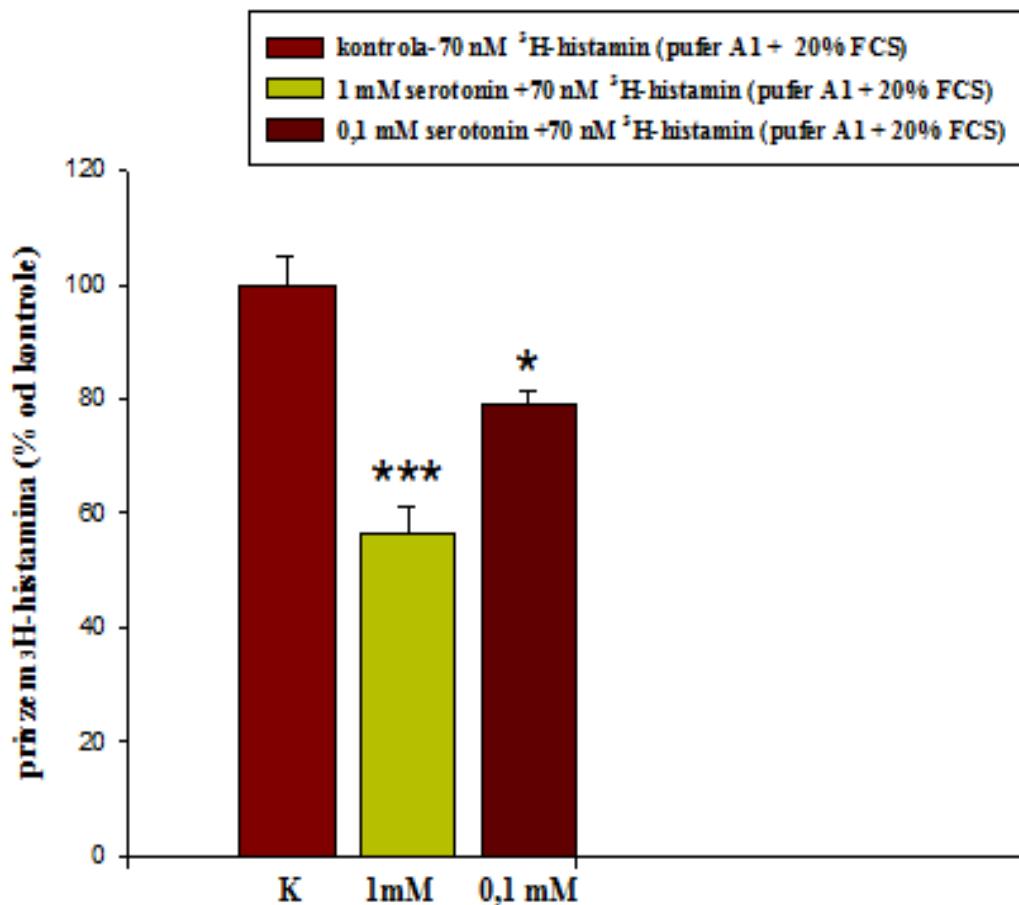
Celice smo predhodno inkubirali z 1 mM oz. 0,1 mM oz. 0,01 mM oz. 1000 nM oz. 10 nM oz. 0,1 nM dopamino m za 15 min, nato smo dodali 70 nM  $^3\text{H}$ -histamin in inkubirali še dodatnih 45 min pri 37 °C v puferu A1 z dodanim DAO. Točke so prikazane kot srednja vrednost  $\pm$ SEM (n=9-18). \*\*\*p<0,001 v primerjavi s kontrolo.



**Slika 16:** Vpliv 1mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 1000 nM, 10 nM, 0,1 nM dopamina na privzem  $^3\text{H}$ -histamina v HUVEC ob prisotnosti 20% FCS.

Celice smo predhodno inkubirali z 1 mM oz. 0,1 mM oz. 0,01 mM oz. 1000 nM oz. 10 nM oz. 0,1 nM dopamino m za 15 min, nato smo dodali 70 nM  $^3\text{H}$ -histamin in inkubirali še dodatnih 45 min pri 37 °C v pufru A1 z dodanim FCS. Točke so prikazane kot srednja vrednost  $\pm\text{SEM}$  ( $n=9-37$ ). \*\*\* $p<0,001$  v primerjavi s kontrolo.

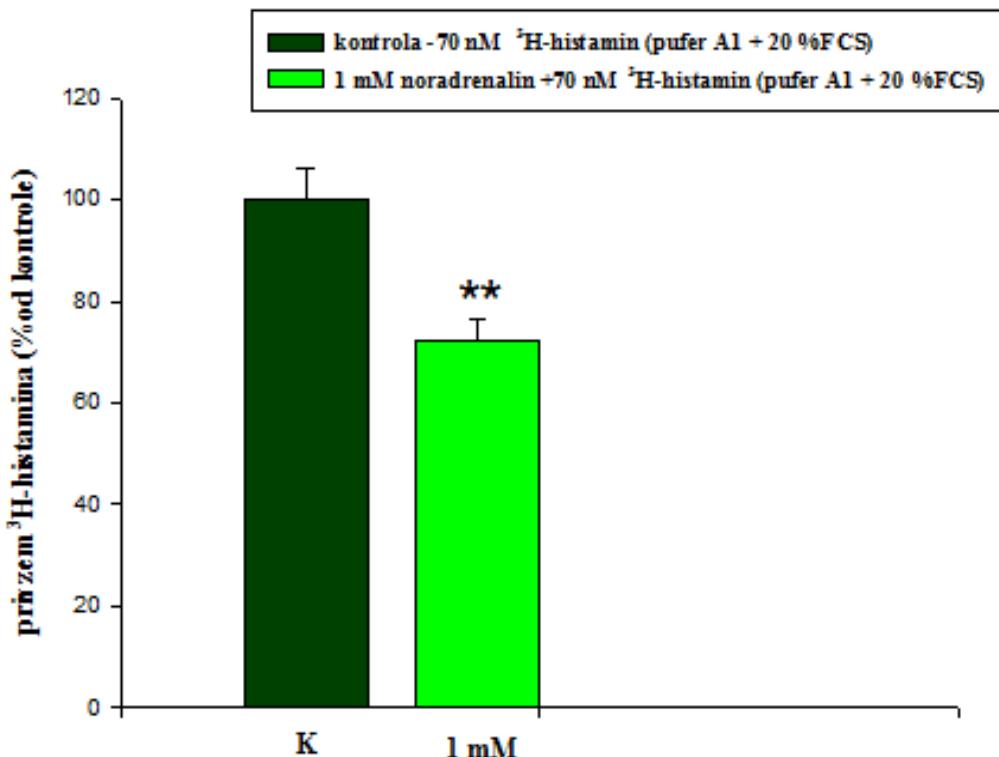
Biogeni amin serotonin je tudi zmanjšal privzem histamina v HUVEC (Slika 17). 0,1 mM serotonina je zmanjšal privzem histamina na 79% kontrolne vrednosti, 10-krat večja koncentracija pa je imela večji učinek. Privzem histamina se je zmanjšal na 56%.



Slika 17: Vpliv 1mM, 0,1 mM serotonina na privzem  $^3\text{H}$ -histamina v HUVEC ob prisotnosti 20% FCS.

Celice smo predhodno inkubirali z 1 mM oz. 0,1 mM serotoninom za 15 min, nato smo dodali 70 nM  $^3\text{H}$ -histamin in inkubirali še dodatnih 45 min pri 37 °C v pufru A 1 z dodanim FCS. Točke so prikazane kot srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6-9). \*\*\*p<0,001, \*p<0,05 v primerjavi s kontrolo.

Ko smo opazovali vpliv noradrenalina na privzem histamina v HUVEC, smo opazili inhibicijo privzema le pri najvišji uporabljeni koncentraciji (1 mM). Ta koncentracija noradrenalina je zmanjšala privzem histamina na 79% (Slika 18).



**Slika 18:** Vpliv 1 mM noradrenalina na privzem  $^3\text{H}$ -histamina v HUVEC ob prisotnosti 20% FCS.

Celice smo predhodno inkubirali z 1 mM noradrenalinom za 15 min, nato smo dodali 70 nM  $^3\text{H}$ -histamin in inkubirali še dodatnih 45 min pri 37 °C v pufru A1 z dodanim FCS. Točke so prikazane kot srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6). \*\*p<0,01 v primerjavi s kontrolo.

Zaključimo lahko, da je od uporabljenih biogenih amino v dopamin najbolj zmanjšal privzem histamina v HUVEC (v pufru ob prisotnosti FCS), sledil mu je serotonin, noradrenalin pa je imel najmanjši vpliv.

## 5 RAZPRAVA

Pri odraslem zdravem človeku je območje normalne fiziološke koncentracije histamina v plazmi od 1 do 10 nM. Ob ustreznem dražljaju pa lahko njegova koncentracija preseže normalno vrednost in sproži številne patološke reakcije. Povišana koncentracija histamina v plazmi lahko povzroči glavobol, rdečico, urtikarijo, povečano nastajanje želodčne kisline, povečanje srčne frekvence, znižanje arterijskega tlaka, bronhokonstrikcijo ali celo zastoj srca (9). Pri daljši izpostavljenosti endotelnih celic histaminu obstajajo dokazi o njegovem proaterogenem učinku. Histamin med drugim poviša izražanje adhezijskih molekul endotelnih celic in s tem okrepi interakcije med levkociti in endotelijem ter poveča proliferacijo gladkih mišičnih celic in njihovo migracijo (6). Histamin je pomemben za rast celic v zarodku, zato se med nosečnostjo njegova koncentracija v krvi poviša. Že majhna odstopanja od referenčnih vrednosti histamina v krvi lahko izzovejo patološke procese in zaplete nosečnosti (preeklampsija, nezadržno bruhanje, prezgodnji porod, prekinitev posteljice, grozeči ali spontani splav) (23).

Zaradi številnih patoloških učinkov histamina je zelo pomembna njegova inaktivacija, zato nas je pri diplomskem delu zanimalo, kako HUVEC sodelujejo pri inaktivaciji histamina.

Rezultati predhodnjih raziskav dokazujejo, da so HUVEC sposobne privzeti histamin v svojo notranjost (1, 4). Privzem je povezan z dvostopenjsko encimsko razgradnjo in pri njej sodelujeta znotrajcelični HNMT in zunajcelični DAO (3). Zato je za delovanje HNMT potreben prehod histamina preko membrane v celično notranjost. Privzem histamina v endotelne celice je temperaturno, koncentracijsko in časovno odvisen nasitljiv proces (1, 4) in vključuje najmanj dva mehanizma (7). Pri raziskavi so ugotovili, da en sistem privzema poteka pri 5 min inkubaciji, saj sta decinij 22 in triprolidin inhibirala privzem v začetni fazi. Glede na to, da je decinij 22 specifični inhibitor OCT in PMAT, lahko sklepamo na vpletjenost neselektivnih transporterjev pri začetni fazi. Mi smo se osredotočili na raziskovanje drugega sistema, ki vključuje kasnejšo fazo, saj smo za čas inkubacije porabili 45 min.

Pri poskusih smo uporabljali 70 nM koncentracijo  $^3\text{H}$ -histamina. Tako visoka koncentracija bi imela v krvi človeka patološki učinek. Zaradi povišane koncentracije v neposredni bližini celice, molekule histamina kar same silijo v njeno notranjost.

## 5.1 Ugotavljanje aktivnega in/ali pasivnega transporta s prenašalci pri privzemu histamina v HUVEC

Velike molekule, netopne v lipidnem dvosloju se prenašajo preko membrane v notranjost celice s pomočjo prenašalcev. Glede na porabo energije je ta transport lahko pasiven ali aktiven. Pasiven transport s prenašalci prenaša molekule v smeri koncentracijskega in električnega gradiента ter pri tem ne porablja energije. Aktiven transport pa prenaša molekule v smeri proti elektrokemijskemu gradiентu pri čemer prenašalci porabljo energijo. Pri primarnem aktivnem transportu je prenašalec hkrati encim, ki hidrolizira ATP. Npr.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaza. Pri sekundarnem aktivnem transportu pa sta sklopljena dva načina prenosa, kjer prenos ene molekule v smeri koncentracijskega gradienta omogoča prenos druge v obratni smeri od koncentracijskega gradienta (kotransport). Npr.  $\text{Na}^+$ -glukozni kotransport (25).

Da bi dokazali vpletjenost aktivnega oz. pasivnega transporta s prenašalci pri privzemu histamina, smo pri prvem poskusu v pufru A1 s holinom nadomestili vse  $\text{Na}^+$  ione, pri drugem poskusu pa smo celice inkubirali z ouabainom (kardiotonični glikozid in inhibitor  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPaze).

Odsotnost  $\text{Na}^+$  v zunajceličnem prostoru je vplivala na privzem histamina v pufru brez dodanega FCS in DAO in v pufru z dodanim FCS. Zaradi znižanega privzema histamina lahko sklepamo, da je privzem v teh dveh sistemih delno odvisen od  $\text{Na}^+$ , privzem ob dodanem DAO pa neodvisen. Naši rezultati privzema ob dodatku DAO niso v skladu z literaturo. Ugotovili so, da je privzem ob dodanem DAO odvisen od  $\text{Na}^+$  in da je njegova aktivnost konstantna v zelo širokem koncentracijskem območju  $\text{Na}^+$  (2). Ker je holin substrat/inhibitor za OCT2, OCT3 in PMAT, smo težko ločili, ali je bil privzem zmanjšan, ker ni bilo  $\text{Na}^+$ , ali je šlo za kompeticijo na nivoju substratov oz. inhibicijo prenašalca. Da bi lahko ločili oba učinka, bi morali narediti še poskuse, kjer bi  $\text{Na}^+$  zamenjali s substanco, ki ni hkrati substrat in inhibitor za OCT in PMAT (28). Ker je odsotnost  $\text{Na}^+$  oz. njegov

nadomestek holin zmanjšal privzem histamina v HUVEC v pufru brez dodanega FCS in DAO in v pufru z FCS, bi lahko sklepali, da se del histamina privzema tudi z aktivnim trasportom, ki je odvisen od gradiента  $\text{Na}^+$ . Še vseeno pa ne vemo, ali gre za primarni ali sekundarni aktivni transport. Na to vprašanje smo odgovorili z naslednjim poskusom.

Ouabain (inhibitor  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPaze) ni vplival na privzem histamina v nobenem sistemu, saj ni zmanjšal privzema histamina v pufru brez FCS in DAO, ne v pufru z dodanim FCS in ne v pufru z dodanim DAO. Zaradi tega rezultata lahko sklepamo, da se histamin ne privzema s primarnim aktivnim transportom. S tem poskusom smo bolj natančno definirali privzem histamina v HUVEC. Lahko zaključimo, da privzem histamina v HUVEC poteka v glavnem s pasivnim transportom s prenašalcem oz. se privzema tudi s pomočjo sekundarnega aktivnega transporta, kar pa je značilno za transporterje družine SLC.

## 5.2 Vpliv monoaminov na privzem histamina v HUVEC

Iz literature je znano, da se histamin prenaša preko celične membrane s pomočjo prenašalcev, saj ga je kar 96 % v krvi v monokationski obliki. Glede na predhodne rezultate raziskovalne skupine na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, smo predvidevali, da so za privzem histamina v HUVEC odgovorni OCT2 in/ali OCT3 (7) in/ali PMAT (31, 32). Tudi iz literature je znano, da je histamin substrat za OCT2, OCT3 in PMAT v drugih vrstah celic (8, 28, 29, 33).

Prisotnost neselektivnih transporterjev smo preverjali z dopaminom, serotoninom in noradrenalinom, ki so znani substrati/inhibitorji OCT in PMAT. Izbrali smo endogene mediatorje, ki so v prejšnji raziskavi (20) zmanjšali privzem histamina in ugotavljali njihov vpliv na privzem histamina tudi pri višjih koncentracijah. Najbolj pa nas je zanimal vpliv dopamina, ki je edini monoamin, za katerega rezultatov še ni na voljo.

Tako serotonin kot noradrenalin sta inhibirala privzem ob prisotnosti FCS v pufru, kar je v skladu s predhodnjo raziskavo (20). Serotonin in noradrenalin sta pri visokih koncentracijah tudi substrata in inhibitorja za OCT2, OCT3 in PMAT, zato bi lahko dodali, da je njuna inhibicija dodatni dokaz za vpletenost pasivnega transporta s prenašalcem, ki ga posredujejo neselektivni transporterji.

Dopamin je pričakovano najbolj inhibiral privzem ob prisotnosti FCS v pufru, vendar tako kot serotonin in noradrenalin samo pri visokih koncentracijah. Glede na naše rezultate lahko dodamo, da je dopamin najbolj vplival na inhibicijo privzema, nato serotonin in najmanj noradrenalin, saj je pri koncentraciji 1mM med njimi statistično signifikantna razlika. Dopamin pa ni imel pričakovanega vpliva na privzem ob prisotnosti DAO v pufru in v pufru brez FCS in DAO. Za razliko od serotoninina in noradrenalina je dopamin inhibiral privzem v obeh sistemih, kar lahko kaže na vpliv privzema histamina še preko drugih mehanizmov oziroma drugih transporterjev.

Rezultati vpliva monoaminov na privzem histamina v HUVEC so pokazali vpletjenost neselektivnih transporterjev. Z inhibicijo privzema histamina z znanimi substrati/inhibitorji OCT in PMAT smo ugotovili prispevek neselektivnih transporterjev pri privzemu histamina v HUVEC.

Lahko zaključimo, da HUVEC aktivno sodelujejo pri inaktivaciji histamina s privzemom v svojo notranjost in s tem igrajo pomembno vlogo pri zmanjševanju patoloških učinkov histamina. Velik prispevek pri mehanizmu transporta pa imajo neselektivni transporterji, preko katerih poteka privzem s pomočjo pasivnega transporta s prenašalcem.

## 6 SKLEP

Pri diplomskem delu smo želeli ugotoviti prispevek neselektivnih transporterjev na privzem histamina v endotelne celice oz. v HUVEC, saj s pomočjo privzema celice inaktivirajo histamin, ki se sprosti v krvni obtok iz bazofilcev in mastocitov. HUVEC smo inkubirali 45 min pri 37 °C v pufru za privzem. Z dodajanjem FCS in DAO v pufer za privzem smo želeli ugotoviti vpliv zunajceličnega okolja na inaktivacijo histamina. S pomočjo inkubacije s pufrom brez Na<sup>+</sup> in z dodatkom ouabaina v inkubacijsko tekočino smo ugotavljali vpliv aktivnega transporta pri privzemu histamina v HUVEC in s tem povečali verjetnost za morebitno vpletenost neselektivnih transporterjev. V inkubacijsko tekočino smo dodajali tudi različne endogene mediatorje (dopamin, serotonin, noradrenalin) ter spremljali njihov vpliv. Vse izbrane snovi so substrati/inhibitorji OCT in PMAT, tako da smo z njimi raziskali morebitni prispevek neselektivnih transporterjev.

Rezultate diplomskega dela lahko povzamemo z naslednjimi ugotovitvami:

1. Histamin se v HUVEC privzema predvsem s pasivnim transportom s prenašalcij, saj ouabain, inhibitor Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPaze, ne inhibira privzema histamina. Z ouabainom smo potrdili odsotnost mehanizma privzema s primarnim aktivnim transportom. Privzem histamina v HUVEC je odvisen od Na<sup>+</sup> ionov ob dodatku FCS in ni odvisen ob dodatku DAO. Za del privzema histamina, ki se poveča ob prisotnosti FCS, je odgovoren transport odvisen od Na<sup>+</sup> in to nakazuje vpletenost sekundarnega aktivnega transporta in s tem vpletenost še drugih načinov privzema histamina v HUVEC.
2. Monoamini dopamin, serotonin in noradrenalin inhibirajo privzem histamina v HUVEC ob prisotnosti FCS. Vsi trije so substrati/inhibitorji OCT in PMAT, zato z inhibicijo privzema potrjujejo prispevek pasivnega transporta, ki ga posredujejo neselektivni transporterji.

3. Dopamin inhibira privzem histamina v HUVEC ob prisotnosti DAO. Glede na to, da dopamin ni najboljši substrat za OCT2, OCT3 in PMAT, lahko sklepamo, da ti transporterji v tem primeru niso vpleteni v privzem histamina. Verjetno gre za privzem preko drugih transporterjev.

Pri diplomskem delu sem spoznala, da na rezultate lahko vpliva veliko dejavnikov. Biološki material je zelo variabilen in zato je bil vsak poskus zgodba zase. Verjetno bi bili rezultati veliko bolj enotni, če bi poskus delali na celični liniji in ne na primarnih celicah. Naše rezultate smo podajali na proteine, kar pa je večinoma zelo vplivalo na končni rezultat. Bolje bi bilo, da bi razultate podajali na število celic, za kar pa bi potrebovali pretočni citomer, ki bi preštel vse celice ter ločil žive od mrtvih. Naša metoda ne loči med histaminov privzetim v celico in histaminom vezanim na površino. Vezave na površino pa ne moremo popolnoma izključiti, kljub temu da smo na koncu celice 4-krat temeljito sprali s hladnim pufrom. To bi lahko bolje določili s pomočjo specifičnih protiteles za histamin. Najboljši način za potrditev prisotnosti oz. odsotnosti OCT2, OCT3, PMAT v HUVEC pa bi bil dokaz proteinov z metodo Western Blot, imunohistokemijo. Funkcionalnost bi potrdili, če bi izbili oz. utišali gen za posamezni transporter in potem preverili količino privzema v teh razmerah.

## 7 VIRI IN LITERATURA

1. Haddock RC, Mack P, Fogerty FJ, Baenziger NL: **Role of Receptors in Metabolic Interaction of Histamine with Human Vascular Endothelial Cells and Skin Fibroblasts.** The Journal of Biological Chemistry 1986; 262 (21): 10220-8.
2. Haddock RC, Mack P, Leal S, Baenziger NL: **The Histamine Degradative Uptake Pathway in Human Vascular Endothelial Cells and Skin Fibroblasts is Dependent on Extracellular Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>.** The Journal of Biological Chemistry 1990; 265 (24): 14395-401.
3. Baenziger NL, Mack P, Jong YJI, Dalemar LR, Perez N, Lindberg C, Wilhelm B, Haddock RC: **An Environmentally Regulated Receptor for Diamine Oxidase Modulates Human Endothelial Cell/Fibroblast Histamine Degradative Uptake.** The Journal of Biological Chemistry 1994; 269 (21): 14892-98.
4. Černe K, Irman Florjanc T, Kržan M: **Histamine uptake into human vascular endothelial cells and influence of three different antidepressant drugs.** Inflammation Research 2008; 57 (1): 37-8.
5. Z. Huszti: **Histamine uptake into non-neuronal brain cells.** Inflamm. res. 2003: 52; 1023-3830
6. Li H., Burkhardt C, Ulf-Rüdiger Heinrich, Isolde Brausch, Ning Xia, Ulrich Förstermann: **Histamine Upregulates Gene Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Human Vascular Endothelial Cells.** Circulation 2003; 107; 2348-2354.
7. Černe K, Kržan M: **Involvement of organic cation transporters in histamine uptake into human vascular endothelial cells.** Inflammation Research 2009; 58 (1): 61-2.

8. Stefan R. Hansson, Barbara Bottalico, Vera Noskova, Bertil Cassle'n: **Monoamine transporters in human endometrium and decidua.** Human Reproduction Update 2009;15;: 249–260.
9. Maintz L, Novak N: **Histamine and histamine intolerance.** The American Journal of Clinical Nutrition 2007; 85: 1185-96.
10. Foye WO: **Foye's Principles of Medicinal Chemistry.** 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008: 1004-9.
11. Rang HP, Dale MM, Flower RJ: **Rang & Dale's Pharmacology**, 6<sup>th</sup> Edition, Churchill Livingstone, Oxford, 2007: 8-53, 213-4.
12. Carl A. Gruetter, Belinda Bailey, L. Easterling, John L.: **Release of non-mast cell histamine from rat aorta.** Life Sciences 2002; 70; 1709–1717.
13. A.S. Tippens, C.A. Gruetter: **Detection of histidine decarboxylase mRNA in human vascular smooth muscle and endothelial cells.** Inflamm. Res. 2004;53; 215-216.
14. T. Holscaw, C. Wilson, G. Nichols: **Histamine uptake and metabolism in the blood vessels of rats.** Agents and Actions 1984; 15: 3-4.
15. Hollis TM, Rosen LA: **Histidine decarboxylase activity of bovine aortic endothelium and intima-media.** Proc Soc Exp Biol Med 1972; 14; 978–81.
16. Orlidge A, Hollis TM: **Aortic endothelial and smooth muscle histamine metabolism in experimental diabetes.** Arteriosclerosis 1982; 2: 142–50.

17. Fujimoto S, Yamamoto K, Ueda H, Hamasaki K, Nomiyama T: **Histamine disposition in endothelial specific granules of the toad aorta.** Acta Anat 1984; 118: 38–41.
18. Robinson-White A., Beaven MA: **Presence of histamine and histamine metabolizing enzyme in rat and guinea pig microvascular endothelial cells.** J Pharmacol Exp Ther 1982; 223: 440–5.
19. Ueda H, Doi Y, Sakamoto Y, Hamasaki K, Fujimoto S: **Simultaneous localization of histamine and Factor VIII-related antigen in endothelium of the human umbilical vein.** Anat Rec 1992; 232: 257–61.
20. Lara Prosen: **Farmakološka modulacija privzema histamina v endotelijske celice iz popkovnične vene človeka**, diplomsko delo, Ljubljana 2009: 38, 48-49.
21. Fujimoto S, Yamamoto K, Arashidani K, Hayabuchi I, Yoshizuka M, Nomiyama T: **Endothelial specific granules in the umbilical veins of the postnatal rabbit.** Cell Tissue Res 1982; 227: 509–18.
22. A.J. Sexton, A. Loesch, M. Turmaine, S. Miah, G. Burnstock: **Electron-microscopic immunlabelling of vasoactive substances in human umbilical endothelial cells and their actions in early and late pregnancy.** Cell tissue Res 1996; 284: 75-85,167-175
23. Brew O, Sullivan MHF: **The links between maternal histamine levels and complications of human pregnancy.** Journal of Reproductive Immunology 2006; 72: 94-107
24. Rajtar S: **Vpliv amitriptilina in sertralina na kinetiko eksogenega histamina v krvi mačke v in vitro poskusih.** Medicinski razgledi 2004; 43: 339-49.
25. Bresjanac M, Rupnik M: **Patofiziologija s temelji fiziologije**, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2002: 2-3

26. Boyer RF: **Temelji biokemije**, študentska založba, 2005: 231
27. Graeme Eisenhofer: **The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines.** Pharmacology & Therapeutics 2001; 9: 35– 62.
28. Karen Engel and Joanne Wang: **Interaction of Organic Cations with a Newly Identified Plasma Membrane Monoamine Transporter.** Mol Pharmacol 2005; 68: 1397–1407.
29. Koepsell H, Lips K and Volk C: **Polyspecific Organic Cation Transporters: Structure, Function, Physiological Roles, and Biopharmaceutical Implications.** Pharmaceutical Research 2007; 24 (7): 1227-51.
30. Koepsell H: **Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs.** Trends in Pharmacological Sciences 2004; 25 (7): 375-81.
31. K. Barnes, H. Dobrzynski, S. Foppolo, P. R. Beal, F. Ismat, E. R. Scullion, L. Sun, J. Tellez, M. W.L. Ritzel, W. C. Claycomb, C. E. Cass, J. D. Young, R. Billeter-Clark, Mark R. Boyett and Stephen A. Baldwin: **Distribution and Functional Characterization of Equilibrative Nucleoside Transporter-4, a Novel Cardiac Adenosine Transporter Activated at Acidic pH.** Circ. Res. 2006; 99: 510-519.
32. P. Casanello, C. Escudero and L. Sobrevia: **Equilibrative Nucleoside (ENTs) and Cationic Amino Acid (CATs) Transporters: Implications in Foetal Endothelial Dysfunction in Human Pregnancy Diseases.** Current Vascular Pharmacology 2007; 5: 69-84.
33. M. Hayer-Zillgen, M. Bruss, H. Bonisch: **Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3.** British Journal of Pharmacology 2002; 136: 829 ± 836.

34. M. Ogasawara, K. Yamauchi, Y. Satoh, R. Yamaji, K. Inui, J. W. Jonker, A. H. Schinkel, K. Maeyama: **Recent advances in molecular pharmacology of the histamine systems: Organic cation transporters as a histamine transporter and histamine metabolism.** J Pharmacol Sci 2006; 101: 24–30.
35. Karen Engel, Mingyan Zhou, Joanne Wang: **Identification and characterization of a novel Monoamine Transporter in the human brain.** The journal of biological chemistry 2004; 48: 279.
36. Marin V, Kaplanski G, Grès S, Farnarier C, Bongrand P: **Endothelial cell culture protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells.** Journal of Immunological Methods 2001; 254: 183-90.
37. Ferreira SH, NG KK, Vane JR: **The continuous bioassay of the release and disappearance of histamine in the circulation.** British Journal of Pharmacology 1973; 49: 543-53.
38. <http://en.wikipedia.org/wiki/Ouabain>