

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KRISTINA PESTOTNIK

**DIPLOMSKA NALOGA**  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KRISTINA PESTOTNIK

**VPLIV DEVTERACIJE NA VEZAVNE LASTNOSTI  
HISTAMINSKEGA RECEPTORJA H<sub>2</sub> V ASTROCITIH  
NEONATALNE PODGANE**

**THE INFLUENCE OF DEUTERATION ON BINDING  
CHARACTERISTICS OF HISTAMINE H<sub>2</sub> RECEPTOR IN  
NEWBORN RAT ASTROCYTES**

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Mojce Kržan, dr. med. in somentorstvom doc. dr. Janeza Mavrija, dipl.ing. kem.

## **Zahvala**

Iskrena hvala mentorici prof. dr. Mojci Kržan za vso strokovno pomoč, nasvete, prijateljstvo in omogočanje novih izzivov v prihodnosti. Hvala tudi somentorju doc. dr. Janezu Mavriju za vse izčrpne razlage in koristne napotke pri nastajanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tehnični sodelavki Jožici Košir za ves 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 – mami, očiju in Veroniki, ki so mi omogočili študij, verjeli vame in me podpirali na vsakem koraku. Še posebno pa hvala Nejcju za nenehno vzpodbudo, potrpežljivost, strokovne nasvete in neskončno zaupanje vame.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Mojce Kržan, dr. med. in somentorstvom doc. dr. Janeza Mavrija, dipl. ing. kem.

Kristina Pestotnik

# KAZALO VSEBINE

POVZETEK.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV.....	X
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. ŽIVČNI SISTEM.....	1
1.2. PRENOS INFORMACIJE V ŽIVČEVJU.....	2
1.2.1. ELEKTRIČNO VZDRAŽENJE CELIC .....	2
1.2.2. KEMIČNI SIGNALI PREKO SINAPS .....	3
1.3. CELICE V OSREDNJEM ŽIVČEVJU .....	4
1.3.1. ASTROCITI.....	5
1.3.1.1. Funkcije astrocitov .....	6
1.3.1.2. Astrociti in histamin .....	8
1.3.1.3. Vloga astrocitov pri patoloških procesih.....	8
1.3.1.4. Potencialne terapevtske možnosti .....	9
1.4. NEVROTRANSMITORJI.....	10
1.5. HISTAMIN.....	11
1.5.1. BIOSINTEZA, SPROŠČANJE IN INAKTIVACIJA.....	12
1.5.2. HISTAMINERGIČNI SISTEM V OSREDNJEM ŽIVČEVJU .....	13
1.5.3. VLOGA HISTAMINA V ORGANIZMU .....	15
1.5.3.1. Učinki histamina v osrednjem živčevju .....	15
1.6. HISTAMINSKI RECEPTORJI .....	17
1.6.1. MEHANIZMI, ODGOVORNI ZA PRENOS INFORMACIJE V CELICO .....	19
1.6.2. STRUKTURA HISTAMINSKEGA RECEPTORJA H <sub>2</sub> .....	21
1.7. INTERAKCIJA RECEPTOR - LIGAND .....	23
1.7.1. VODIKOVA VEZ IN DEVTERACIJA .....	24
<b>2. NAMEN DELA</b> .....	<b>26</b>

<b>3. MATERIALI IN METODE</b> .....	27
3.1. MATERIALI .....	27
3.1.1. SESTAVA RAZTOPIN .....	28
3.1.2. POSKUSNE ŽIVALI .....	29
3.2. METODE .....	29
3.2.1. PRIPRAVA PRIMARNIH KULTUR ASTROCITOV .....	29
3.2.2. DOLOČITEV KONCENTRACIJE PROTEINOV .....	30
3.2.3. VEZAVA <sup>3</sup> H-TIOTIDINA NA RECEPTORJE H <sub>2</sub> V ASTROCITIH .....	31
3.2.3.1. Saturacijska vezava <sup>3</sup> H-tiotidina .....	31
3.2.3.2. Inhibicija specifične vezave <sup>3</sup> H-tiotidina .....	33
3.2.4. RAČUNANJE PARAMETROV VEZAVNIH ŠTUDIJ .....	33
3.2.4.1. Določanje parametrov specifične vezave <sup>3</sup> H-tiotidina .....	33
3.2.4.2. Določanje parametrov inhibicije specifične vezave <sup>3</sup> H-tiotidina .....	34
3.2.5. OBDELAVA PODATKOV .....	35
<b>4. REZULTATI</b> .....	36
4.1. SATURACIJSKA VEZAVA <sup>3</sup> H-TIOTIDINA V FOSFATNEM PUFRU .....	36
4.2. SATURACIJSKA VEZAVA <sup>3</sup> H-TIOTIDINA V FOSFATNEM PUFRU V TEŽKI VODI .....	38
4.3. INHIBICIJA SPECIFIČNE VEZAVE <sup>3</sup> H-TIOTIDINA V FOSFATNEM PUFRU .....	41
4.4. INHIBICIJA SPECIFIČNE VEZAVE <sup>3</sup> H-TIOTIDINA V FOSFATNEM PUFRU V TEŽKI VODI .....	43
<b>5. RAZPRAVA</b> .....	49
5.1. VEZAVNE KARAKTERISTIKE HISTAMINSKEGA RECEPTORJA H <sub>2</sub> .....	50
5.2. SPREMEMBE VEZAVNIH LASTNOSTI HISTAMINSKIH RECEPTORJEV H <sub>2</sub> NA ASTROCITIH, INKUBIRANIH V D <sub>2</sub> O .....	52
<b>6. SKLEP</b> .....	54
<b>7. VIRI IN LITERATURA</b> .....	55

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Komunikacija med nevroni v osrednjem živčevju .....	3
<b>Slika 2:</b> Zgradba nevrona v osrednjem živčevju.....	4
<b>Slika 3:</b> Mikroskopska slika astrocitov .....	6
<b>Slika 4:</b> Struktura histamina.....	11
<b>Slika 5:</b> Tautomerni obliki molekule histamina.....	11
<b>Slika 6:</b> Biotransformacija histamina.....	13
<b>Slika 7:</b> Histaminergični sistem v možganih .....	14
<b>Slika 8:</b> Poti, po katerih histaminski receptorji aktivirajo transmembranske in znotrajcelične procese.....	21
<b>Slika 9:</b> Shematska ponazoritev strukture receptorja H <sub>2</sub> in vezavnih mest za histamin .....	22
<b>Slika 10:</b> Vezavna mesta za molekulo histamina na receptorju H <sub>2</sub> .....	23
<b>Slika 11:</b> Ubbelohdejev efekt.....	25
<b>Slika 12:</b> Totalna, nespecifična in specifična vezava <sup>3</sup> H-tiotidina na astrocite v odvisnosti od koncentracije radioliganda (fosfatni pufer) .....	37
<b>Slika 13:</b> Totalna, nespecifična in specifična vezava <sup>3</sup> H-tiotidina na astrocite v odvisnosti od koncentracije radioliganda (fosfatni pufer v devterirani vodi).....	39
<b>Slika 14:</b> Specifična vezava <sup>3</sup> H-tiotidina na astrocite v odvisnosti od koncentracije radioliganda..	40
<b>Slika 15:</b> Inhibicija specifične vezave <sup>3</sup> H-tiotidina na astrocitih v odvisnosti od različnih koncentracij agonista (histamin) in antagonistov (cimetidin, mepiramin) histaminskih receptorjev (fosfatni pufer).....	42
<b>Slika 16:</b> Inhibicija specifične vezave <sup>3</sup> H-tiotidina na astrocitih v odvisnosti od različnih koncentracij agonista (histamin) in antagonistov (cimetidin, mepiramin) histaminskih receptorjev (fosfatni pufer v devterirani vodi) .....	44
<b>Slika 17:</b> Primerjava inhibicije specifične vezave <sup>3</sup> H-tiotidina na astrocite v odvisnosti od različnih koncentracij histamina (agonist histaminskih receptorjev) v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H <sub>2</sub> O) in v fosfatnem pufru v težki vodi (D <sub>2</sub> O).....	45
<b>Slika 18:</b> Primerjava inhibicije specifične vezave <sup>3</sup> H-tiotidina na astrocite v odvisnosti od različnih koncentracij cimetidina (antagonist histaminskih receptorjev H <sub>2</sub> ) v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H <sub>2</sub> O) in v fosfatnem pufru v težki vodi (D <sub>2</sub> O).....	46
<b>Slika 19:</b> Primerjava inhibicije specifične vezave <sup>3</sup> H-tiotidina na astrocite v odvisnosti od različnih koncentracij mepiramina (antagonist histaminskih receptorjev H <sub>1</sub> ) v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H <sub>2</sub> O) in v fosfatnem pufru v težki vodi (D <sub>2</sub> O).....	47

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica I:</b> Tkivno izražanje in glavni učinki aktiviranih histaminskih receptorjev. ....	18
<b>Preglednica II:</b> Sestava preparacijske raztopine. ....	28
<b>Preglednica III:</b> Sestava hranilnega medija. ....	28
<b>Preglednica IV:</b> Sestava raztopine za razredčevanje <sup>3</sup> H-tiotidina. ....	28
<b>Preglednica V:</b> Sestava 0,5 M Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> fosfatnega pufru. ....	28
<b>Preglednica VI:</b> Časovni prikaz poteka vezavnega poskusa. ....	32
<b>Preglednica VII:</b> Vrednosti K <sub>D</sub> in B <sub>max</sub> za specifično vezavo <sup>3</sup> H-tiotidina na histaminski receptor H <sub>2</sub> v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H <sub>2</sub> O) ter v fosfatnem pufru v težki vodi (D <sub>2</sub> O). ....	40
<b>Preglednica VIII:</b> Vrednosti pIC <sub>50</sub> za posamezne inhibitorje v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H <sub>2</sub> O) ter v fosfatnem pufru v težki vodi (D <sub>2</sub> O). ....	48
<b>Preglednica IX:</b> Vrednosti K <sub>i</sub> za posamezne inhibitorje v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H <sub>2</sub> O) ter v fosfatnem pufru v težki vodi (D <sub>2</sub> O). ....	48
<b>Preglednica X:</b> Vrednosti nH za posamezne inhibitorje v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H <sub>2</sub> O) ter v fosfatnem pufru v težki vodi (D <sub>2</sub> O). ....	48

## POVZETEK

Histamin je pomemben živčni prenašalec v osrednjem živčevju, saj koordinira senzorične, motorične, vegetativne in hormonske funkcije v organizmu. Učinke v osrednjem živčevju posreduje preko aktivacije histaminskih receptorjev  $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$  in  $H_4$ . Pomembne tarčne celice histaminergičnih nevronov so astrociti, ki so najštevilčnejše celice glije in imajo pomembno vlogo pri fizioloških in patofizioloških procesih v možganih. Na njihovi površini so do sedaj identificirali receptorje  $H_1$  in  $H_2$ .

Histaminski receptorji  $H_2$  vsebujejo sedem hidrofobnih transmembranskih področij. Predvideva se, da je Asp<sup>98</sup> na tretjem transmembranskem področju primarno vezavno mesto za pozitivno nabiti dušikov atom na stranski verigi histaminske molekule. Asp<sup>186</sup> in Thr<sup>190</sup> na petem transmembranskem področju sta pomembna za tvorbo vodikovih vezi z dušikovimi atomi v imidazolnem obroču histamina.

Za interakcijo histamina z receptorjem so torej pomembne vodikove vezi. Na histaminski receptor se lahko vežejo različni ligandi - agonisti in antagonisti. Če zamenjamo protone, udeležene v vodikovi vezi, z atomi devterija, ki so dvakrat težji, se spremenijo medmolekularne in intramolekularne razdalje. S tem vplivamo na strukturo in stabilnost receptorja in ligandov, kar se odraža v spremembi parametrov vezave liganda na receptor.

V raziskavi smo želeli določiti vezavne karakteristike histaminskega receptorja  $H_2$  v astrocitih možganske skorje neonatalnih podgan, vzgojenih v primarni kulturi, in preučiti vpliv vodikovih vezi na vezavo ligandov na receptor.

Najprej smo z uporabo vezavnih študij z radioligandom identificirali vezavna mesta na histaminskem receptorju  $H_2$  v astrocitih in določili njegove molekularno-farmakološke značilnosti v fizioloških razmerah.  $^3\text{H}$ -tiotidin se je vezal na homogeno populacijo vezavnih mest z maksimalno gostoto  $23,9 \pm 4,9$  fmol/mg proteina in ravnotežno disociacijsko konstanto  $5,6 \pm 2,3$  nM. Specifična vezava  $^3\text{H}$ -tiotidina je bila v koncentracijskem območju 1-11 nM nasitljiva in reverzibilna. Potrditev, da se je  $^3\text{H}$ -tiotidin res vezal na funkcionalni receptor  $H_2$ , so dali rezultati inhibicijskih vezavnih študij, kjer je  $H_2$  selektiven antagonist cimetidin z višjo afiniteto izpodrival vezan tiotidin kot mepiramin, ki je  $H_1$  selektiven antagonist.

Dodatek devterirane vode ( $\text{D}_2\text{O}$ ) v inkubacijski medij je povzročil, da so se protoni, udeleženi v vodikovih vezeh, zamenjali z atomi devterija. Tako smo spremenili medmolekularne in intramolekularne razdalje v molekuli receptorja in njegovi okolici.



Posledično se je zmanjšala afiniteta  $^3\text{H}$ -tiotidina do vezavnih mest na histaminskem receptorju  $\text{H}_2$ . Zmanjšala se je tudi afiniteta cimetidina, pri histaminu se je povečala, pri mepiraminu pa je ostala nespremenjena. Spremenila se je tudi oblika inhibicijskih krivulj - pri histaminu je postala bolj položna, pri cimetidinu bolj strma, inhibicijska krivulja mepiramina pa se ni spremenila.

Zaključimo lahko, da je vodikova vez zelo pomembna za vezavo ligandov na histaminski receptor  $\text{H}_2$ . Devteracija povzroči spremembo razdalje in s tem tudi jakosti vodikovih vezi, kar posledično vpliva na vezavne lastnosti histaminskega receptorja  $\text{H}_2$ .

Ključne besede: astrociti, histamin, histaminski receptor  $\text{H}_2$ , devteracija

## ABSTRACT

Histamine is an important neurotransmitter in the central nervous system, as it regulates sensory, motor, vegetative and hormonal functions in the organism. Its numerous effects in the central nervous systems are mediated by activation of histamine H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> in H<sub>4</sub> receptors. Important targets of histaminergic neurons are astrocytes, by far most numerous glial cells, which have an important role in physiological and pathophysiological processes in the brain. Previous studies have indicated that astrocytes express histamine H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptors.

Histamine H<sub>2</sub> receptors contain seven hydrophobic transmembrane domains. It is assumed the third-transmembrane Asp<sup>98</sup> is the primary binding site for the positively charged nitrogen of the side chain of histamine. Asp<sup>186</sup> and Thr<sup>190</sup> of the fifth-transmembrane domain form hydrogen bonds with imidazole nitrogen atoms of histamine.

Therefore, hydrogen bonds are crucial for the interaction of histamine with the receptor. Histamine receptors form interactions with various ligands - agonist and antagonists. When protons, involved in hydrogen bonds, are replaced by deuterium, which weights twice as much, intermolecular and intramolecular distances change. This affects the structure and stability of the receptor and ligands, which reflects in modification of ligand binding characteristics.

In the present study, our goal was to determine binding characteristics of histamine H<sub>2</sub> receptor subtype on newborn rat cortical astrocytes in primary culture, and to study the influence of hydrogen bonds on the binding of ligands to receptor.

With saturation binding experiments using radioligand, we identified binding sites of histamine H<sub>2</sub> receptor in astrocytes and determined its molecular-pharmacological properties in physiological conditions. Binding of <sup>3</sup>H-tiotidine revealed the existence of a homogeneous population of binding sites with maximal binding capacity  $23.9 \pm 4.9$  fmol/mg protein and dissociation constant  $5.6 \pm 2.3$  nM. Binding of <sup>3</sup>H-tiotidine in the concentration range 1-11 nM was saturable and reversible. Specific binding of <sup>3</sup>H-tiotidine to the functional H<sub>2</sub> receptor was further confirmed by competition binding studies using different concentrations of various inhibitors. Cimetidine, a specific H<sub>2</sub>-receptor antagonist, showed higher affinity in displacing <sup>3</sup>H-tiotidine than mepyramine, which is a specific H<sub>1</sub>-receptor antagonist.

The deuterated water (D<sub>2</sub>O) in incubation medium caused that protons, involved in hydrogen bonds, were replaced by atoms of deuterium. This changed intramolecular and intermolecular distances in the receptor molecule and its environment, which resulted in lower affinity of <sup>3</sup>H-tiotidine for the binding sites of histamine H<sub>2</sub> receptor. Therefore, it led to a lower affinity of cimetidine, but higher of histamine. The affinity of mepyramine has not been changed. Inhibition curves have been altered – inhibition curve of histamine became gentler, by cimetidine steeper and by mepyramine it stayed unchanged.

In conclusion, we showed the significance of hydrogen bonds regarding the binding of ligands to histamine H<sub>2</sub> receptor. Deuteration changes the distance and therefore the strength of hydrogen bonds, which affects the binding characteristics of histamine H<sub>2</sub> receptor.

Key words: astrocytes, histamine, histamine H<sub>2</sub> receptor, deuteration

## SEZNAM OKRAJŠAV

AC	adenilat-ciklaza
ATP	adenozin-5'-trifosfat
BDNF	nevrotrofični dejavnik možganskega izvora (brain-derived neurotrophic factor)
cAMP	ciklični adenozin-3',5'-monofosfat
CNTF	ciliarni nevrotrofični dejavnik (ciliary neurotrophic factor)
CPM	število zaznav na minuto (counts per minute)
D <sub>2</sub> O	devterirana (težka) voda
DAG	1,2-diacilglicerol
DAO	diamino-oksidaza
DMEM	po Dulbeccu modificiran Eaglov medij (Dulbecco's modified Eagle medium)
ECL	enterokromafinim celicam podobne celice (enterochromaffin-like cells)
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina (ethylenediaminetetraacetic acid)
GABA	γ-aminomaslena kislina
GDNF	nevrotrofični dejavnik glialnega izvora (glial-derived neurotrophic factor)
GDP	gvanozin-5'-difosfat
GFAP	glialna fibrilarna kislina beljakovina (glial fibrillary acidic protein)
GTP	gvanozin-5'-trifosfat
HDC	histidin-dekarboksilaza
HNMT	histamin-N-metiltransferaza
IP <sub>3</sub>	inozitol-1,4,5-trifosfat
L-15	Leibovitz-ev medij
MAO-B	monoamin-oksidaza B
NGF	živčni rastni dejavnik (nerve growth factor)
OCT	organski kationski transporter (organic cation transporter)
PBS	fosfatni pufer (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
PIP <sub>2</sub>	fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat
PKA	protein-kinaza A
PKC	protein-kinaza C
PLC	fosfolipaza C
PLP	piridoksal-5'-fosfat

# 1. UVOD

## 1.1. ŽIVČNI SISTEM

Ljudje v sposobnosti izkoriščanja svojega okolja daleč presegajo živali. Izredna raznolikost človeškega vedenja in kompleksnost okolja, ki so ga bili sposobni ustvariti, je odvisna od prefinjenosti nabora čutnih receptorjev, povezanih z zelo fleksibilnim spletom živcev – možgani. Ti so sposobni razločevanja nešteti dogodkov v okolju. Živčni sistem omogoča, da stalen dotok informacij preko senzoričnih receptorjev možgani sestavijo v zaznave in nato v primerne vedenjske odzive (1).

Živčni sistem je zapleteno omrežje nevronov (živčnih celic), ki omogoča organizmu, da deluje skladno z okoljem. Z njim telo zaznava zunanji svet in uravnava notranjega. Opravlja številne funkcije, saj omogoča razne vrste zaznav, uravnava gibanje, nadzoruje in usklajuje delovanje organskih sistemov v telesu ter ima vlogo pri kompleksnih procesih v možganih (2).

Živčni sistem lahko razdelimo na periferno in centralno živčevje. Periferni živčni sistem predstavlja vmesno povezavo med osrednjim živčevjem in okoljem. Osrednje živčevje obsega možgane in hrbtenjačo ter je odgovorno za obdelavo in odziv na dražljaje, ki preko perifernih živcev prihajajo iz okolja (3). Endotelijske celice možganskih kapilar in astrociti tvorijo med osrednjim živčevjem in ostalim delom telesa krvno-možgansko pregrado, ki je selektivno prepustna za prehajanje snovi iz krvnega obtoka v možgane in prepušča le majhne lipofilne molekule. Majhne hidrofilne molekule, kot so nekatere aminokisliline in glukoza, pa se prenašajo aktivno, s pomočjo prenašalcev. Na ta način krvno-možganska pregrada ščiti možgane pred škodljivimi dejavniki (2).

Živčevje vretenčarjev obsega vegetativno ali avtonomno živčevje (simpatik, parasimpatik) in somatsko živčevje. Poglavitna vloga vegetativnega živčevja, ki deluje neodvisno od naše volje, je uravnavanje delovanja notranjih organov (srce, gladke mišice, žleze) in tako vzdrževanje homeostaze v organizmu. Somatsko živčevje je pod vplivom naše zavesti in nadzira delovanje skeletnih mišic (4).

## 1.2. PRENOS INFORMACIJE V ŽIVČEVJU

Informacija se vzdolž nevrona po živčnem vlaknu prenaša kot potujoča sprememba membranskega potenciala, med posameznimi nevroni pa kemično, s pomočjo živčnih prenašalcev preko sinaps (1).

### 1.2.1. ELEKTRIČNO VZDRAŽENJE CELIC

Nevroni so vzdražne celice, ki omogočajo proženje in prevajanje živčnih signalov po telesu. Proces prevajanja poteka na membrani nevrona. Živčne celice v mirovanju vzdržujejo mirovni membranski potencial. Med zunanjo in notranjo stranjo celične membrane namreč obstaja razlika v električni napetosti okoli 70 mV. Notranja površina celične membrane je glede na zunanjo površino elektronegativna, celična membrana je torej polarizirana. Živčni impulz sproži trenutno spremembo v napetosti membrane, pride do depolarizacije. **Akcijski potencial** se sproži, ko depolarizacija doseže vrednost prazne napetosti. Tedaj se prehodno, za zelo kratek čas, močno poveča prevodnost membrane za Na<sup>+</sup> ione, ki vdrejo v celico. Takoj za depolarizacijo se natrijevi kanali zaprejo, čemur sledi aktivacija in odprtje kalijevih kanalov. Spremeni se prevodnost membrane za K<sup>+</sup> ione, ki stečejo iz celice. Membrana se repolarizira in preko vmesne hiperpolarizacije vrne na mirovni membranski potencial (5).

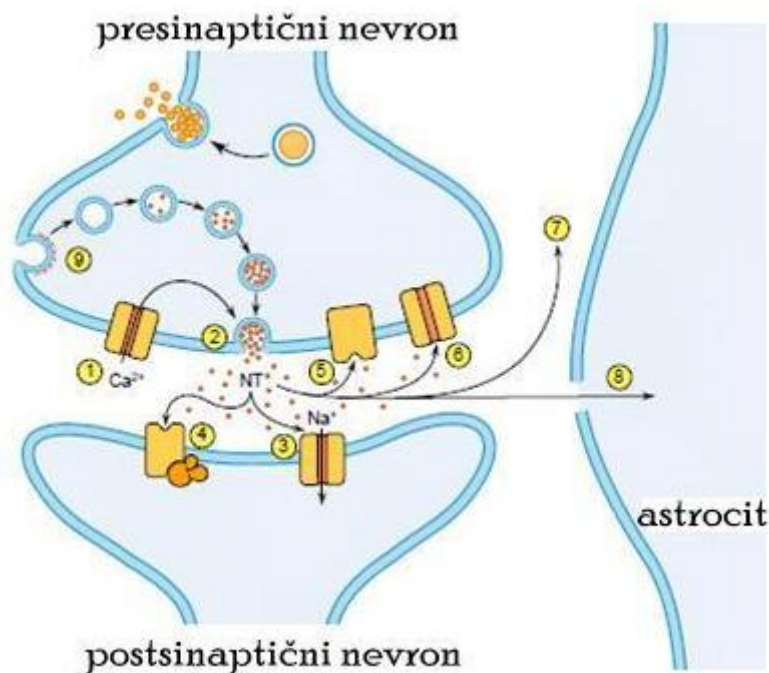
Živčni signal se prenaša z akcijskim potencialom, ki potuje vzdolž membrane nevrona. Sprememba napetosti namreč povzroči depolarizacijo sosednjih delov membrane, zato se akcijski potencial sproži tudi v teh delih membrane in se tako širi vzdolž živčnega vlakna. Del membrane, preko katerega je prešel, postane prehodno neobčutljiv za nove dražljaje. Refraktarnost membrane tako omogoča enosmerno prevajanje akcijskega potenciala vzdolž živčnega vlakna (6, 7).

Glede na smer prevajanja informacij ločimo aferentne in eferentne nevrone. Aferentni nevroni prenašajo informacije o dogodkih na periferiji do osrednjega živčevja, eferentni nevroni pa v obratni smeri posredujejo ukaze osrednjega živčevja perifernim tarčnim tkivom. Vmesni internevroni so najštevilnejši nevroni v osrednjem živčevju, ki povezujejo delovanje aferentnega in eferentnega sistema (4).

### 1.2.2. KEMIČNI SIGNALI PREKO SINAPS

**Sinapsa** je stik med dvema sosednjima nevronoma - med koncem aksona (presinaptični nevron) na eni strani ter dendriti ali telesom drugega nevrona (postsinaptični nevron) na drugi strani. Ko akcijski potencial doseže aksonske končiče presinaptičnega nevrona, se iz njih sprosti za dani nevron značilni neurotransmiter. Ta se veže na zanj specifične receptorje na membrani postsinaptičnega nevrona. Aktivacija receptorja sproži nadaljnje, za določen neurotransmiter značilne celične procese in privede do želenega učinka v postsinaptični celici (6).

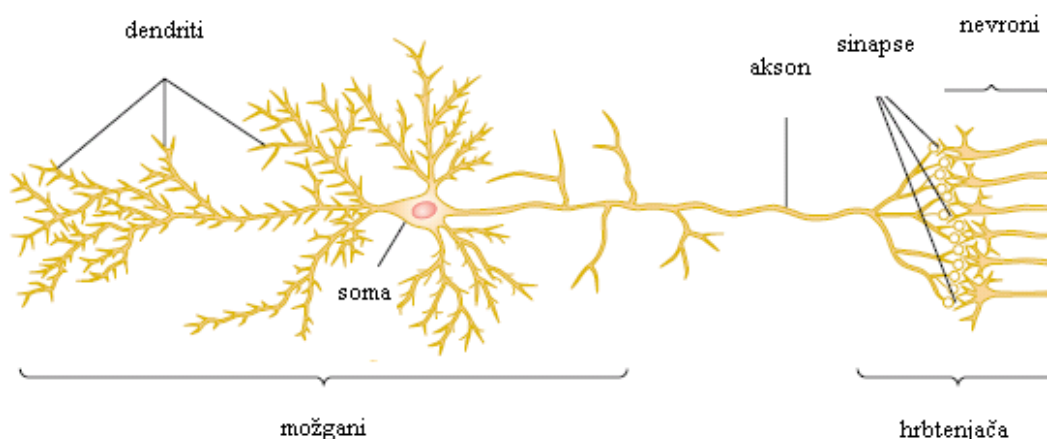
Čas, potreben za prenos informacije preko sinapse, je razmeroma dolg v primerjavi s hitrostjo potovanja akcijskega potenciala vzdolž aksona. Vsaka sinapsa na živčni poti zato povzroči zamudo (tako imenovana sinaptična zakasnitev). Več kot je sinaps na živčni poti, počasnejši je prenos informacije po njej (7).



**Slika 1: Komunikacija med nevroni v osrednjem živčevju.** Akcijski potencial sproži v presinaptičnem nevronu odprtje napetostno odvisnih kalcijevih kanalov (1). Vdor Ca<sup>2+</sup> ionov v celico povzroči eksocitozo veziklov, v katerih so shranjeni neurotransmiterji (NT), v sinaptično špranjo (2). Sproščeni neurotransmiter se veže na receptorje na postsinaptični celici, ki so lahko povezani z ionskimi kanali (3) ali pa so sklopljeni s proteinom G (4). Receptorji se nahajajo tudi na presinaptični celici (5) in lahko inhibirajo ali pospešijo eksocitozo neurotransmiterjev ob kasnejši depolarizaciji. Sproščeni neurotransmiter se lahko inaktivira s ponovnim privzemom v presinaptično celico s pomočjo transportnega proteina (6), lahko se razgradi v sinaptični špranji (7), lahko pa ga privzamejo celice glje - astrociti (8). Membrana sinaptičnega vezikla se reciklira z endocitozo v presinaptično celico (9) (prirejeno po 7).

### 1.3. CELICE V OSREDNJEM ŽIVČEVJU

**Nevroni ali živčne celice** so temeljni gradniki živčevja. Njihova poglavitna vloga je proženje in prevajanje živčnih impulzov in s tem prenos informacije v živčnem sistemu. Morfološko so sestavljeni iz telesa – some, krajših in razvejanih izrastkov – dendritov ter daljšega izrastka – aksona. Telesa večine nevronov sestavljajo osrednji živčni sistem, ki pri vretenčarjih obsega možgane in hrbtenjačo, izrastki nevronov pa predstavljajo periferni živčni sistem (2). Centralni živčni sistem vsebuje več kot 100 milijard nevronov (5).



Slika 2: Zgradba nevrona v osrednjem živčevju: živčna celica je sestavljena iz telesa (some), krajših izrastkov (dendritov) in daljšega izrastka (aksona) (povzeto po 5).

Poleg nevronov imajo pomembno vlogo v živčevju tudi **celice glije**. Le-teh je v osrednjem živčevju človeka desetkrat več kot nevronov (2). Ime glija izhaja iz grške besede za lepilo, saj je dolgo veljalo, da celice glije nimajo posebne vloge pri višjih možganskih funkcijah, temveč delujejo le kot možgansko lepilo, ki skrbi, da so nevroni pravilno razporejeni v osrednjem živčevju. Čeprav niso neposredno udeležene pri prenosu informacije v živčevju, danes vemo, da imajo celice glije pomembno vlogo v živčnem sistemu. Nevronom nudijo podporo in s tem vzdržujejo strukturo možganov, sodelujejo pri komunikaciji med nevroni, med razvojem možganov usmerjajo migracijo nevronov. Nekatere celice tvorijo mielinske ovojnice okoli aksonov in tako predstavljajo izolacijsko snov. Celice glije sodelujejo pri vzdrževanju krvno–možganske pregrade, prav tako imajo tudi pomembno vlogo pri regeneraciji živčevja. Izločajo številne rastne dejavnike, živčne prenašalce in citokine ter tako neposredno posegajo v dogajanja v osrednjem živčevju (1, 8).

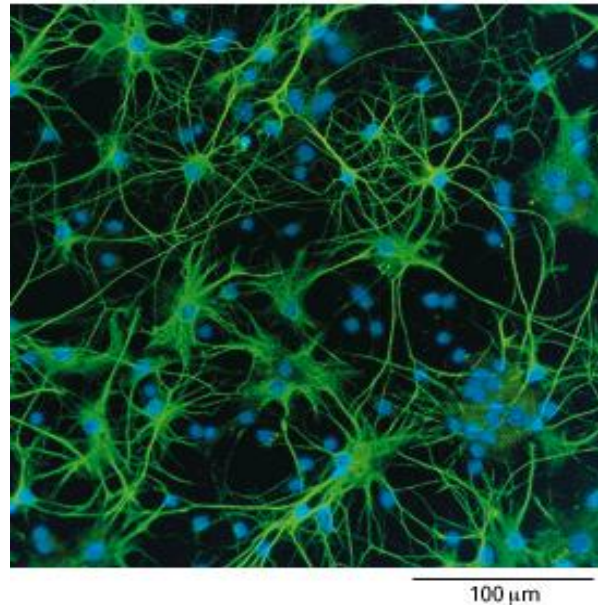


Glijo v perifernem živčevju predstavljajo Schwannove celice, ki ovijajo aksone in tvorijo lipidni izolacijski sloj – mielin. Ta omogoča izredno hiter prenos živčnih impulzov preko aksonov. V osrednjem živčevju obstaja več vrst glije – **mikroglija** in **makroglija**, ki jo tvorijo oligodendrociti in astrociti. Mikroglija obsega celice, ki so po funkciji del nespecifičnega obrambnega sistema, imajo sposobnost fagocitoze in se mobilizirajo ob poškodbi, infekciji ter drugih boleznih. Embriološko so popolnoma drugačnega izvora kot ostale celice v živčevju (1). Oligodendrociti ovijajo aksone s številnimi navoji svoje membrane in tako tvorijo mielinske ovojnice za aksone v osrednjem živčevju. Imajo podobno vlogo kot Schwannove celice v perifernem živčevju, poglavitna razlika je v obsegu mielinizacije. Vsak oligodendrocit ovije tudi do 15 aksonov, medtem ko Schwannova celica lahko ovije le en sam akson (2). Astrociti so številčno najbolj zastopane celice glije in so ključni za vzdrževanje homeostaze v osrednjem živčevju, omogočajo delovanje nevronov in imajo še številne pomembne funkcije (3).

### 1.3.1. ASTROCITI

Astrociti so najštevilčnejše celice nevroglije, ki imajo pomembno vlogo pri razvoju, fizioloških in patoloških procesih v možganih. Njihovo ime izvira iz nepravilne oblike telesa in dolgih izrastkov, ki spominjajo na zvezdo. So edine celice, ki vsebujejo glialno fibrilarno kislino beljakovino (GFAP), ki omogoča s pomočjo imunohistokemijskega barvanja določevanje njihove prisotnosti (7). Tvorijo številne presledkovne stike (angl. *gap-junctions*), ki omogočajo medcelično komunikacijo tako z astrociti kot z nevroni, predvsem z uporabo kalcijevih tokov (8).

V odraslem obdobju ločimo različne tipe astrocitov: protoplazmatski v sivi substanci, vlaknasti astrociti v možganski belini in specializirani astrociti (npr. Bergmannova glija, Müllerjeve celice, pituiciti) (3, 8). Protoplazmatski astrociti imajo krajše, debelejšje in zelo razvejane izrastke, vlaknasti pa daljše, tanjše in manj razvejane. Na njihovo obliko vpliva predvsem aktivnost živčnih končičev v njihovi neposredni okolici (3).



Slika 3: Mikroskopska slika astrocitov. Izrastki astrocitov so obarvani zeleno s protitelesi proti GFAP, jedrna DNA je obarvana modro (povzeto po 9).

Astrociti imajo edinstveno lastnost, da lahko spreminjajo svojo obliko in funkcijo glede na razmere v okolju. V razvojnem in odraslem obdobju imajo zato popolnoma različne vloge. Svojo obliko spremenijo tudi po poškodbi osrednjega živčevja (8).

#### 1.3.1.1. Funkcije astrocitov

Radialna glija predstavlja najzgodnejše diferencirane celice, ki so fetalni predhodniki astrocitov. V razvojnem obdobju človeka se celice radialne glije podaljšajo tako, da njihova vlakna lažje **vodijo in usmerjajo rastoče nevrone** na njihova ciljna mesta (8). Astrociti so glavni vir adhezijskih molekul in molekul zunajceličnega matriksa, ki so vključene v proces migracije nevronov in usmerjanja rasti njihovih aksonov ter omogočajo nastanek živčnih jeder, živčnih poti in stikov med posameznimi nevroni (10). V razvojnem obdobju je za celice astroglije značilna sinteza in **izločanje številnih nevrotrofičnih dejavnikov**, kot so živčni rastni dejavnik (NGF), nevrotrofični dejavnik možganskega izvora (BDNF), ciliarni nevrotrofični dejavnik (CNTF) in nevrotrofični dejavnik glialnega izvora (GDNF). Ti uravnavajo morfolologijo, rast, diferenciacijo in preživetje določenih nevronov (8, 11). Po šestem letu starosti človeka se radialna glija skrči, saj živčne celice ne potrebujejo več nevrotrofične podpore (8).

Astrociti v odraslem obdobju skrbijo predvsem za **vzdrževanje primerne okolja za delovanje nevronov**. Pomembni so za odstranjevanje kalijevih ionov in različnih živčnih prenašalcev, kadar so ti v zunajceličnem prostoru v prebitku in bi lahko povzročili poškodbo živčnih celic (12). Pri nevrottransmisiji nastane v zunajceličnem prostoru presežek kalijevih ionov, ki lahko zaradi pretirane vzdraženosti povzročijo poškodbe nevronov. Astrociti so zaradi svoje dobre permeabilnosti za kalijeve ione pomembni za **odstranjevanje odvečnega kalija** in tako skrbijo za ohranjanje homeostaze v osrednjem živčevju. Privzete kalijeve ione astrociti odstranjujejo v kapilare (1, 8). Pri možganski kapi pride do ishemije, koncentracija ekstracelularnega kalija pa se lahko poveča tudi do dvajsetkrat. To privede do depolarizacije nevronov in sproščanja glutamata, ki pa povzroči še nadaljnje izločanje kalija iz nevronov. Vse to lahko vodi v smrt nevronov, zato je tu ključnega pomena vloga astrocitov pri odstranjevanju odvečnega kalija (2).

Na membrani astrocitov se nahajajo številni transportni proteini, ki omogočajo **prenos ekscitatornega prenašalca glutamata v celice**. Prevzeti glutamat se v astrocitih s pomočjo encima glutamin-sintetaza pretvori v glutamin. Pri pretvorbi astrociti porabljajo iz zunanjega okolja privzeti amonijak in tako varujejo celice pred njegovimi škodljivimi učinki. Glutamin se nato iz astrocitov prenese v nevrone, kjer se kot substrat uporabi pri ponovni sintezi glutamata. Presežek glutamata v zunajcelični tekočini povzroči pretirano vzdraženost živčnih celic in vodi v ekscitacijsko poškodbo možganov. Raziskave prav tako kažejo na povezavo previsoke zunajcelične koncentracije glutamata z nekaterimi nevrodegenerativnimi boleznimi, kot sta Huntingtonova bolezen in Alzheimerjeva bolezen. Pretirana vzdraženost živčnih celic z glutamatom je lahko tudi vzrok za propadanje nevronov po ishemiji, hipoksiji, hipoglikemiji in epileptičnem stanju (3, 8).

Nevrotransmitor se iz presinaptičnega nevrone sprosti v sinaptično špranjo in se nato veže na receptor na postsinaptičnem nevrone. Na perisinaptičnih astrocitih pa se prav tako nahajajo receptorji za glutamat, ki so približno enako zastopani kot na živčnih celicah. Z aktivacijo glutamatnih receptorjev na astrocitih le-ti regulirajo privzemanje glutamata in kalijevih ionov ter sproščanje glutamata kot prenašalca iz astrocitov. Sproščeni glutamat na presinaptičnem nevrone modulira sproščanje nevrottransmitorja ali pa aktivira glutamatne receptorje na postsinaptičnem nevrone. Perisinaptični astrociti lahko sprejemajo signale iz presinaptičnih končičev ter odgovarjajo nanje, zato nimajo le pasivne podporne funkcije, temveč so **enakopravni del tridelne sinapse** (8, 13). Poleg transporterjev za glutamat so

na astrocitih odkrili še transportne proteine za aspartat/glutamat, GABA, glicin in biogene amine. Dokazali so tudi privzemanje histamina in obstoj encimov za njegovo razgradnjo, čeprav posebnega transporterja za histamin še niso identificirali. Na ta način astrociti sodelujejo pri **inaktivaciji različnih nevrottransmitorjev** (8).

Astrociti imajo tudi **prehranjevalno vlogo**, saj neposredno iz možganskih žil privzemajo glukozo in jo pretvorijo v glikogen, ki ga mobilizirajo ob povečani potrebi po glukozni. So glavni vir glikogena v možganih, ki predstavlja edino rezervo energije v osrednjem živčevju (14). Astrociti skupaj s periciti in endotelijskimi celicami **tvorijo krvno–možgansko pregrado**. Odgovorni so za ustvarjanje in vzdrževanje tesnih stikov (angl. *tight-junctions*) med endotelijskimi celicami možganskih kapilar, s katerimi preprečujejo prosto prehajanje snovi v osrednje živčevje in tako sodelujejo pri vzdrževanju homeostaze (15).

### 1.3.1.2. Astrociti in histamin

Astrociti so pomembne tarčne celice histaminergičnih nevronov. Na njihovi površini se nahajajo histaminski receptorji H<sub>1</sub> in H<sub>2</sub>. Sodelujejo pri privzemanju histamina iz okolja in pri njegovem razgrajevanju, saj vsebujejo encime za njegovo razgradnjo. Morda pa so astrociti udeleženi tudi pri sintezi histamina v osrednjem živčevju (8, 16).

Histamin uravnava številne funkcije astrocitov. Preko aktivacije receptorjev H<sub>1</sub> in H<sub>2</sub> sproži razgradnjo glikogena. Povzroči lahko tudi spremembe v proteinih citoskeleta, ki privedejo do morfoloških sprememb astrocitov. Z aktivacijo protein-kinaze C histamin poveča hitrost proliferacije in sproži diferenciacijo astrocitov. Z vezavo na histaminske receptorje pa endogeni ligand vpliva tudi na sintezo in sproščanje citokinov in nevrotrofičnih dejavnikov (16).

### 1.3.1.3. Vloga astrocitov pri patoloških procesih

Med patološke razmere v osrednjem živčevju uvrščamo vpliv številnih dejavnikov, ki tako ali drugače prizadenejo delovanje živčnega sistema. To so lahko virusne okužbe, mehanske poškodbe, izpostavljenost določenim nevrotoksinom in degenerativni procesi. Ti dejavniki povzročijo, da se mirujoči astrociti pretvorijo v reaktivne celice in sodelujejo v **procesu reaktivne glioze**. To je kompleksen proces, ki vključuje več tipov celic, tako mikroglijo kot astrocite, in ima za posledico regeneracijo ali odmrtnje poškodovanih nevronov. Pride

do proliferacije mikroglije in hipertrofije astrocitov. Za njih je značilno povečano izražanje in sproščanje citokinov, rastnih dejavnikov, encimov, citoskeletnih proteinov in molekul zunajceličnega matriksa kot v normalnih razmerah. Kadar pride do večje izgube živčnih celic, sprožijo astrociti proces brazgotinjenja. Fagocitirajo ostanke odmrlih celic, hkrati pa brazgotina ščiti prizadeto tkivo pred morebitnimi sekundarnimi poškodbami (8, 16).

Na patološke procese se lahko astrociti odzovejo tudi z **nabrekanjem**. To se zgodi ob izpostavljenosti osrednjega živčevja mehanskim poškodbam, ishemiji in med epileptičnim statusom. Nabrekanje astrocitov je lahko posledica povečane zunajcelične koncentracije glutamata, presežka kalijevih ionov ali povečane koncentracije amonijaka v krvi. Mehanizem slednjega je najboljše raziskan, saj je znano, da astrociti pri pretvorbi glutamata v glutamin porabljajo amonijak. Med hiperamoniemijo posledično nastane več glutamina, ki je osmotsko aktiven in povzroči zadrževanje tekočine v celici. Nabrekanje astrocitov je lahko akutno, ki se klinično odraža kot akutni možganski edem, ali kronično. Z nabrekanjem se zmanjša lumen možganskih kapilar, kar povzroči slabšo prekrvavitev. Hkrati se zaradi zmanjšane prostornine povečajo koncentracije zunajceličnih ionov. Povečana koncentracija kalijevih ionov v zunajceličnem prostoru povzroča pretirano vzdraženost živčnih celic, kar lahko vodi v krče (8, 12).

#### **1.3.1.4. Potencialne terapevtske možnosti**

V osrednjem živčevju so odkrili številne trofične dejavnike, ki so nujno potrebni za preživetje, razvoj in delovanje nevronov. To odkritje je rodilo idejo o možnosti zdravljenja različnih nevrodegenerativnih bolezni, kot sta Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen, z nevrotrofičnimi dejavniki (8). Med najbolj raziskane sodi živčni rastni dejavnik (NGF). Pri podganah, katerim so v možgane vbrizgali NGF, je prisotnost le-tega preprečila smrt celic in stimulirala regeneracijo poškodovanih nevronov, ki jih prizadene Alzheimerjeva bolezen. V drugem poskusu so dokazali vpliv NGF na spomin, saj se je živalim v starejšem življenjskem obdobju, ki so imele težave s spominom, po tretiranju z NGF izboljšalo stanje na raven tistih brez motenj (17).

Nevrotrofični dejavniki so prevelike molekule, da bi lahko prehajale krvno-možgansko pregrado, zato bi bilo možno le intratekalno vbrizganje ali transplantacija celic, ki jih sintetizirajo in sproščajo, na mesto poškodbe. V prihodnosti je cilj z uporabo majhnih molekul, ki prehajajo krvno-možgansko pregrado, vplivati na endogeno sintezo

nevrotrofičnih dejavnikov v astrocitih. Ti so namreč pod vplivom različnih neurotransmitorjev sposobni sintetizirati in sproščati številne trofične dejavnike (8). Pri kulturah astrocitov, vzgojenih iz možganske skorje novorojenih podgan, so identificirali receptorje za večino živčnih prenašalcev v osrednjem živčevju, dokazan vpliv na povečano sproščanje NGF pa je bil pri interleukinu-1 $\beta$ , interleukinu-6, transformirajočem rastnem dejavniku  $\beta$ 1, noradrenalinu in histaminu (18).

Zdravilo, s katerim bi uspeli modulirati sproščanje nevrotrofičnih dejavnikov iz astrocitov, predstavlja mnogim znanstvenikom izziv in svetlo prihodnost pri zdravljenju mnogih bolezni osrednjega živčevja. Cilj je odkriti tako zdravilo, ki bi prehajalo krvno-možgansko pregrado in bi z vezavo na določen receptor na astrocitih omogočilo regulirano sproščanje ustreznega trofičnega dejavnika. To bi na mestu poškodbe zagotovilo primerno koncentracijo nevrotrofičnega dejavnika (8).

#### **1.4. NEVROTRANSMITORJI**

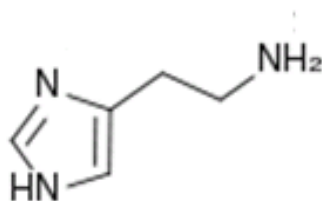
**Nevrotransmitorji ali živčni prenašalci** so odgovorni za kemijski prenos informacije med nevroni v živčnem sistemu. So zelo heterogena skupina različnih snovi: biogeni amini (histamin, adrenalin, serotonin, dopamin), aminokisliline (glicin, glutamat, aspartat, GABA), peptidi (endorfini, enkefalini), acetilholin, substanca P in drugi (5, 6, 17). Sintetizirajo se v nevronih, kjer ostanejo shranjeni v sinaptičnih veziklih. Po aktivaciji presinaptičnega nevrona se z eksocitozo sprostijo v sinaptično špranjo, sprožijo aktivacijo postsinaptičnega nevrona in tako omogočijo prenos informacije (4).

Kemijski prenos preko sinapse obsega štiri ključne korake – sintezo živčnega prenašalca, shranjevanje in sprostitvev neurotransmitorja, interakcijo z receptorjem na postsinaptični membrani in odstranitev neurotransmitorja iz sinaptične špranje (1).

Za normalno delovanje živčnega sistema je ključna odstranitev neurotransmitorja z mesta delovanja, kar prepreči stalno aktivnost sinapse in pretirano stimuliranost postsinaptične membrane. Poznani so trije mehanizmi odstranitve neurotransmitorja iz sinaptične špranje: difuzija, encimska razgradnja in ponovni prevzem živčnega prenašalca (6, 7).

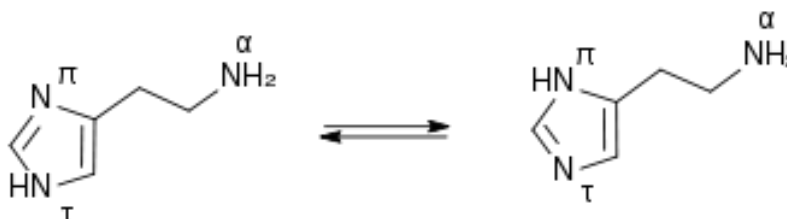
## 1.5. HISTAMIN

Histamin je biogeni amin, ki je prisoten v večini telesnih tkiv, v večjih koncentracijah pa se nahaja v koži, pljučih in v gastrointestinalnem traktu. Največji del histamina je shranjen v zrnih mastocitov (tkivni bazofilci), ki se nahajajo v koži, sluznici dihal, prebavilih in izločalih ter tkivih v neposredni bližini krvnega in limfatičnega obtoka. V krvi se histamin nahaja predvsem v bazofilnih granulocitih (19), v želodcu pa je prisoten v enterokromafinim celicam podobnih celicah (ECL) (20). V možganih ga najdemo v histaminergičnih nevronih, kjer deluje kot nevrottransmitor v osrednjem živčevju. Ob ustrezni stimulaciji se shranjeni histamin sprosti iz celic, veže na različne podtipe histaminskih receptorjev (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>) na tarčni celici ter posreduje številne fiziološke in patofiziološke učinke (19).



Slika 4: Struktura histamina (povzeto po 21).

Kemijsko je histamin 2-(imidazol-4-il) etilenamin, v strukturi vsebuje alifatski primarni amin ( $pK_a=9,4$ ) in imidazol ( $pK_a=5,8$ ). 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 obliki (21).



Slika 5: Tautomerni obliki molekule histamina (povzeto po 21).

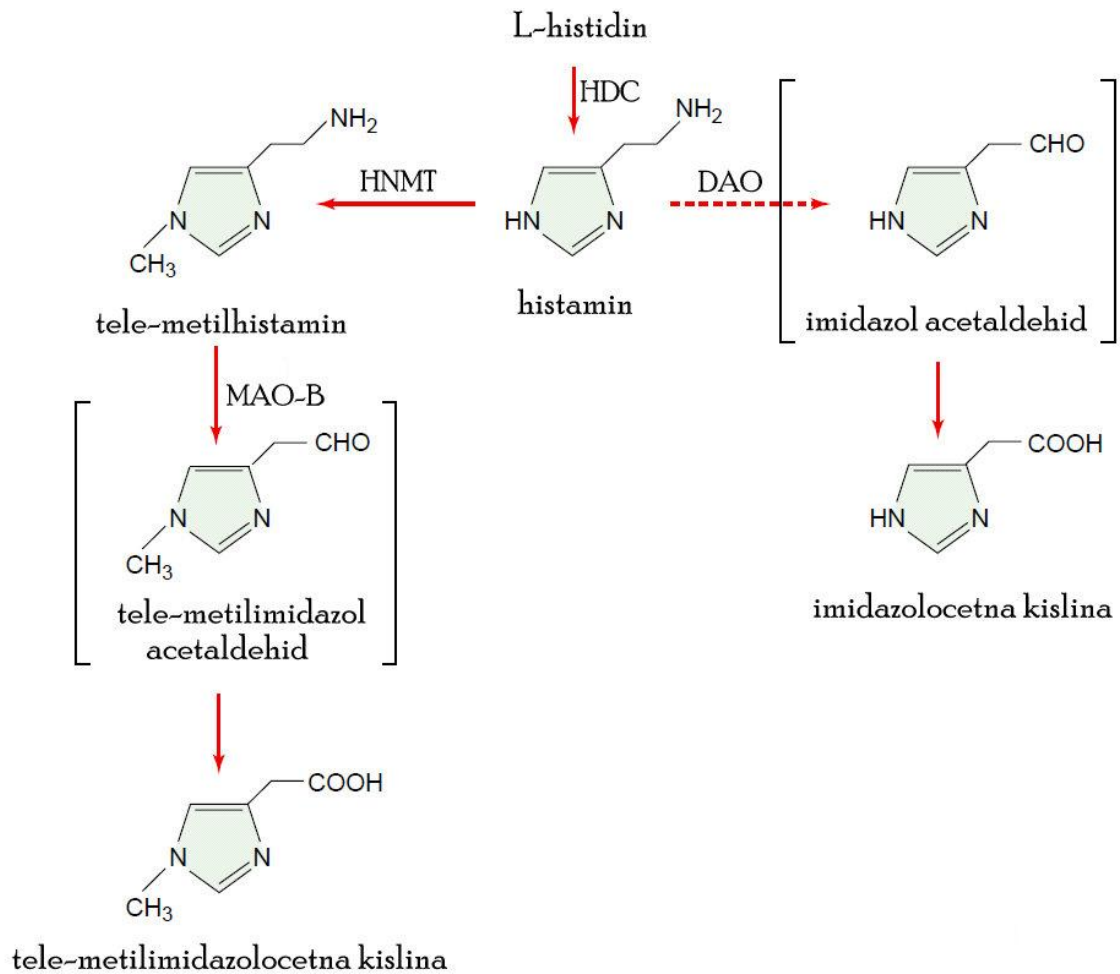
### 1.5.1. BIOSINTEZA, SPROŠČANJE IN INAKTIVACIJA

**Biosinteza histamina** poteka z dekarboksilacijo aminokislina L-histidina pod katalitičnim vplivom encima histidin-dekarboksilaze (HDC), ki je odvisen od koencima piridoksal-5'-fosfat (PLP). Encim prekine močno kovalentno vez med dvema ogljikoma, sprosti se ogljikov dioksid (22, 19).

**Sproščanje histamina** stimulirajo različni dejavniki. Pri alergijskih reakcijah se specifičen antigen veže na imunoglobulin IgE, nastali kompleks pa se nato veže na številne receptorje na površini mastocitov. Preko aktivacije proteina G se sproži eksocitoza granul, v katerih so shranjeni mnogi mediatorji, med njimi tudi histamin (5). Izločanje histamina iz celic lahko aktivirajo tudi fragmenti komplementa (C3a, C4a, C5a), citokini (interlevkin-1, interlevkin-3), neuropeptidi (neuropeptid Y, substanca P), nevrotransmitorji (adrenalin, serotonin, dopamin), različna zdravila (tubokurarin, sukcinilholin, morfin, vankomicin) ter določene razmere v organizmu (hipoksija, hiperosmolarnost, travma, mehanske poškodbe tkiva) (5, 7, 19).

**Inaktivacija histamina** poteka z encimsko razgradnjo po dveh glavnih poteh: z oksidativno deaminacijo in z metilacijo na obroču. Obkrajni histamin se presnavlja z deaminacijo in metilacijo, histamin v možganih pa se večinoma biotransformira z metilacijo. Oksidativna deaminacija primarne amino skupine histamina z molekularnim kisikom pod vplivom encima diamino-oksidaža (**DAO**) vodi v nastanek aldehida in nato imidazolocetne kisline. V nadaljnji presnovi se le-ta konjugira z ribozo in se kot 1-ribozil-imidazol-4-ocetna kislina, ki je bolj hidrofilna od imidazolocetne kisline, izloči z urinom. Drugi način je metilacija histamina, ki lahko poteče na dušiku, ki je na stranski verigi, ali dušiku na tele-mestu imidazolovega obroča. Če poteče reakcija metilacije na stranski verigi, nastane  $\alpha$ -metilhistamin ali dimetilhistamin. V primeru metilacije dušika na tele-mestu nastane presnovek tele-metilhistamin. Reakcijo metilacije katalizira encim histamin-N-metiltransferaza (**HNMT**). Donor metilne skupine je S-adenozil-L-metionin. Nastali tele-metilhistamin oz. metilhistamin je vmesni produkt, ki se delno izloči iz telesa z urinom. V drugi stopnji presnove se metilhistamin oksidira v metilimidazolocetno kislino in se nato tudi izloči z urinom. Reakcijo katalizirata encima monoamin-oksidaža B (**MAO-B**) ali diamino-oksidaža (**DAO**) (22).





Slika 6: Biotransformacija histamina (povzeto po 7).

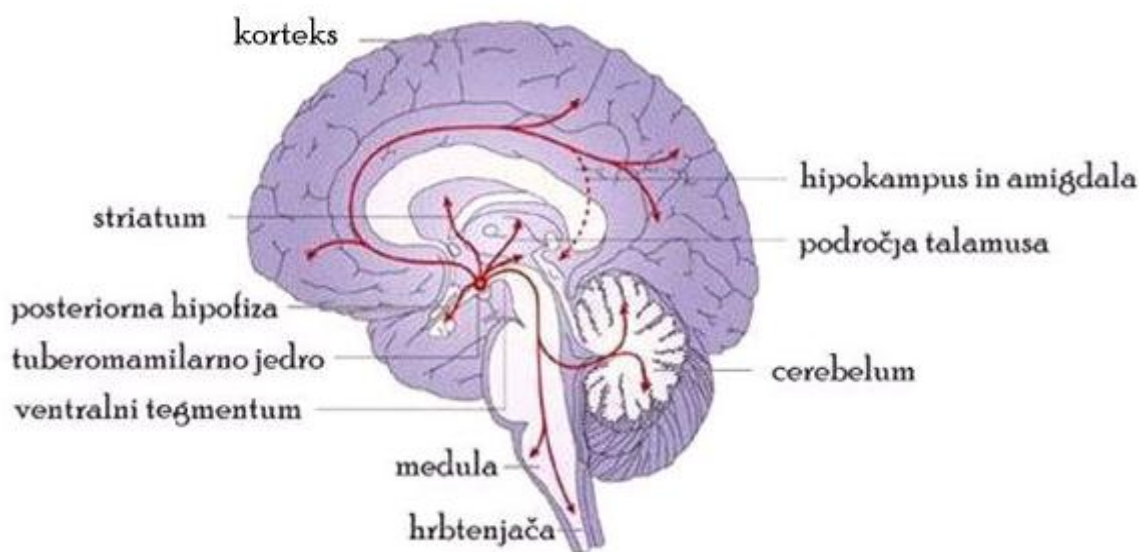
Metabolizem histamina v osrednjem živčevju poteka z metilacijo pod vplivom encima HNMT. Ta se nahaja v citoplazmi, zato je potreben privzem histamina v celice, udeležene v sinapsi. Te celice so tako nevroni kot celice glije - astrociti. Predvideva se, da transport poteka preko prenašalcev - organskih kationskih transporterjev (OCT), ki se nahajajo na membrani celic (23).

### 1.5.2. HISTAMINERGIČNI SISTEM V OSREDNJEM ŽIVČEVJU

Histamin je v možganih prisoten v veliko nižjih koncentracijah kot v ostalih tkivih, kot so pljuča in koža. Nedvomno pa ima v osrednjem živčevju zelo pomembno vlogo kot neurotransmiter (19). Histamin slabo prehaja krvno-možgansko pregrado in v osrednjem živčevju nastaja lokalno, iz aminokislina histidin. Sinteza poteka tako v nevronskih kot tudi v nenevronskih celicah. V nevronih nastaja histamin, podobno kot ostali

nevrotransmitorji, v citoplazmi živčnih končičev, odkoder se prenaša v sinaptične vezikle. Od nenevronske celice so najpomembnejši vir histamina v osrednjem živčevju mastociti (16).

Obstoj histaminergičnih nevronov v možganih so dokazali šele leta 1984, ko so imunohistokemično, z uporabo protiteles proti L-histidin-dekarboksilazi (HDC) in histaminu, natančno določili njihovo lego in porazdelitev (24). Telesa histaminergičnih nevronov se nahajajo izključno v tuberomamilarnem jedru posteriornega dela hipotalamusa, eferentna vlakna pa projicirajo v skoraj vse predele možganov in oživčujejo skoraj celoten osrednji živčni sistem (25, 26).



**Slika 7: Histaminergični sistem v možganih. Histaminergična vlakna izhajajo iz tuberomamilarnega jedra in projicirajo po celotnem osrednjem živčevju (povzeto po 26).**

Večina histaminergičnih vlaken ni mieliniziranih, ne obdajajo teles nevronov in tvorijo le malo sinaptičnih stikov z nevroni. Nekateri histaminergični nevroni poleg histamina sproščajo tudi druge neuroaktivne snovi in encime, kot so GABA, GABA-transaminaza, glutamat-dekarboksilaza, adenozin-deaminaza, monoamin-oksidaza B, tiroliberin, substanca P in galanin, vendar njihova vloga še ni povsem znana (7, 27). Histamin se v osrednjem živčevju veže na različne podtipе receptorjev - H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> in H<sub>4</sub>, ki se nahajajo v večini možganskih področij (19).

### 1.5.3. VLOGA HISTAMINA V ORGANIZMU

Histamin posreduje z vezavo na histaminske receptorje številne učinke v organizmu, ki so odvisni od lokacije in podtipa receptorja (19). Izven osrednjega živčevja ima ključno vlogo kot **mediator vnetja**, saj vnetni dražljaj sproži degranulacijo mastocitov in sprostitvev histamina v kri. Tam se veže na receptorje H<sub>1</sub> gladkih mišic in endotelijskih celic žil in povzroči povečano prepustnost kapilar in venul ter vazodilatacijo arteriol. V večjih koncentracijah lahko povzroči tudi bolečino (28). Sodeluje pri oblikovanju imunskega odgovora pri **alergijskih reakcijah**, povzroča alergijski rinitis, urtikarijo in ima pomembno vlogo pri anafilaktičnem šoku (29, 30). Z vezavo na receptorje H<sub>2</sub> v srcu povzroči **pozitiven inotropni in kronotropni učinek** (31), v želodcu preko receptorjev H<sub>2</sub> **stimulira izločanje želodčne kisline** (26). Z aktivacijo receptorjev H<sub>1</sub> povzroči **kontrakcijo gladkih mišic**, v prebavnem traktu tako vpliva na peristaltiko, v dihalnih poteh pa povzroči bronhokonstrikcijo in je eden izmed glavnih dejavnikov zoženja dihalnih poti pri astmi (19). Preko receptorjev H<sub>2</sub> v gladkih mišicah povzroči relaksacijo gladkih mišic maternice (32). Poleg perifernih učinkov ima histamin pomembno vlogo tudi v osrednjem živčevju, ki še ni povsem razjasnjena, a obeta številna nova dognanja o delovanju človeškega organizma.

#### 1.5.3.1. Učinki histamina v osrednjem živčevju

Na učinek histamina v osrednjem živčevju so postali pozorni šele po zaznanju neželenih sedativnih učinkov H<sub>1</sub>-antihistaminikov prve generacije (7). Kasneje se je izkazalo, da ima histaminergični sistem v centralnem živčevju pomembno vlogo, saj koordinira senzorične, motorične, vegetativne in hormonske funkcije v organizmu (16). Histamin naj bi imel tako stimulativen kot inhibitorjen vpliv v osrednjem živčevju, posledično ima tudi zelo raznolike učinke na organizem (33).

Histaminergični nevroni sodelujejo v povezavi s holinergičnim, adrenergičnim in serotoninskim sistemom ter oreksinskimi nevroni pri **ciklu spanja in budnosti**. V tesni medsebojni povezavi z ostalimi, vsak sistem nevronov na svoj edinstven način prispeva k **vzdrževanju budnosti**. Histamin vpliva na budnost tako, da se veže na receptorje H<sub>1</sub> in s tem povzroči depolarizacijo holinergičnih in serotoninskih nevronov (26). Pri poskusu na mačkah so ugotovili povečano aktivnost histaminergičnih nevronov med stanjem budnosti, med spanjem pa je bila aktivnost nizka ali celo odsotna (34, 35). Na miših so preučevali

odsotnost histidin-dekarboksilaze (encim, ki je udeležen v biosintezi histamina) oz. receptorja H<sub>1</sub> v možganih. Ukinitev slednjih se je pokazala v motnjah cirkadianega ritma, pri miših se je pojavila somnolenca (36).

**Prehranjevalna vloga** histamina je povezana z modulacijo sproščanja nevrotransmitorjev in hormonov, ki spodbujajo ali zavirajo apetit. Histamin naj bi predstavljal signal za sitost v organizmu, ki je posledica aktivacije receptorjev H<sub>1</sub> v hipotalamusu. Histaminergični nevroni so tarčne celice leptina v možganih, ki je poznan kot sitostni peptid, ki zavira apetit. Na podganah je bil po injiciranju histamina v možgane ugotovljen njegov zaviralni učinek na prehranjevanje, odsotnost histamina pa je povzročila spodbuditev hranjenja. Pri poskusih na podganah so ugotovili, da blokada histaminskih receptorjev H<sub>3</sub> povzroča zmanjšan vnos hrane. Raziskovalci že razvijajo antagoniste receptorjev H<sub>3</sub>, ki bi jih uporabili kot zdravila za zmanjšanje apetita (34).

Histamin je prav tako udeležen pri **vzdrževanju ravnotežja tekočine v organizmu**. Po injiciranju v hipotalamus pri živalih spodbudi žejo, pri dehidraciji pa se poveča sinteza in sproščanje histamina v možganih. Poleg tega histamin preko receptorjev H<sub>1</sub> in H<sub>2</sub> v hipotalamusu poveča izločanje vazopresina, kar zavre izločanje urina in povzroči zadrževanje vode v telesu (25). Opažena je bila tudi vloga histamina pri **regulaciji telesne temperature**. Pri večini živali injicirani histamin povzroči hipotermijo, ki ji nato sledi hipertermija. Receptorji H<sub>1</sub> v anteriornem hipotalamusu naj bi bili odgovorni za znižanje nastavitvene točke termostata v hipotalamusu, medtem ko naj bi bili receptorji H<sub>2</sub> v posteriornem hipotalamusu udeleženi pri izgubi telesne toplote (25, 26).

Po injiciranju histamina v možgane različnih živali je bila opažena **ublažitev bolečine (antinociceptiven učinek)**. Udeležena naj bi bila tako receptor H<sub>1</sub> kot H<sub>2</sub>. Ravno obraten učinek pa ima periferni histamin, ki stimulira nociceptivne živčne končiče in povzroča bolečino (7). **Emetični učinek** histamina je bil ugotovljen na psih, katerim so v možgane injicirali histamin (37). Antagonisti receptorjev H<sub>1</sub> se uporabljajo kot zdravila proti slabosti in bruhanju pri potovalni slabosti in motnjah ravnotežja (vertigo, Menierova bolezen) (19).

Raziskave so potrdile vlogo histamina pri **spominu in učenju**, vendar je bil opažen tako spodbujevalni kot inhibitorni vpliv na proces tvorbe spomina. Najverjetneje je to posledica kompleksnosti spomina, ki zajema procesiranje najrazličnejših dogodkov in situacij iz okolja. Specifičen učinek histamina je odvisen od lokacije in podtipa histaminskega

receptorja, področja v možganih in narave vsebine, udeležene pri procesu spomina (34). Pri poskusu na podganah so opisali učinek histamina na izboljšanje spomina živali, aplikacija antagonist receptorjev H<sub>1</sub> je povzročila poslabšanje spomina (27). Prav tako so ugotovili, da blokada receptorjev H<sub>3</sub> pri podganah izboljša socialni spomin, pozornost in kognitivne predstave (35).

Histamin ima vpliv tudi na kardiovaskularni sistem. Injicirani histamin je pri živalih povzročil prehodno **povišanje krvnega tlaka**. Pri tem sta udeležena tako receptor H<sub>1</sub> kot H<sub>2</sub>. Predlagan mehanizem temelji na dejstvu, da aktivacija histaminergičnega sistema v osrednjem živčevju povzroči povišanje koncentracije kateholaminov v plazmi. Lahko pa je povišanje tlaka tudi posledica povečanega izločanja vazopresina, ki ga povzroči histamin (25).

Histaminergični nevroni so udeleženi pri **endokrini vlogi** hipotalamusa, predvsem z uravnavanjem izločanja vazopresina. Prav tako histamin sodeluje pri regulaciji sproščanja oksitocina, prolaktina, adrenokortikotropnega hormona ter β-endorfina. Vpliv na hipofizo ima tako receptor H<sub>1</sub> kot H<sub>2</sub> (7). Le malo je bilo raziskano o vlogi histamina pri **občutku strahu**. Obstoječe študije pričajo, da histamin pri živalih vzbuja bojazen in tesnobo (25).

Histamin je verjetno udeležen pri številnih nevroloških boleznih in okvarah centralnega živčevja, kot so Alzheimerjeva bolezen, Downov sindrom, multipla skleroza, shizofrenija (38), depresija (33) in epilepsija (24). Pri teh primerih so namreč opazili spremembe v številu ali morfologiji histaminergičnih nevronov (7). Čeprav je bila vloga histamina v osrednjem živčevju dokaj obsežno raziskana na živalih, je bilo do danes le malo študij opravljenih na ljudeh (33).

## 1.6. HISTAMINSKI RECEPTORJI

V začetku dvajsetega stoletja je John Newport Langley postavil teorijo, da je »receptorna snov« specifično mesto na celici, ki sprejme kemični dražljaj, ga prenese v celico in tako izzove biološki odgovor celice, ki je specifičen tako za celico kot za receptor. Nadaljnje študije so privedle do potrditve teorije, kasneje pa tudi do farmakološke razvrstitve receptorjev (39).

Do spoznanja, da obstaja več različnih razredov histaminskih receptorjev, so raziskovalci prišli z odkritjem antagonistov, ki niso v celoti blokirali učinkov histamina. Posledično je razvoj selektivnih in nato še visoko selektivnih histaminskih antagonistov vodil do določitve različnih razredov histaminskih receptorjev: H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, nedavno pa še H<sub>4</sub> (40). Vsi štirje sodijo v tako imenovani razred II farmakoloških receptorjev (metabotropni receptorji), ki za prenos informacije v celico potrebujejo sklopitev z gvanin–nukleotid vezavnim regulatornim proteinom (protein G). Nahajajo se v večini perifernih organov ter v centralnem in perifernem živčevju (31). Molekularne lastnosti, porazdelitev in funkcionalne karakteristike posameznih podtipov histaminskih receptorjev pa se razlikujejo med vrstami ter celo v različnih tkivih iste vrste. V poskusih so primerjali lastnosti perifernih (goveje gladke mišice žil in endotelijske celice) in centralnih (astrociti podgan) histaminskih receptorjev H<sub>1</sub> in H<sub>2</sub>. Dokazali so razlike v afiniteti vezave ligandov za isti podtip receptorja (H<sub>1</sub> in H<sub>2</sub>) v perifernem in centralnem živčevju (41).

**Preglednica I: Tkivno izražanje in glavni učinki aktiviranih histaminskih receptorjev (povzeto po 7, 19, 26).**

RECEPTOR	IZRAŽANJE V TKIVIH	GLAVNI UČINKI
H <sub>1</sub>	gladke mišice (žil, prebavnega trakta, dihalnih poti) endotelijske celice sredica nadledvične žleze srce imunske celice osrednji živčni sistem	vazodilatacija povečana prepustnost žil kontraktacija 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 nevrotansmitorjev (histamin, acetilholin, noradrenalin, serotonin)
H <sub>4</sub>	levkociti, mastociti pljuča jetra vranica tanko in debelo črevo	vloga pri vnetju in kemotaksi

**Receptorji H<sub>1</sub>** se nahajajo v osrednjem živčevju predvsem v področju talamusa in korteksa, kjer so udeleženi pri vzdrževanju budnosti (25). Izven osrednjega živčevja se nahajajo v gladkem mišičju črevesja in bronhijev, kjer njihova aktivacija povzroči kontrakcijo mišic (19). Udeleženi so tudi pri vnetju, kjer aktivacija receptorjev povzroči vazodilatacijo in povečano prepustnost žil (28).

**Receptorji H<sub>2</sub>** so v osrednjem živčevju prisotni v bazalnih ganglijih in v nekaterih delih limbičnega sistema, kjer so udeleženi pri učenju in tvorjenju spomina (25). V želodcu posredujejo stimulacijo za izločanje želodčne kisline, v srcu pa aktivacija receptorjev povzroči pospešitev srčnega utripa in povečano moč kontrakcije (26, 31).

**Receptorji H<sub>3</sub>** se nahajajo presinaptično in delujejo kot avtoreceptorji, ki regulirajo sproščanje in sintezo histamina (37). Ker so receptorji prisotni tudi na nehistaminergičnih nevronih, delujejo tudi kot heteroreceptorji in regulirajo sproščanje drugih nevrotransmitorjev, kot so noradrenalin, dopamin, serotonin, acetilholin, GABA, glutamat in drugi. Prisotni so v vseh predelih možganske skorje, kjer so udeleženi pri procesu spomina in učenja (25).

**Receptorje H<sub>4</sub>** so odkrili šele pred kratkim. Imajo podobne strukturne in vezavne lastnosti kot receptorji H<sub>3</sub> (26). Prisotni so predvsem v levkocitih in mastocitih, kjer naj bi bili udeleženi pri vnetju in kemotaksi (42). Funkcije receptorjev H<sub>4</sub> v osrednjem živčevju še ne poznamo (26).

Učinke histamina preko aktivacije specifičnih receptorjev se že uspešno izkorišča pri zdravljenju. Antagonisti receptorjev H<sub>1</sub> se uporabljajo 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 (21, 40).

### **1.6.1. MEHANIZMI, ODGOVORNI ZA PRENOS INFORMACIJE V CELICO**

Histaminski receptorji so transmembranski proteini, ki prevajajo informacije v celico preko številnih zaporednih korakov, ki se razlikujejo glede na podtip receptorja.

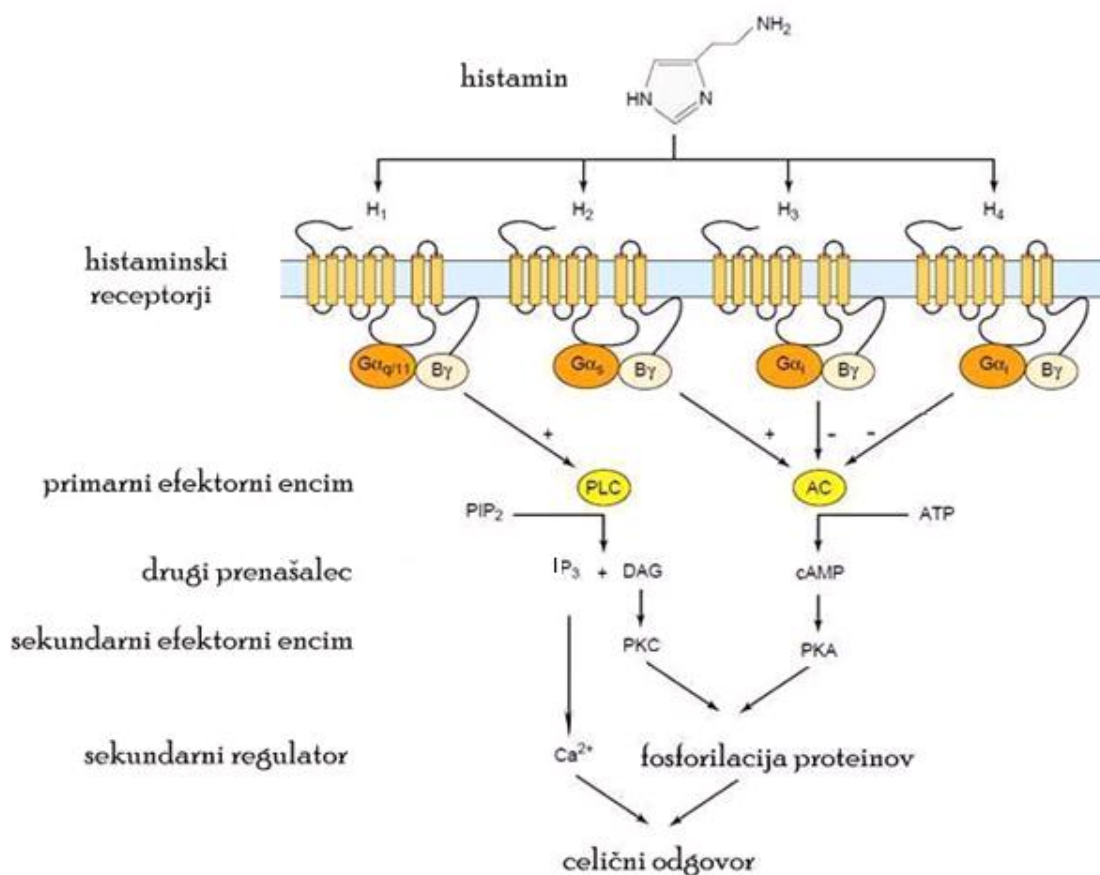
Vezava histamina na **receptor H<sub>1</sub>** omogoči sklapljanje z G<sub>q/11</sub> GTP-hidrolaznim proteinom, ki je sestavljen iz alfa, beta in gama podenote. Z alfa podenote se sprosti gvanozin-5'-difosfat (GDP) in nanjo se veže gvanozin-5'-trifosfat (GTP). Alfa podenota se odcepi in aktivira encim fosfolipazo C (PLC), ki pretvori fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat (PIP<sub>2</sub>) v sekundarna prenašalca inozitol-1,4,5-trifosfat (IP<sub>3</sub>) in 1,2-diacilglicerol (DAG). DAG neposredno aktivira protein-kinazo C (PKC), ki je odgovorna za fosforilacijo proteinov. IP<sub>3</sub> se veže na receptorje na endoplazmatskem retikulumu, kar povzroči sproščanje kalcijevih zalog v citoplazmo. Kalcijevi ioni učinkujejo na protein-kinazo, ki je specifično odvisna od kalcija in kalmodulina (Ca<sup>2+</sup> kalmodulin protein-kinaza). Aktiviranje obeh kinaz privede do celičnega odgovora (31, 39).

Vezava agonista na **receptor H<sub>2</sub>** povzroči konformacijsko spremembo receptorja, kar omogoči sklapljanje s stimulatornim gvanin-nukleotid vezavnim proteinom (proteinom G<sub>s</sub>). Ta je sestavljen in alfa, beta in gama podenote. Ob sklopitvi se iz alfa podenote sprosti gvanozin-5'-difosfat (GDP) in nanjo se veže gvanozin-5'-trifosfat (GTP). Alfa podenota z vezanim GTP disociira s proteina G<sub>s</sub> in aktivira encim adenilat-ciklazo (AC), ki povzroči povečanje koncentracije znotrajceličnega cikličnega adenozin-3',5'-monofosfata (cAMP). Le-ta aktivira protein-kinazo A (PKA), ki je odgovorna za fosforilacijo celičnih proteinov. PKA fosforilira tudi kalcijeve kanale (L-tip), kar vpliva na njihovo odprtost in vodi do povišanja znotrajcelične koncentracije kalcija ter celičnega odgovora, ki je odvisen od specializiranosti celice (26, 31).

Vezava histamina na **receptorje H<sub>3</sub>** omogoči sklopitev s proteinom G, kar privede do inhibicije adenilat-ciklaze (AC). To zavre sintezo cAMP in privede do inhibicije napetostno odvisnih kalcijevih kanalčkov. Ker je sproščanje histamina iz veziklov v presinaptičnih končičih odvisno od koncentracije kalcija, se njegovo izločanje inhibira. Tako receptorji H<sub>3</sub> delujejo kot avtoreceptorji, ki regulirajo sintezo in sproščanje histamina (25).

Prenos informacije v celico pri **receptorjih H<sub>4</sub>** poteka na podoben način kot pri receptorjih H<sub>3</sub>. Vezava histamina omogoči sklapljanje s proteinom G, pride do inhibicije AC, ki nadalje povzroči zmanjšanje sinteze cAMP (40).





**Slika 8:** Poti, po katerih histaminski receptorji aktivirajo transmembranske in znotrajcelične procese. Vezava histamina na receptor povzroči sklapljanje receptorja s proteinom G, nato pa kompleks receptor-protein G aktivira primarni efektorni encim. Le-ta omogoči nastanek drugega prenašalca, ki aktivira sekundarni efektorni encim, kar na koncu privede do celičnega odgovora (povzeto po 7).

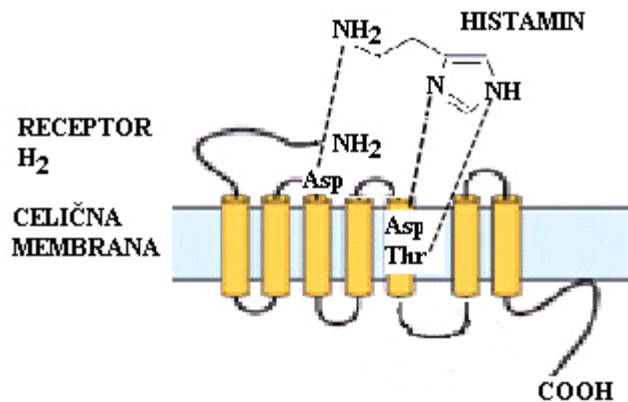
## 1.6.2. STRUKTURA HISTAMINSKEGA RECEPTORJA H<sub>2</sub>

Aminokislinsko zaporedje histaminskega receptorja H<sub>2</sub> je krajše kot pri večini s proteinom G sklopljenih receptorjev (31). Pri podgani so identificirali 358, pri psu pa 359 aminokislin (40). Človeški receptor H<sub>2</sub> je protein z molekularno maso 40 kDa, ki ga sestavlja 359 aminokislin. V aminokislinskem zaporedju so si receptorji H<sub>2</sub> pri različnih živalskih vrstah med seboj zelo podobni. V sestavi receptorja H<sub>2</sub> pri psih, miših, podganah in morskih prašičkih obstaja 83-95% identičnih aminokislin. Med histaminskim receptorjem H<sub>1</sub> in H<sub>2</sub> pa je le 40% homologija v aminokislinski sestavi (26).

Receptorji H<sub>2</sub> vsebujejo sedem hidrofobnih transmembranskih področij, znotrajcelično terminalno karboksilno verigo in zunajcelično terminalno aminsko verigo, ki vključuje tudi N-glikozilacijsko mesto. Receptor sestavlja tudi relativno kratka tretja znotrajcelična

zanka, ki je značilna za receptorje, ki prenašajo kemično sporočilo preko membranskega encima adenilat-ciklaze. V drugi in tretji zunajcelični zanki se nahajajo cisteinski preostanki, ki tvorijo strukturno pomembne disulfidne vezi (31).

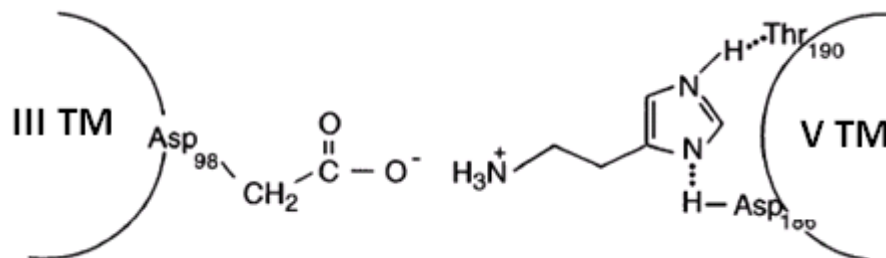
Za prepoznavanje ligandov so ključne aminokisliline na tretjem in petem transmembranskem področju receptorja. Za natančnejšo določitev vezavnih mest so se znanstveniki posluževali usmerjene mutageneze (angl. *site-directed mutagenesis*), s katero so proučevali vlogo posameznih strukturnih elementov proteina. Po zamenjavi posameznih aminokislin v strukturi receptorja z alaninom so opazovali vezavo ligandov in njihovo zmožnost aktivacije receptorja. Ugotovili so, da je za vezavo in učinek histamina ključen aminokislinski ostanek aspartat na mestu 98, ki se nahaja na tretjem transmembranskem področju in je prisoten pri vseh receptorjih za monoamine. Predvideva se, da je to primarno vezavno mesto za pozitivno nabiti dušikov atom na alifatski verigi histaminske molekule. Aspartat na mestu 186 in treonin na mestu 190, ki se nahajata na petem transmembranskem področju, naj bi bila pomembna za tvorbo vodikovih vezi z dušikovimi atomi v imidazolnem obroču histamina. N<sup>1</sup> imidazolnega obroča se veže na Asp<sup>186</sup>, N<sup>3</sup> imidazolnega obroča pa na Thr<sup>190</sup> (40, 43).



Slika 9: Shematska ponazoritev strukture histaminskega receptorja H<sub>2</sub> in vezavnih mest za histamin. Za vezavo na receptor so pomembni Asp<sup>98</sup> na tretjem transmembranskem področju ter Asp<sup>186</sup> in Thr<sup>190</sup> na petem transmembranskem področju (povzeto po 7, 31).

Za aktivacijo receptorja H<sub>2</sub> je potrebna tautomerizacija molekule histamina. Molekula, ki se veže v obliki monokationa, se receptorju približa kot N<sup>3</sup>-H tautomerna oblika. Kationska stranska veriga se z NH<sub>3</sub><sup>+</sup> skupino veže na negativno področje receptorja (Asp<sup>98</sup>) in skupaj tvorita ionsko vez. Ko se stranska veriga zasidra, povzroči nevtralizacija naboja pomik tautomere z mesta N<sup>3</sup>-H na N<sup>1</sup>-H. Za aktivacijo receptorja sta potrebni skupina, ki oddaja

proton in skupina, ki ga sprejema. N<sup>1</sup> mesto sprejme proton z mesta na receptorju, ki ga oddaja (Asp<sup>186</sup>), medtem ko N<sup>3</sup> deluje kot donor protona in se veže na Thr<sup>190</sup>. V principu pa lahko obe mesti delujeta kot donor ali akceptor protona (31, 43).



Slika 10: Vezavna mesta za molekulo histamina na receptorju H<sub>2</sub>. Asp<sup>98</sup> na tretjem transmembranskem področju (III TM) je odgovoren za nastanek ionske vezi z NH<sub>3</sub><sup>+</sup> skupino na stranski verigi histamina. Asp<sup>186</sup> in Thr<sup>190</sup> na petem transmembranskem področju (V TM) tvorita z dušikoma v imidazolnem obroču histamina vodikove vezi (povzeto po 43).

## 1.7. INTERAKCIJA RECEPTOR - LIGAND

Receptorji so beljakovine, ki so odgovorne za prepoznavanje in odgovor na kemične signale ter tako predstavljajo ključen element pri komunikaciji med celicami. Kot ligandi se lahko na receptor vežejo **agonisti** in **antagonisti**. Agonist zasede vezavno mesto na receptorju, ga aktivira in tako sproži učinek v tarčni celici. Vezava antagonista na vezavno mesto na receptorju ne privede do aktivacije receptorja in učinka. Kompetitivni antagonist le zasede vezavno mesto na receptorju in tako prepreči vezavo agonista nanj. Sposobnost vezave liganda na receptor opredelimo kot afiniteto, sposobnost aktivacije receptorja pa kot učinkovitost liganda. Dobri agonisti imajo pri nizki koncentraciji visoko afiniteto in učinkovitost, medtem ko antagonisti izkazujejo nizko ali nobene učinkovitosti. Praviloma imajo antagonisti večjo afiniteto do vezave na receptor kot agonisti. Poznamo tudi delne agoniste, ki kljub 100% zasedenosti receptorjev ne sprožijo maksimalnega učinka v celici (19, 44).

Če želimo ligand uporabiti kot zdravilo, mora biti selektiven za določeno celico ali tkivo in specifičen za vezavno mesto na določenem receptorju. Receptorji, ki delujejo kot tarče učinkovin, ponavadi izkazujejo visoko stopnjo specifičnosti za ligande, saj prepoznajo le točno določene in prezrejo njim podobne molekule (19).

Pri interakciji liganda z receptorjem so udeležene različne vrste kemijskih vezi, ki se razlikujejo v energiji interakcije, trajanju (reverzibilnosti) in specifičnosti. **Kovalentna vez** predstavlja močno, ireverzibilno vez in povzroči dolgotrajen učinek v celici. Pri vezavi učinkovine na receptor je le redko prisotna, saj je pri večini zdravil zaželena reverzibilna vezava. Molekule s funkcionalnimi skupinami, ki so pri fiziološkem pH ionizirane, privlačijo skupine z nasprotnim nabojem in tako tvorijo z receptorjem močne **ionske vezi**. Ligandi lahko z receptorji tvorijo tudi **dipolarne interakcije**, ki so šibke in kratkosežne. Predstavljajo interakcijo med dvema dipoloma, ki sta posledica različne elektronske gostote v molekulah (19, 45).

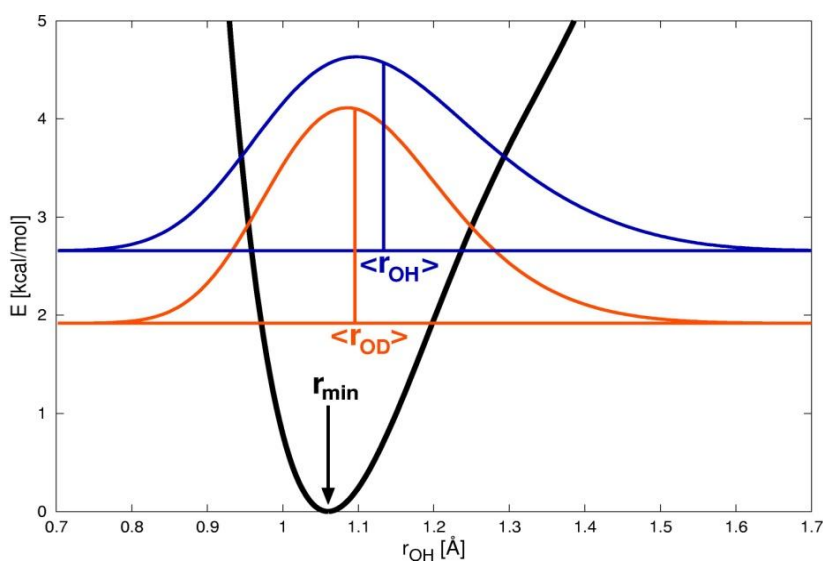
Tipična nevezna interakcija (npr. interakcija voda–voda) v bioloških sistemih vključuje vodikove vezi in disperzijske interakcije. Pri vezavi liganda na vezavno mesto receptorja se mora ligand najprej delno dehidratirati, kar pomeni, da so pri vezavi enako pomembne interakcije voda–protein, voda–ligand in voda–voda. Hidratacijska komponenta je odgovorna za **hidrofobno interakcijo**. Med proton donorsko in proton akceptorsko skupino pa poteka **vodikova vez**, ki je šibka, a zelo specifična in pri interakciji liganda z receptorjem zelo pogosta vez (45, 46, 47).

### 1.7.1. VODIKOVA VEZ IN DEVTERACIJA

Vodikova vez je tip molekularne interakcije med dvema elektronegativnima atomoma, kjer je elektrostatski odboj kompenziran s pozitivnim nabojem protona med njima. Je šibka kemijska vez, ki nastane v nekaterih spojinah, ki vsebujejo vodik, vezan na elektronegativen atom. Če vodik leži med dvema močno elektronegativnima elementoma, je z enim povezan s kovalentno vezjo, z drugim pa z elektrostatično. Vodikova vez poteka med proton donorsko (-OH, -SH, =NH) in proton akceptorsko (=C=O, -O-, -S-, -Cl, -F, -Br, R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>R<sub>3</sub>N) skupino. Lahko je intermolekularna ali intramolekularna. Odgovorna je za značilno strukturo in lastnosti vode in je pomembna pri medmolekulskem prepoznavanju (parjenje DNA molekul). Je kratkosežna in specifična vez, ki je prostorsko usmerjena ter ima kratko življenjsko dobo (približno 10<sup>-12</sup> sekunde) (46, 48).

Vodikova vez je odgovorna za strukturo in stabilnost vode ter biopolimerov. Hidratirani receptor je stabiliziran z intramolekularnimi vodikovimi vezmi, intermolekularnimi vodikovimi vezmi receptor–voda in strukturo vode v okolici (47, 49). Pri vezavi ligandov na receptor je vodikova vez ključen tip interakcije. Zaradi udeležbe lahkega vodikovega

atoma v vodikovi vezi ima tovrstna interakcija znaten nuklearni kvantni karakter. Atom vodika potrebuje kvantno obravnavo gibanja njegovega jedra. Kvantno gibanje atomskega jedra je odvisno od njegove mase. Težji atomi so bolj lokalizirani kot lažji. V vodikovih vezeh proton z maso 1 amu lahko zamenjamo z devteronom, ki ima maso 2 amu. Pri proteinih proces devteracije steče že, če protein inkubiramo v težki vodi (D<sub>2</sub>O). Pri tem se izmenjajo vodikovi atomi, vezani na elektronegativne atome, z atomi devterija. Zaradi kvantne narave gibanja jeder s tem spremenimo strukturo in stabilnost bioloških makromolekul in njihovih ligandov (46, 50).



**Slika 11: Ubbelohdejev efekt.** Če nadomestimo proton z devteronom, zmanjšamo razdaljo med donorjem protona in protonom, ker ima valovna funkcija za devteron manjšo amplitudo gibanja kot proton. Če zmanjšamo razdaljo med donorjem in devteronom, se poveča razdalja med donorjem in akceptorjem protona. Na ta način se spremeni dolžina in stabilnost vodikovih vezi (povzeto po 51).

Zaradi kvantne narave gibanja protona se pri devteraciji poleg O–H razdalje spremeni tudi razdalja med donorjem in akceptorjem protona (slika 11). S spremembo razdalje vodikove vezi se spremeni tudi energija interakcij, torej se pri devteraciji spremeni jakost vodikove vezi. Ker je vodikova vez odgovorna za velik del interakcij v sistemu receptor–voda–ligand, pričakujemo, da se z devteracijo spremeni afiniteta vezave devteriranega liganda na devteriran receptor. Afiniteta se lahko poveča ali zmanjša, saj se spremenijo jakosti vodikovih vezi voda–voda, voda–receptor, voda–ligand in intramolekularne vodikove vezi receptor–receptor (46, 47, 50). Prvo stopnjo raziskovanja učinkov devteracije na funkcijo receptorja predstavlja študija morebitnih sprememb afinitete različnih ligandov do devteriranega receptorja.

## 2. NAMEN DELA

Na histaminski receptor H<sub>2</sub> se lahko vežejo različni ligandi - agonisti in antagonisti. Afiniteta ligandov do receptorja je različna. Praviloma je afiniteta antagonistov večja od afinitete agonistov. Za interakcijo ligand – receptor je pomembna vodikova vez. Če zamenjamo vodik v biomolekuli (farmakološkem receptorju) z devterijem, ki je dvakrat težji, se spremenijo intramolekularne in medmolekularne razdalje, kar se odraža v spremenjeni vezavi liganda na receptor. Pričakujemo, da bo inkubacija v D<sub>2</sub>O spremenila vezavne lastnosti histaminskega receptorja H<sub>2</sub>.

V diplomskem delu bomo preverili naslednje delovne hipoteze:

1. Na astrocitih možganske skorje podgane v primarni kulturi so prisotni histaminski receptorji H<sub>2</sub>.
2. Zaradi spremenjene moči vodikovih vezi in konformacijskih sprememb receptorja, ki jih bo povzročila zamenjava vodika z devterijem, se bo spremenila afiniteta tiotidina in drugih histaminergičnih ligandov do vezavnih mest na histaminskem receptorju H<sub>2</sub>.
3. Devteracija histaminskega receptorja H<sub>2</sub> in ligandov ter posledična zamenjava vodika z devterijem bo povzročila večjo spremembo afinitete vezave na receptor pri agonistih kot pri antagonistih.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. MATERIALI

Pri delu smo potrebovali naslednje materiale:

- gentamicin (Gibco)
- goveji serumski albumin (Sigma)
- medij Leibovitz L-15 (Sigma)
- medij DMEM (Gibco)
- piruvat (Gibco)
- L-glutamat (Gibco)
- fetalni goveji serum (Lonza)
- 0,05 % raztopina tripsin-EDTA (Gibco)
- PBS pufer: pH=7,4 (Gibco)
- Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories)
- Bio-Rad Protein Assay Standard I (Bio-Rad Laboratories)
- scintilacijska tekočina Aquasol (New England Nuclear)
- <sup>3</sup>H-tiotidin: specifična aktivnost 82,2 Ci/mmol (New England Nuclear)
- histamin (Sigma)
- cimetidin (Smith, Kline & French)
- mepiramin (Sigma)
- devterirana voda p.a. (Cambridge Isotope Laboratories)
- askorbinska kislina p.a. (Merck)
- 99,9 % etanol p.a. (Riedel de Haen)
- HCl p.a. (Riedel de Haen)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O p.a. (Merck)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> p.a. (Riedel de Haen)

### 3.1.1. SESTAVA RAZTOPIN

Pri delu smo pripravili raztopine naslednje sestave:

#### Preglednica II: Sestava preparacijske raztopine.

Preparacijska raztopina	
50 ml	medij Leibovitz L-15 (Sigma)
0,05 g	goveji serumski albumin (Sigma)
50 µl	gentamicin (Gibco)

#### Preglednica III: Sestava hranilnega medija.

Hranilni medij	
50 ml	medij DMEM - po Dulbeccu modificiran Eaglov medij (Gibco)
5 ml	fetalni goveji serum (Lonza)
500 µl	100 mM piruvat (Gibco)
500 µl	200 mM L-glutamat (Gibco)
50 µl	50 mg/ml gentamicin (Gibco)

#### Preglednica IV: Sestava raztopine za razredčevanje <sup>3</sup>H-tiotidina.

Raztopina za razredčevanje <sup>3</sup> H-tiotidina	
5 ml	99,9 % etanol (Riedel de Haen)
100 µl	0,5 M HCl (Riedel de Haen)
44,9 ml	0,1 % askorbinska kislina (Merck)

#### Preglednica V: Sestava 0,5 M Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> fosfatnega pufra.

0,5 M Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> fosfatni pufer (pH=7,4), za 1 L	
818 ml	66,7 mM raztopina Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O (Merck)
182 ml	66,7 mM raztopina KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Riedel de Haen)



### **3.1.2. POSKUSNE ŽIVALI**

Za pripravo primarnih kultur astrocitov smo uporabili možganske skorje tri dni starih mladičev podgan obeh spolov seva Wistar po metodi Schwartzove in Wilsonove (52). Vsi postopki na živalih so bili opravljeni v skladu z dovoljenjem Veterinarske uprave Republike Slovenije za izvajanje poskusov na živalih št. 34401-81/2008/5 ter s smernicami za delo s poskusnimi živalmi, ki ga je izdal Komite za zaščito živali Nacionalnih Inštitutov zdravja (Bethesda, ZDA).

## **3.2. METODE**

### **3.2.1. PRIPRAVA PRIMARNIH KULTUR ASTROCITOV**

Tri dni stare podgane je dekapitiral tehnik, ki ima dovoljenje za izvajanje evtanazije poskusnih živali. Nato je iz lobanje vzel možgane in jih potopil v 4 ml preparacijske raztopine. Odstranil je možganske ovojnice in ločil možgansko skorjo od ostalih delov možganov.

Možgansko skorjo smo nato prenesli v centrifugirko, dodali 4 ml preparacijske raztopine in centrifugirali 4 minute pri 1200 obratih/minuto pri sobni temperaturi. Po centrifugiranju smo supernatant odlili, usedlini dodali 4 ml preparacijske raztopine ter suspenzijo s pomočjo pipete suspendirali in s tem mehansko razdrobili možgansko tkivo. Ponovno smo 4 minute centrifugirali pri 1200 obratih/minuto pri sobni temperaturi. Supernatant smo odlili, usedlini dodali 4 ml preparacijske raztopine in zopet s pipeto suspendirali. Suspenzijo smo prenesli v petrijevko in jo suspendirali s pomočjo igel različnih debelin (20, 22, 25  $\mu\text{m}$ ), nato pa jo preko sterilne najlonske mrežice (Nitex, premer pore: 75  $\mu\text{m}$ ) prenesli v centrifugirko. Sledilo je ponovno centrifugiranje (4 minute pri 1200 obratih/minuto pri sobni temperaturi). Supernatant smo po centrifugiranju odlili in usedlini dodali 14 ml hranilnega medija. Suspenzijo smo prenesli v gojilno stekleničko in celice vzgajali v inkubatorju pri 37°C v mešanici 95% zraka in 5% CO<sub>2</sub>.

Ko so celice postale konfluentne, smo zamenjali medij in jih ponovno dali za približno 6 ur v inkubator (37°C, mešanica 95% zraka in 5% CO<sub>2</sub>), nato pa za približno 20 ur na stresalnik pri 100 obratih/minuto. Postopek smo ponovili trikrat. S stresanjem smo odstranili celice mikroglije. Nato smo celicam odlili medij, dodali 10 ml hranilnega

medija, ga odlili in dodali 4 ml raztopine tripsin-EDTA. Celice smo za 20 minut dali v inkubator (37°C, mešanica 95% zraka in 5% CO<sub>2</sub>), nato prenesli vsebino v drugo steklenico in dodali še 10 ml hranilnega medija. Za 24 ur smo jih dali v inkubator in nato zamenjali medij ter s tem odstranili tripsin.

Ko so bile celice ponovno konfluentne, smo odlili medij, dodali 10 ml hranilnega medija, ga nato odlili in dodali raztopino tripsin-EDTA, da so celice odstopile od podlage. Postavili smo jih za 20 minut v inkubator in tiste, ki niso odstopile, s strgalom še potrgali. Suspenziji celic in tripsina smo dodali še 32 ml hranilnega medija ter nato suspenzijo s pomočjo pipete suspendirali, da so se celice enakomerno razporedile po mediju.

Suspenzijo smo odpipetirali v petrijevke s premerom 96 mm (v vsako po 8 ml suspenzije), jih dali v inkubator (37°C, mešanica 95% zraka in 5% CO<sub>2</sub>) za 24 ur in nato zamenjali medij. Ponovno smo jih dali v inkubator in po enem tednu spet zamenjali medij. Ko so postale celice konfluentne, smo jih pobrali v PBS pufru, jih prenesli v centrifugirko in centrifugirali 15 minut pri 12000 obratih/minuto pri sobni temperaturi. Supernatant smo zavrgli, usedlino celic pa shranili v zamrzovalnik pri -70 °C.

### **3.2.2. DOLOČITEV KONCENTRACIJE PROTEINOV**

Koncentracijo proteinov smo določili z metodo po Bradfordu, ki temelji na reakciji beljakovin z barvilom Coomassie Brilliant Blue G-250. Pri reakciji nastane obarvan produkt, ki ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 595 nm.

Uporabili smo reagent za barvanje (*Bio-Rad Protein Assay*), ki vsebuje barvilo Coomassie Brilliant Blue G-250 ter standard (*Bio-Rad Protein Assay Standard I*) z liofiliziranimi govejimi plazemskimi gama globulini.

Pred poskusom smo zamrznjene astrocite odtajali in jim dodali fosfatni pufer. Suspenzijo smo prenesli v teflonski homogenizator in tako zagotovili homogenost suspenzije. Nato smo jo prenesli v merilno epruveto in uporabili del vzorca astrocitov za določitev koncentracije proteinov v suspenziji.

V epruvete smo odpipetirali naraščajoče količine standarda *Bio-Rad Protein Assay Standard I* (2,5 µl, 5 µl, 8 µl, 10 µl, 20 µl in 30 µl) ter 10 µl in 20 µl vzorca (odmrznjeni astrociti). Dodali smo bidestilirano vodo, da je bil skupni volumen v vsaki epruveti 800 µl.

Nato smo dodali še 200 µl reagenta za barvanje *Bio-Rad Protein Assay* in vsebino epruвет premešali. Čez 30 minut smo spektrofotometrično izmerili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm. Meritve smo izvedli v dveh paralelkah.

S pomočjo umeritvene krivulje smo določili koncentracijo proteinov v vzorcu astrocitov, saj je absorbanca obarvane raztopine premo sorazmerna koncentraciji beljakovin v vzorcu. Preparat smo s fosfatnim pufrom razredčili tako, da je vseboval 1 mg proteina/ml.

### **3.2.3. VEZAVA <sup>3</sup>H-TIOTIDINA NA RECEPTORJE H<sub>2</sub> V ASTROCITIH**

V saturacijskih poskusih smo določali celokupno in nespecifično vezavo radioaktivno označenega antagonista receptorjev H<sub>2</sub> (<sup>3</sup>H-tiotidin) na proteine v astrocitih. Nespecifično vezavo smo določali v prisotnosti 10<sup>-5</sup> M cimetidina (antagonist receptorjev H<sub>2</sub>). Določitev nespecifične vezave temelji na predpostavki, da se radioaktivno označeni ligand ob prisotnosti hladnega antagonista v prebitku veže le na nespecifična vezavna mesta, saj dodani antagonist izpodrine radioaktivni ligand in zasede vsa receptorna vezavna mesta. Specifično vezavo radioliganda predstavlja razlika med celokupno in nespecifično vezavo.

Z inhibicijskimi vezavnimi poskusi smo proučevali vezavna mesta histaminskega receptorja H<sub>2</sub>. Uporabili smo raztopine inhibitorjev različnih koncentracij (histamin, cimetidin, mepiramin), s katerimi smo izpodrivali specifično vezan <sup>3</sup>H-tiotidin z vezavnih mest na histaminskem receptorju H<sub>2</sub> v astrocitih.

#### **3.2.3.1. Saturacijska vezava <sup>3</sup>H-tiotidina**

*Celokupna vezava:*

Suspenzijo celic (100 µl raztopine proteinov v koncentraciji 1 mg/ml) smo preinkubirali v 125 µl fosfatnega puфра 3 minute pri 25°C. Čez 3 minute smo dodali 25 µl raztopine <sup>3</sup>H-tiotidina v koncentracijskem območju 1-11 nM. Celoten inkubacijski volumen je znašal 250 µl. Po 15 minutah inkubacije smo vezavo prekinili z dodatkom mrzlega fosfatnega puфра. Nevezan <sup>3</sup>H-tiotidin smo od vezanega ločili z vakuumsko filtracijo skozi steklene mikrofiltre GF/C (Whatman). Filtre smo sprali s fosfatnim pufrom in jih prenesli v Eppendorfove epruvete za merjenje radioaktivnosti v scintilacijskem števcu. V vsako epruveto smo dodali še 1,5 ml scintilacijske tekočine Aquasol in v tekočinskem scintilacijskem števcu (MicroBeta Trilux, Perkin Elmer) izmerili radioaktivnost. Pri

merjenju s scintilacijskim števcem izkoriščamo radioaktivni razpad izotopa in merimo število razpadov na minuto (*cpm – counts per minute*).

Poskus smo po istem postopku ponovili še z dodatkom devterirane vode v inkubacijski medij. Namesto fosfatnega puфра v bidestilirani vodi smo uporabili 125  $\mu$ l fosfatnega puфра, ki smo ga pripravili v težki vodi (D<sub>2</sub>O). Volumen fosfatnega puфра je ostal nespremenjen, prav tako tudi celoten inkubacijski volumen.

#### *Nespecifična vezava:*

Suspenzijo celic (100  $\mu$ l raztopine proteinov v koncentraciji 1 mg/ml) smo preinkubirali v 100  $\mu$ l fosfatnega puфра 3 minute pri 25°C. Čez 3 minute smo dodali 25  $\mu$ l 10<sup>-5</sup> M raztopine cimetidina, po 3 minutah pa še 25  $\mu$ l raztopine <sup>3</sup>H-tiotidina v koncentracijskem območju 1-11 nM. Celoten inkubacijski volumen je znašal 250  $\mu$ l. Po 15 minutah inkubacije smo vezavo prekinili na isti način kot pri celokupni vezavi in po istem postopku vzorcem izmerili radioaktivnost.

Poskus smo ponovili po istem postopku tudi z devterirano vodo. V inkubacijski medij smo dodali 100  $\mu$ l fosfatnega puфра, pripravljenega namesto v bidestilirani v devterirani vodi (D<sub>2</sub>O). Prav tako smo pripravili 25  $\mu$ l 10<sup>-5</sup> M raztopine cimetidina v težki vodi. Volumen devterirane vode je bil enak (125  $\mu$ l) pri poskusu za celokupno in nespecifično vezavo. Končni inkubacijski volumen je ostal enak kot pri osnovnem poskusu.

**Preglednica VI: Časovni prikaz poteka vezavnega poskusa. Opredeljen je tisti čas v minutah, v katerem smo dodali določeno snov v epruveto ter čas začetka in konca inkubacije. (S: slepi vzorec, ki ne vsebuje astrocitov (dve paralelki); Vz: vzorec z astrociti (tri paralelke)).**

		začetek [min]	cimetidin [min]	<sup>3</sup> H-tiotidin [min]	konec [min]
<b>celokupna vezava</b>	S <sub>1</sub>	0	/	3	18
	S <sub>2</sub>	3	/	6	21
	Vz <sub>1</sub>	6	/	9	24
	Vz <sub>2</sub>	9	/	12	27
	Vz <sub>3</sub>	12	/	15	30
<b>nespecifična vezava</b>	S <sub>4</sub>	6	9	18	33
	S <sub>5</sub>	9	12	21	36
	Vz <sub>4</sub>	12	15	24	39
	Vz <sub>5</sub>	15	18	27	42
	Vz <sub>6</sub>	18	21	30	45

### **3.2.3.2. Inhibicija specifične vezave <sup>3</sup>H-tiotidina**

Suspenzijo celic (100 µl raztopine proteinov v koncentraciji 1 mg/ml) smo inkubirali v 125 µl fosfatnega pufru pri 25°C. Po 3 minutah preinkubacije smo dodali 25 µl raztopine inhibitorja v koncentracijskem območju 10<sup>-10</sup>-10<sup>-5</sup> M ter 25 µl 5 nM raztopine <sup>3</sup>H-tiotidina. Kot inhibitorje smo uporabili histamin, agonist histaminskih receptorjev, ter antagonist cimetidin (selektivni H<sub>2</sub> antagonist) in mepiramin (selektivni H<sub>1</sub> antagonist). Celoten inkubacijski volumen je znašal 250 µl. Po 15 minutah smo inkubacijo prekinili na enak način, kot je opisano pri saturacijskih metodah.

Inhibicijski poskus smo izvajali po istem postopku tudi z devterirano vodo. 125 µl fosfatnega pufru smo pripravili v težki vodi, prav tako so bili tudi posamezni inhibitorji pripravljene v devterirani vodi.

### **3.2.4. RAČUNANJE PARAMETROV VEZAVNIH ŠTUDIJ**

#### **3.2.4.1. Določanje parametrov specifične vezave <sup>3</sup>H-tiotidina**

Iz podatkov, ki smo jih dobili iz saturacijskih vezavnih poskusov, smo za vsako uporabljeno koncentracijo <sup>3</sup>H-tiotidina izračunali specifično vezavo radioliganda na histaminski receptor H<sub>2</sub>, katero smo izračunali iz razlike podatkov za celokupno in nespecifično vezavo.

Specifično, nespecifično in celokupno vezavo <sup>3</sup>H-tiotidina na receptor H<sub>2</sub> v odvisnosti od koncentracije radioliganda smo prikazali grafično, z uporabo računalniškega programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.). Iste parametre smo prikazali grafično tudi za poskus, kjer smo vzorce inkubirali v fosfatnem pufru v devterirani vodi. Specifično, nespecifično in totalno vezavo smo v diagramu prikazali kot vrednosti cpm, ki smo jih dobili neposredno iz meritev v scintilacijskem števcu.

Iz izračunanih vrednosti smo narisali diagram specifične vezave <sup>3</sup>H-tiotidina v odvisnosti od koncentracije <sup>3</sup>H-tiotidina, kjer smo primerjali specifično vezavo <sup>3</sup>H-tiotidina v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi s specifično vezavo v fosfatnem pufru v devterirani vodi.

Za grafični prikaz specifične vezave smo uporabili model nelinearne regresije. Stanje ravnotežja opisuje Langmuirova izoterma:

$$B = \frac{B_{\max} \cdot [L^*]}{K_D + [L^*]}$$

B.....specifična vezava radioliganda

B<sub>max</sub>.....maksimalno število specifičnih vezavnih mest

K<sub>D</sub>.....ravnotežna konstanta disociacije kompleksa receptor – radioligand

[L\*].....molarna koncentracija prostega radioliganda

### 3.2.4.2. Določanje parametrov inhibicije specifične vezave <sup>3</sup>H-tiotidina

Pri vsakem poskusu smo najprej izračunali specifično vezavo <sup>3</sup>H-tiotidina na receptor, ki je predstavljala razliko med celokupno in nespecifično vezavo. Za vsako koncentracijo posameznega inhibitorja smo nato izračunali odstotek inhibicije specifične vezave in s pomočjo računalniškega programa GraphPad Prism narisali inhibicijsko krivuljo. Za grafični prikaz smo uporabili model nelinearne regresije, kjer smo inhibicijo specifične vezave radioliganda prikazali kot funkcijo logaritma molarne koncentracije uporabljenega inhibitorja. Iz inhibicijske krivulje smo odčitali koncentracijo hladnega liganda, ki povzroči 50% inhibicije specifične vezave (IC<sub>50</sub>). Za vsak uporabljen inhibitor smo izračunali še ravnotežno konstanto kompleksa receptor – inhibitor (K<sub>i</sub>). Uporabili smo Cheng-Prusoff-ovo enačbo:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [L^*] / K_D}$$

K<sub>i</sub>.....ravnotežna konstanta disociacije kompleksa receptor – inhibitor

K<sub>D</sub>.....ravnotežna konstanta disociacije kompleksa receptor – radioligand

[L\*].....molarna koncentracija prostega radioliganda

IC<sub>50</sub>.....molarna koncentracija hladnega liganda, ki povzroči 50% inhibicijo specifične vezave radioliganda

Vse parametre inhibicije smo izračunali tako za vzorce, inkubirane v fosfatnem pufri, kot tiste, katerim smo v inkubacijski medij dodali devterirano vodo. Grafično smo prikazali primerjavo med posameznimi inhibitorji (histamin, cimetidin, mepiramin) ter vpliv devteracije na afiniteto izpodrivanja specifično vezanega <sup>3</sup>H-tiotidina iz histaminskega receptorja za posamezne inhibitorje.

### **3.2.5. OBDELAVA PODATKOV**

Pri vezavnih poskusih smo za vsako koncentracijo uporabljenega radioliganda oz. inhibitorja pripravili vzorec astrocitov v treh paralelkah. Posamezen poskus smo ponovili najmanj dvakrat, tako da so bili končni podatki predstavljeni kot rezultati najmanj šestih meritev. Za vsak vzorec smo izračunali aritmetično sredino in standardno napako. Razporeditev eksperimentalnih podatkov je ustrezala porazdelitvi po Gaussu (normalna porazdelitev). Večina eksperimentalnih podatkov je bila v bližini aritmetične sredine, velika odstopanja so bila redka oz. so bila posledica napak pri eksperimentalnem delu.

Rezultate vezavnih študij v fosfatnem pufri in fosfatnem pufri v devterirani vodi smo statistično primerjali z neparnim Studentovim t-testom za neodvisne vzorce.

## 4. REZULTATI

V prvem delu diplomske naloge smo z uporabo vezavnih študij z radioligandi določili vezavna mesta histaminskega receptorja H<sub>2</sub> v astrocitih v primarni kulturi. Za označevanje vezavnih mest histaminskih receptorjev H<sub>2</sub> smo uporabili s tricijem označen tiotidin, antagonist receptorjev H<sub>2</sub>. Opravili smo saturacijske in inhibicijske vezavne študije. V drugem delu smo se posvetili raziskovanju vpliva devteracije na vezavne lastnosti histaminskega receptorja H<sub>2</sub>.

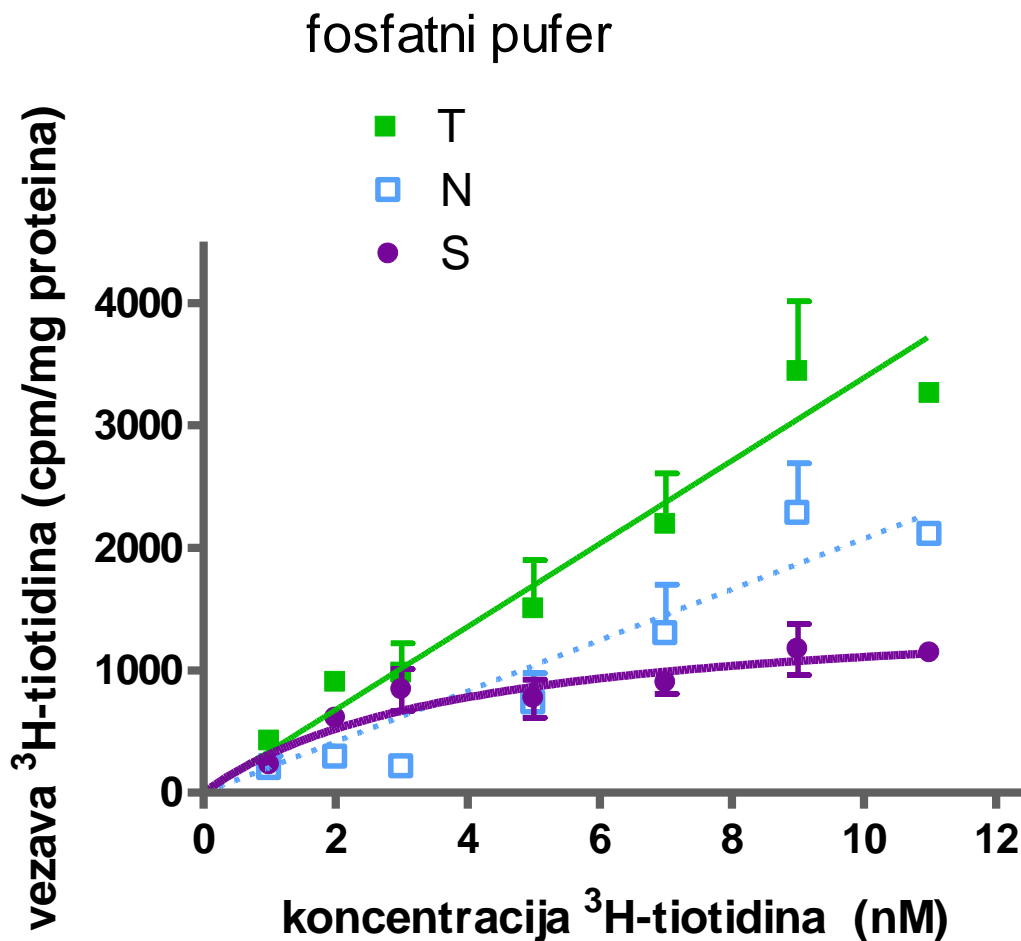
### 4.1. SATURACIJSKA VEZAVA <sup>3</sup>H-TIOTIDINAV FOSFATNEM PUFRU

Pri saturacijskih vezavnih poskusih (slika 12) smo astrocite inkubirali z naraščajočimi koncentracijami radioliganda <sup>3</sup>H-tiotidina v koncentracijskem območju 1-11 nM, kar je predstavlja celokupno vezavo, saj se <sup>3</sup>H-tiotidin veže tako na receptorska kot akceptorska vezavna mesta. Nespecifično vezavo <sup>3</sup>H-tiotidina, antagonist histaminskih receptorjev H<sub>2</sub>, je predstavljal vezava v prebitku cimetidina, ki je prav tako antagonist histaminskih receptorjev H<sub>2</sub>. Specifično receptorsko vezavo pa izračunamo iz razlike med celokupno in nespecifično vezavo.

Rezultati saturacijskih vezavnih poskusov so pokazali prisotnost specifičnih vezavnih mest za <sup>3</sup>H-tiotidin na astrocitih možganske skorje podgane v primarni kulturi. V koncentracijskem območju 1-11 nM je specifična vezava <sup>3</sup>H-tiotidina nasitljiva in reverzibilna ter doseže plato pri približno 6 nM, kar potrjuje omejeno število receptorskih vezavnih mest na astrocitih. Celokupna in nespecifična vezava pa z večanjem koncentracije radioliganda vzporedno linearno naraščata (slika 12).

Analiza nelinearne regresije specifične vezave <sup>3</sup>H-tiotidina je krivulja, ki kaže na prisotnost homogene populacije vezavnih mest z maksimalno gostoto vezavnih mest  $23,9 \pm 4,9$  fmol/mg proteina in ravnotežno disociacijsko konstanto  $5,6 \pm 2,3$  nM (slika 14 in preglednica VII).





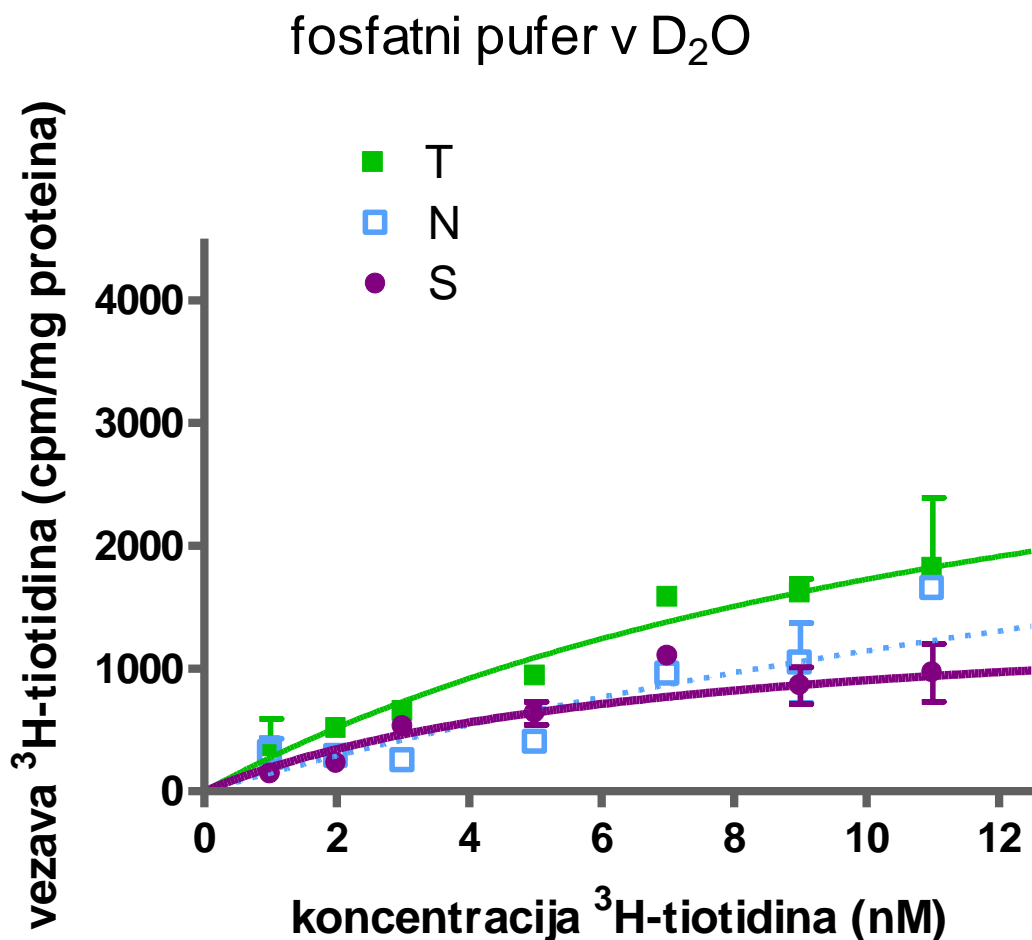
**Slika 12:** Totalna, nespecifična in specifična vezava <sup>3</sup>H-tiotidina na astrocite v odvisnosti od koncentracije radioliganda (0,15 M fosfatni pufer, pH =7,4). Vrednosti za specifično vezavo so izračunane kot razlika med celokupno in nespecifično vezavo radioliganda. Zaradi natančnosti podatkov smo prikazali vezavo z vrednostmi cpm/mg proteina, ki smo jih dobili neposredno iz meritev v scintilacijskem števcu. Podatki so predstavljeni kot aritmetična sredina ± standardna napaka aritmetične sredine najmanj šestih meritev. (T: totalna vezava, N: nespecifična vezava, S: specifična vezava).

## 4.2. SATURACIJSKA VEZAVA <sup>3</sup>H-TIOTIDINA V FOSFATNEM PUFERU V TEŽKI VODI

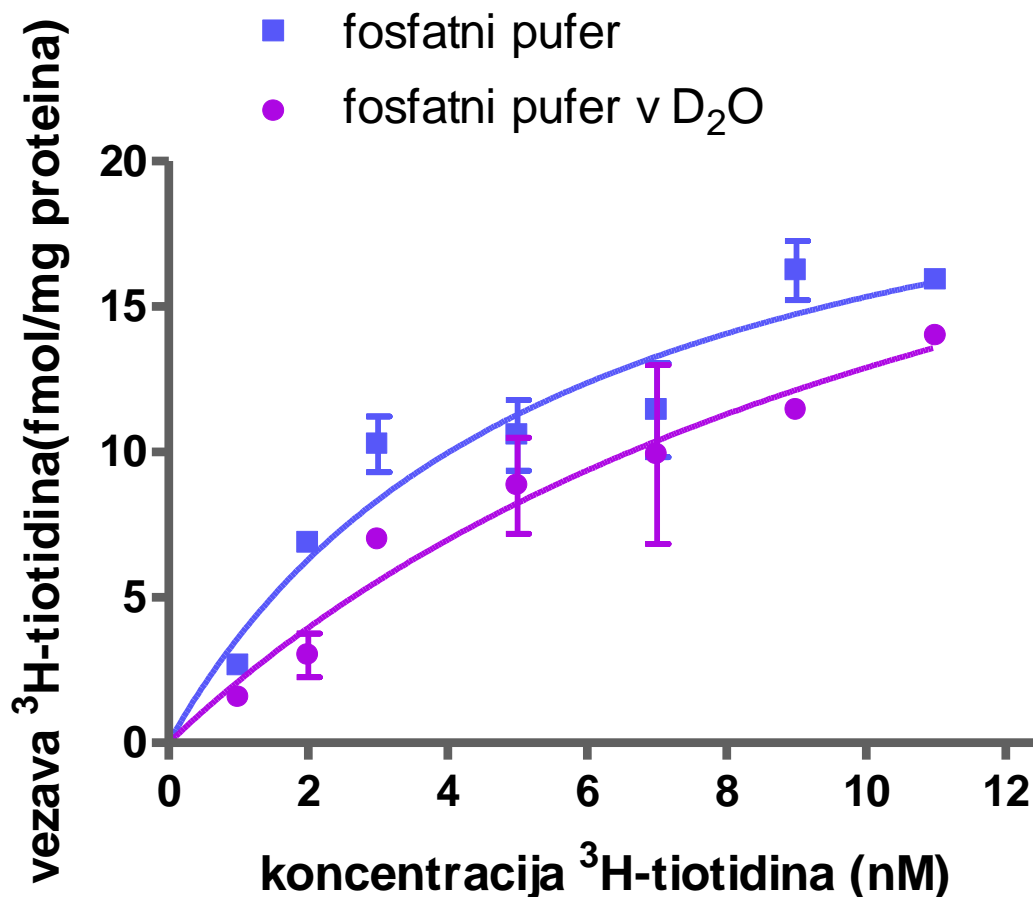
Dodatek devterirane vode v fosfatni pufer je bistveno spremenil vezavne lastnosti tiotidina na vezavna mesta na astrocitih v primarni kulturi. Opazili smo spremenjeno obliko krivulj pri totalni, nespecifični in specifični vezavi. Pri vseh krivuljah, razen pri nespecifični vezavi, se je pojavil plato. Krivulja, ki predstavlja celokupno vezavo, je dosegla nasičenje pri koncentraciji približno 10 nM, krivulja, ki predstavlja specifično vezavo, pa je dosegla plato že pri 5 nM.

Pri inkubaciji v devterirani vodi se je količina vezavnih mest pri celokupni vezavi zmanjšala za 2,2-krat, količina nespecifičnih vezavnih mest pa za 3,2-krat, medtem ko se število specifičnih vezavnih mest ni bistveno spremenilo (slika 13).

Dodatek devterirane vode v inkubacijski medij je povzročil, da so se spremenili parametri vezave, izračunani s pomočjo nelinearne regresije. Maksimalna gostota vezavnih mest se ni bistveno povečala (s  $23,9 \pm 4,9$  fmol/mg proteinov na  $29,6 \pm 15,8$  fmol/mg proteina), medtem ko se je ravnotežna disociacijska konstanta povečala s  $5,6 \pm 2,3$  nM na  $13,0 \pm 10,4$  nM. Poleg bistveno povečanih aritmetičnih sredin se je povečal tudi raztros vrednosti (slika 14 in preglednica VII).



**Slika 13:** Totalna, nespecifična in specifična vezava <sup>3</sup>H-tiotidina na astrocite v odvisnosti od koncentracije radioliganda (0,15 M fosfatni pufer v devterirani vodi, pH =7,4). Vrednosti za specifično vezavo so izračunane kot razlika med celokupno in nespecifično vezavo radioliganda. Zaradi natančnosti podatkov smo prikazali vezavo z vrednostmi cpm/mg proteina, ki smo jih dobili neposredno iz meritev v scintilacijskem števcu. Podatki so predstavljeni kot aritmetična sredina ± standardna napaka aritmetične sredine najmanj šestih meritev. (T: totalna vezava, N: nespecifična vezava, S: specifična vezava).



**Slika 14:** Specifična vezava <sup>3</sup>H-tiotidina na astrocite v odvisnosti od koncentracije radioliganda. Primerjava specifične vezave v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H<sub>2</sub>O) in fosfatnem pufru v devterirani vodi (D<sub>2</sub>O). Podatki so predstavljeni kot aritmetična sredina ± standardna napaka aritmetične sredine najmanj šestih meritev. p-vrednosti so izračunane z uporabo Studentovega t-testa za neodvisne vzorce. Primerjali smo parametre vezave <sup>3</sup>H-tiotidina na receptor v fosfatnem pufru in v fosfatnem pufru v devterirani vodi (p = 0,31).

**Preglednica VII:** Vrednosti K<sub>D</sub> in B<sub>max</sub> za specifično vezavo <sup>3</sup>H-tiotidina na histaminski receptor H<sub>2</sub> v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H<sub>2</sub>O) ter v fosfatnem pufru v težki vodi (D<sub>2</sub>O).

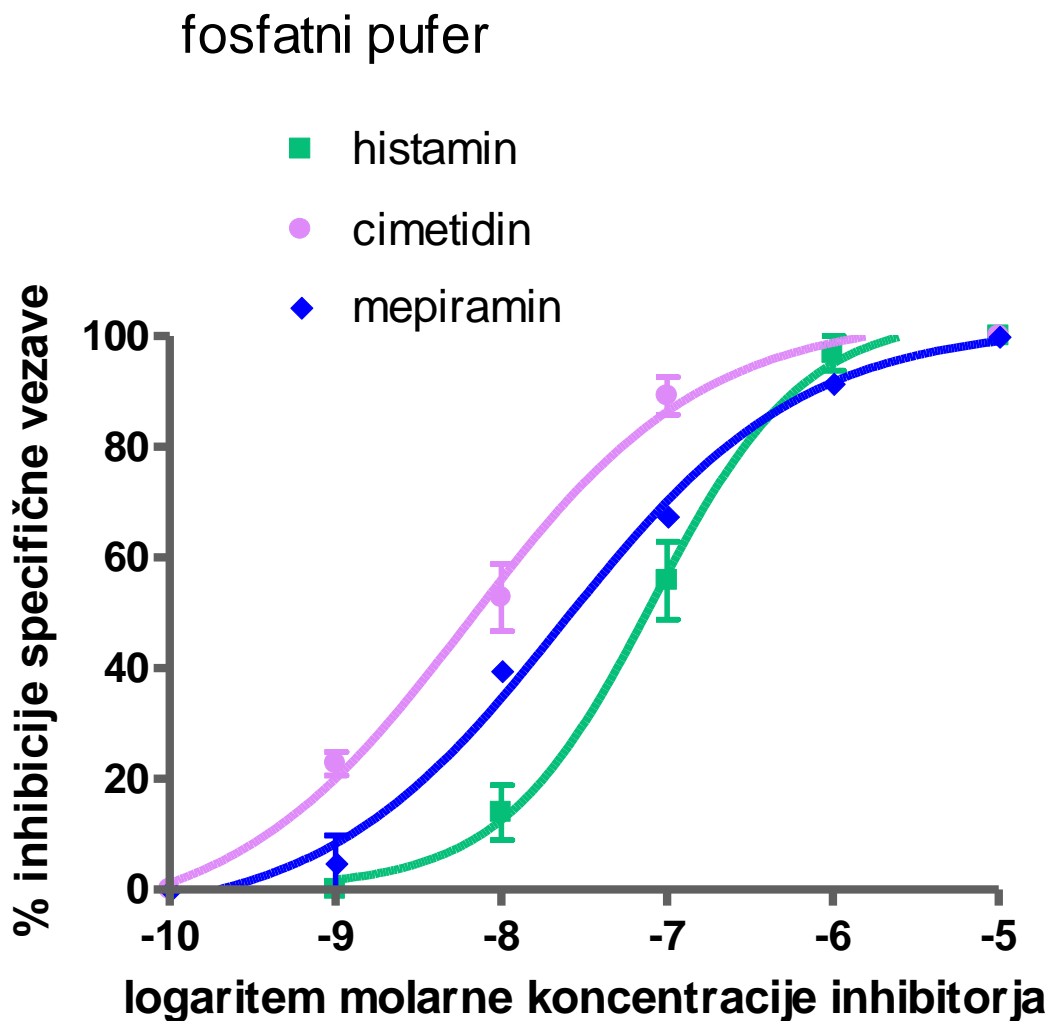
VREDNOSTI K <sub>D</sub> IN B <sub>max</sub>		
	H <sub>2</sub> O	D <sub>2</sub> O
K <sub>D</sub> [nmol/L]	5,6 ± 2,3	13,01 ± 10,4
B <sub>max</sub> [fmol/mg proteina]	23,9 ± 4,9	29,6 ± 15,8

### 4.3. INHIBICIJA SPECIFIČNE VEZAVE <sup>3</sup>H-TIOTIDINA V FOSFATNEM PUFRU

Identifikacijo histaminskih receptorjev H<sub>2</sub> na astrocitih možganske skorje podgane smo potrdili z inhibicijskimi vezavnimi študijami, kjer smo z različnimi antagonistami (cimetidin, mepiramin) in agonistom (histamin) histaminskih receptorjev v koncentracijskem območju 10<sup>-10</sup>-10<sup>-5</sup> M izpodrivali vezan radioligand (<sup>3</sup>H-tiotidin) z njegovih vezavnih mest.

Potrditev, da se je <sup>3</sup>H-tiotidin res vezal na funkcionalni histaminski receptor H<sub>2</sub>, smo dobili z inhibicijskimi poskusi, kjer je imel H<sub>2</sub> specifičen ligand značilno večjo afiniteto do izpodrivanja specifično vezanega <sup>3</sup>H-tiotidina kot ligand, ki bolj specifično deluje na receptorje H<sub>1</sub>. Tako je imel cimetidin večjo afiniteto (pIC<sub>50</sub> = -8,2 ± 0,21) do vezave na histaminski receptor H<sub>2</sub> kot mepiramin (pIC<sub>50</sub> = -7,6 ± 0,17), ki je H<sub>1</sub> specifični antagonist. Poleg tega je imel agonist histamin manjšo afiniteto (pIC<sub>50</sub> = -7,1 ± 0,13) do izpodrivanja vezanega <sup>3</sup>H-tiotidina kot oba antagonist. Na podlagi rezultatov inhibicijskih vezavnih študij lahko sklepamo, da se je <sup>3</sup>H-tiotidin vezal na vezavna mesta funkcionalnega histaminskega receptorja H<sub>2</sub> (slika 15 in preglednica VIII).

Z uporabo Cheng-Prussoff-ove enačbe smo izračunali ravnotežno disociacijsko konstanto kompleksa receptor - inhibitor (K<sub>i</sub>) za posamezen inhibitor, ki nam prikazuje afiniteto inhibitorja do receptorja. Potrdili smo, da ima cimetidin največjo afiniteto do receptorja H<sub>2</sub> (K<sub>i</sub> = 3,17 nM), nato mu sledi mepiramin (K<sub>i</sub> = 13,2 nM), najmanjšo afiniteto pa ima histamin (K<sub>i</sub> = 41,7 nM) (preglednica IX).



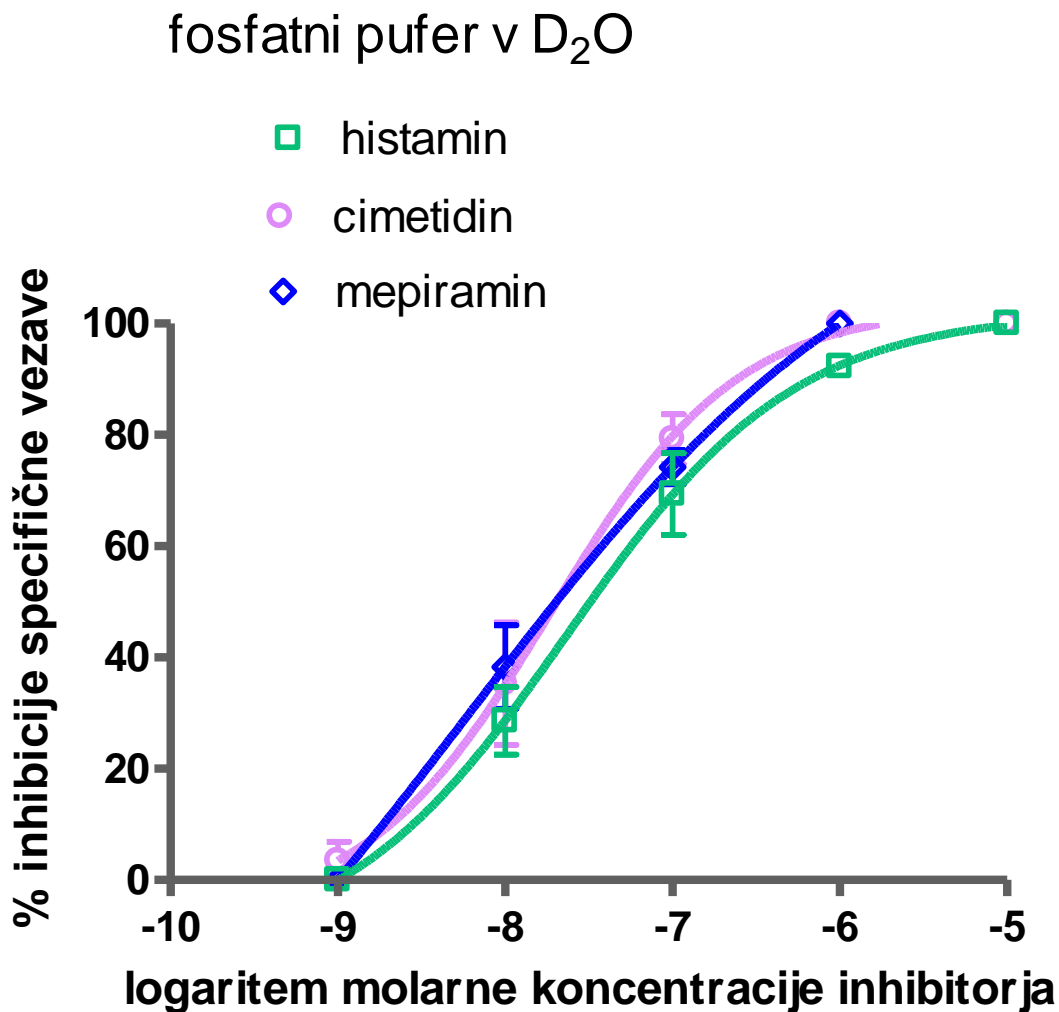
**Slika 15:** Inhibicija specifične vezave <sup>3</sup>H-tiotidina na astrocitih v odvisnosti od različnih koncentracij agonista (histamin) in antagonistov (cimetidin, mepiramin) histaminskih receptorjev (0,15 M fosfatni pufer, pH=7,4). Podatki so predstavljeni kot aritmetična sredina ± standardna napaka aritmetične sredine najmanj šestih meritev.

#### 4.4. INHIBICIJA SPECIFIČNE VEZAVE <sup>3</sup>H-TIOTIDINA V FOSFATNEM PUFRU V TEŽKI VODI

Inhibicijske vezavne študije, ki smo jih opravili v fosfatnem pufru v težki vodi, so pokazale, da so se spremenile K<sub>i</sub> in IC<sub>50</sub> vrednosti ligandov. Še vedno je imel cimetidin večjo afiniteto do izpodrivanja vezanega <sup>3</sup>H-tiotidina kot mepiramin, le-ta pa večjo kot histamin (slika 16).

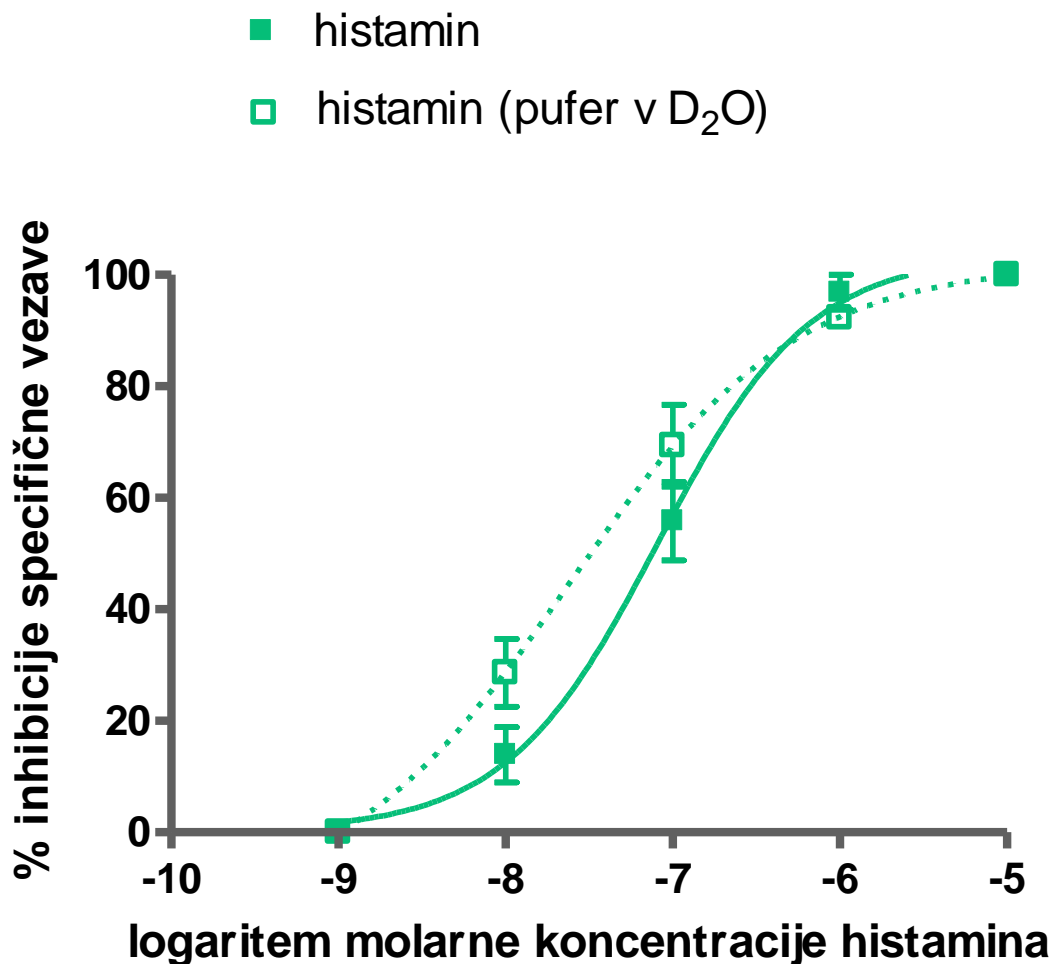
Afiniteta do izpodrivanja <sup>3</sup>H-tiotidina se je spremenila pri cimetidinu in histaminu. Pri cimetidinu se je pIC<sub>50</sub> iz  $-8,2 \pm 0,21$  zmanjšal na  $-7,7 \pm 0,14$ , pri histaminu se je povečal iz  $-7,1 \pm 0,13$  na  $-7,6 \pm 0,25$ , pri mepiraminu pa je ostal približno enak (spremenil se je iz  $-7,6 \pm 0,17$  na  $-7,6 \pm 2,2$ ) (preglednica VIII). Prav tako so se spremenile tudi vrednosti ravnotežne disociacijske konstante (K<sub>i</sub>) za posamezne inhibitorje. K<sub>i</sub> cimetidina se je povečala iz 3,17 nM na 13,7 nM, medtem ko se je pri histaminu K<sub>i</sub> zmanjšala iz 41,7 nM na 18,1 nM. Pri mepiraminu se je K<sub>i</sub> le malo povečala (iz 13,2 nM na 18,1 nM) (preglednica IX).

Spremenila se je oblika inhibicijskih krivulj, kar je razvidno iz vrednosti Hillovega koeficienta (nH) (preglednica X). Inhibicijska krivulja histamina je postala bolj položna, inhibicijska krivulja cimetidina pa bolj strma (sliki 17 in 18). Pri mepiraminu je inhibicijska krivulja ostala nespremenjena (slika 19).

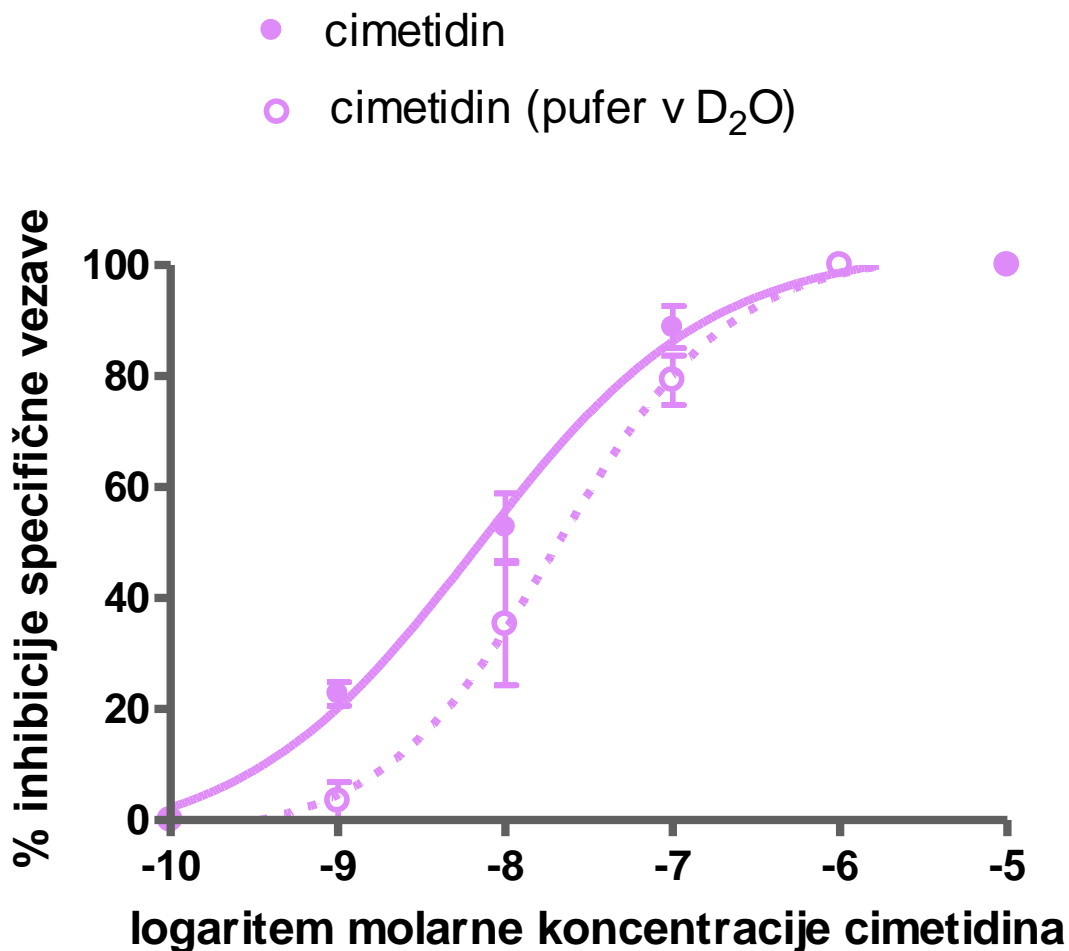


**Slika 16:** Inhibicija specifične vezave <sup>3</sup>H-tiotidina na astrocitih v odvisnosti od različnih koncentracij agonista (histamin) in antagonistov (cimetidin, mepiramin) histaminskih receptorjev (0,15 M fosfatni pufer v devterirani vodi, pH=7,4). Podatki so predstavljeni kot aritmetična sredina ± standardna napaka aritmetične sredine najmanj šestih meritev.

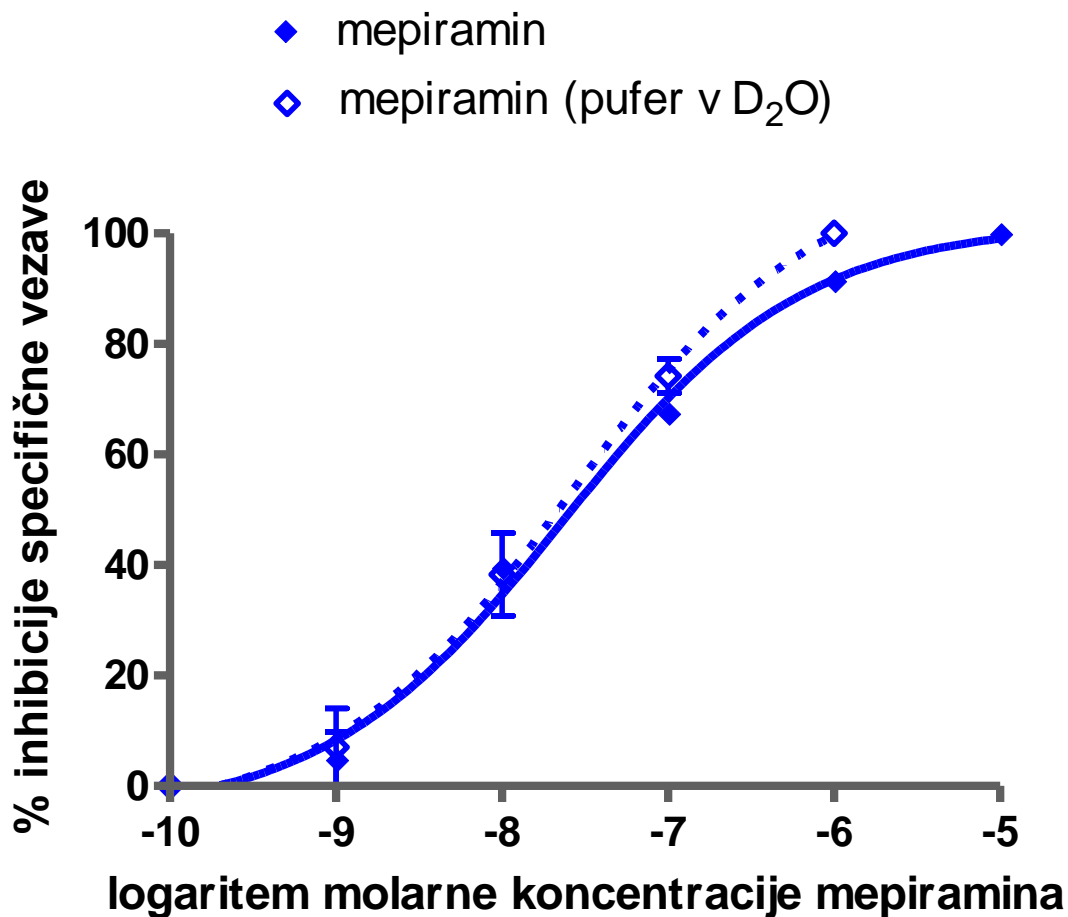




**Slika 17:** Primerjava inhibicije specifične vezave <sup>3</sup>H-tiotidina na astrocite v odvisnosti od različnih koncentracij histamina (agonist histaminskih receptorjev) v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H<sub>2</sub>O) in v fosfatnem pufru v težki vodi (D<sub>2</sub>O). Podatki so predstavljeni kot aritmetična sredina ± standardna napaka aritmetične sredine najmanj šestih meritev. p-vrednosti so izračunane z uporabo Studentovega t-testa za neodvisne vzorce. Primerjali smo inhibicijo vezave <sup>3</sup>H-tiotidina v fosfatnem pufru in v fosfatnem pufru v devterirani vodi (p = 0,083).



**Slika 18:** Primerjava inhibicije specifične vezave <sup>3</sup>H-tiotidina na astrocite v odvisnosti od različnih koncentracij cimetidina (antagonist histaminskih receptorjev H<sub>2</sub>) v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H<sub>2</sub>O) in v fosfatnem pufru v težki vodi (D<sub>2</sub>O). Podatki so predstavljeni kot aritmetična sredina ± standardna napaka aritmetične sredine najmanj šestih meritev. p-vrednosti so izračunane z uporabo Studentovega t-testa za neodvisne vzorce. Primerjali smo inhibicijo vezave <sup>3</sup>H-tiotidina v fosfatnem pufru in v fosfatnem pufru v devterirani vodi (p = 0,71).



**Slika 19:** Primerjava inhibicije specifične vezave <sup>3</sup>H-tiotidina na astrocite v odvisnosti od različnih koncentracij mepiramina (antagonist histaminskih receptorjev H<sub>1</sub>) v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H<sub>2</sub>O) in v fosfatnem pufru v težki vodi (D<sub>2</sub>O). Podatki so predstavljeni kot aritmetična sredina ± standardna napaka aritmetične sredine najmanj šestih meritev. p-vrednosti so izračunane z uporabo Studentovega t-testa za neodvisne vzorce. Primerjali smo inhibicijo vezave <sup>3</sup>H-tiotidina v fosfatnem pufru in v fosfatnem pufru v devterirani vodi (p = 0,66).

**Preglednica VIII: Vrednosti pIC<sub>50</sub> za posamezne inhibitorje v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H<sub>2</sub>O) ter v fosfatnem pufru v težki vodi (D<sub>2</sub>O).**

<b>VREDNOSTI pIC<sub>50</sub></b>		
<b>inhibitor</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>D<sub>2</sub>O</b>
histamin	-7,1 ± 0,13	-7,6 ± 0,25
cimetidin	-8,2 ± 0,21	-7,7 ± 0,14
mepiramin	-7,6 ± 0,17	-7,6 ± 0,22

**Preglednica IX: Vrednosti K<sub>i</sub> za posamezne inhibitorje v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H<sub>2</sub>O) ter v fosfatnem pufru v težki vodi (D<sub>2</sub>O).**

<b>VREDNOSTI K<sub>i</sub> [nM]</b>		
<b>inhibitor</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>D<sub>2</sub>O</b>
histamin	41,7	18,1
cimetidin	3,17	13,7
mepiramin	13,2	18,1

**Preglednica X: Vrednosti Hillovega koeficienta (nH) za posamezne inhibitorje v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H<sub>2</sub>O) ter v fosfatnem pufru v težki vodi (D<sub>2</sub>O).**

<b>VREDNOSTI nH</b>		
<b>inhibitor</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>D<sub>2</sub>O</b>
histamin	0,96	0,64
cimetidin	0,62	0,83
mepiramin	0,60	0,59

## 5. RAZPRAVA

Histamin je pomemben živčni prenašalec v osrednjem živčevju, saj koordinira senzorične, motorične, vegetativne in hormonske funkcije v organizmu (16). Udeležen je pri številnih procesih v možganih, kot so oblikovanje spomina in učenje, cikel spanja in budnosti, presnovni procesi, nevroendokrine funkcije, občutek bolečine. Ima vlogo pri prehranjevanju in vzdrževanju ravnotežja tekočine v organizmu ter uravnavanju telesne temperature. Kljub številnim raziskavam pa pomen histamina v osrednjem živčevju še ni povsem razjasnjen in obeta nova dognanja o delovanju človekovega organizma (25, 26, 34).

Histamin svoje učinke v osrednjem živčevju posreduje preko aktivacije histaminskih receptorjev H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> in H<sub>4</sub>. Pomembne tarčne celice histaminergičnih nevronov so astrociti, ki so najštevilčnejše celice glije in imajo pomembno vlogo pri fizioloških in patofizioloških procesih v možganih (26). Na njihovi površini so do sedaj identificirali histaminske receptorje H<sub>1</sub> in H<sub>2</sub> (18). Astrociti sodelujejo pri privzemanju histamina iz okolja in pri njegovem razgrajevanju, morda pa tudi pri sintezi histamina v osrednjem živčevju. Histamin uravnava številne funkcije astrocitov. Preko aktivacije receptorjev H<sub>1</sub> in H<sub>2</sub> povzroča razgradnjo glikogena, spremembe v proteinih citoskeleta, morfološke spremembe astrocitov, poveča hitrost proliferacije in sproži diferenciacijo astrocitov. Z vezavo na histaminske receptorje pa vpliva tudi na sintezo in sproščanje citokinov in nevrotrofičnih dejavnikov (16).

Histaminski receptorji spadajo med metabotropne receptorje, ki za prenos informacije v celico potrebujejo sklopitev s proteinom G. Vezava histamina na receptor H<sub>2</sub> povzroči konformacijsko spremembo receptorja, kar omogoči sklapljanje s proteinom G<sub>s</sub>. Aktivira se encim adenilat-ciklaza (AC), ki povzroči povečanje koncentracije znotrajceličnega cikličnega adenozin 3',5'-monofosfata (cAMP). Ta aktivira protein-kinazo A (PKA), ki je odgovorna za fosforilacijo celičnih proteinov (26).

Receptorji H<sub>2</sub> vsebujejo sedem hidrofobnih transmembranskih področij, znotrajcelično karboksilno terminalno verigo in zunajcelično terminalno aminsko verigo. Vezavna mesta na receptorju so bila določena z usmerjeno mutagenezo. Predvideva se, da je Asp<sup>98</sup> na tretjem transmembranskem področju primarno vezavno mesto za pozitivno nabiti dušikov atom na stranski verigi histaminske molekule. Asp<sup>186</sup> in Thr<sup>190</sup> na petem

transmembranskem področju sta verjetno odgovorna za tvorbo vodikovih vezi z dušikovimi atomi v imidazolnem obroču histamina (31).

Za interakcijo histamina z receptorjem so torej pomembne vodikove vezi. Če zamenjamo vodik v biomolekuli (farmakološkem receptorju) z devterijem, ki je dvakrat težji, se spremenijo medmolekularne in intramolekularne razdalje, kar se odraža v spremenjeni vezavi liganda na receptor. Pri proteinih proces devteracije steče že, če protein inkubiramo v težki vodi (D<sub>2</sub>O). Pri tem se izmenjajo vodikovi atomi, vezani na elektronegativne atome, z atomi devterija. Zaradi kvantne narave gibanja jeder s tem spremenimo strukturo in stabilnost bioloških makromolekul in njihovih ligandov. Inkubacija astrocitov v D<sub>2</sub>O torej spremeni vezavne lastnosti histaminskega receptorja H<sub>2</sub>.

## **5.1. VEZAVNE KARAKTERISTIKE HISTAMINSKEGA RECEPTORJA H<sub>2</sub>**

V prvem delu diplomske naloge smo z uporabo radioliganda opredelili vezavna mesta na histaminskem receptorju H<sub>2</sub> v primarni kulturi astrocitov možganske skorje tri dni starih podgan in določili njegove molekularno-farmakološke značilnosti.

Histaminski receptor H<sub>2</sub> na astrocitih smo identificirali z vezavo antagonista <sup>3</sup>H-tiotidina, ki se selektivno veže na receptorje H<sub>2</sub>. Specifična vezava <sup>3</sup>H-tiotidina v koncentracijskem območju 1-11 nM je bila nasitljiva in reverzibilna. Z uporabo metode nelinearne regresije specifične vezave <sup>3</sup>H-tiotidina smo potrdili prisotnost homogene populacije vezavnih mest z maksimalno gostoto vezavnih mest  $23,9 \pm 4,9$  fmol/mg proteina. Ravnotežna disociacijska konstanta znaša  $5,6 \pm 2,3$  nM in kaže na visoko afiniteto <sup>3</sup>H-tiotidina do vezavnih mest na receptorju (slika 12).

Če primerjamo rezultate naših vezavnih poskusov z rezultati Metode Lipnik–Štangelj ( $K_D = 1,9$  nM,  $B_{max} = 59 \pm 5$  fmol/mg proteinov), ugotovimo, da imajo slednji višjo afiniteto in gostoto vezavnih mest. To je verjetno posledica različnih razmer pri gojenju astrocitov (drug gojitveni medij). Prav tako je lahko vzrok za večjo gostoto vezavnih mest dejstvo, da smo mi uporabili celice druge pasaže, Lipnik–Štangljeva pa celice ničte pasaže,

ki vsebujejo še druge celice (mikroglijo, nekatere progenitorske celice, lahko tudi živčne celice in fibroblaste) (16).

Nasitljivost, reverzibilnost in velika afiniteta radioliganda ne zadostujejo za dokaz, da gre za vezavo na receptorsko mesto. Ti kriteriji veljajo tudi za vezavo radioliganda na akceptorsko mesto. Za receptorsko mesto je značilno, da vezava agonista povzroči učinek v tarčni celici, medtem ko antagonist ne sproži učinka. Kompetitivni antagonist le zasede receptorsko mesto in tako prepreči vezavo agonista nanj. Potrditev receptorske vezave dosežemo z izpodrivanjem vezanega radioliganda s sorodnimi, a kemijsko različnimi substancami, ki so specifične za ta podtip receptorja.

Prisotnost specifičnih H<sub>2</sub> vezavnih mest smo potrdili z inhibicijskimi vezavnimi študijami, kjer smo specifično vezan <sup>3</sup>H-tiotidin izpodrivali z različnimi inhibitorji. Uporabili smo antagonist (cimetidin in mepiramin) in agonist (histamin) histaminskih receptorjev. Cimetidin je antagonist, specifičen za receptorje H<sub>2</sub>, mepiramin pa je antagonist receptorjev H<sub>1</sub>. Vsi uporabljeni inhibitorji so delovali kompetitivno, v visokih koncentracijah so povzročili stoddostno inhibicijo specifične vezave <sup>3</sup>H-tiotidina. Oblika inhibicijske krivulje se med cimetidinom in mepiraminom ni bistveno razlikovala, pri histaminu pa je bila bolj strma. Vezavo <sup>3</sup>H-tiotidina na astrocite so izpodrivali inhibitorji v naslednjem vrstnem redu: cimetidin > mepiramin > histamin. Vrstni red po moči izpodrivanja specifične vezave <sup>3</sup>H-tiotidina, kjer je imel največjo moč H<sub>2</sub> specifičen antagonist cimetidin, je dokaz, da se je <sup>3</sup>H-tiotidin res vezal na funkcionalni histaminski receptor H<sub>2</sub> v primarni kulturi astrocitov (slika 13).

Rezultati inhibicijskih poskusov potrjujejo tudi dejstvo, da imajo antagonisti večjo afiniteto do vezave na receptor kot agonisti. Receptorji se namreč nahajajo v dveh stanjih – aktivnem in neaktivnem, ki sta v ravnotežju in lahko prehajata ena v drugo. V aktivnem stanju so receptorji že sklopljeni s proteinom G, medtem ko je pri neaktivni obliki po vezavi liganda potrebna še sklopitev. Za antagoniste je značilno, da ne prepoznajo različnih stanj receptorjev in se ponavadi vežejo z enako afiniteto tako na aktivno kot neaktivno obliko, medtem ko imajo agonisti bistveno večjo afiniteto do vezave na že s proteinom G sklopljen receptor (44).

## 5.2. SPREMEMBE VEZAVNIH LASTNOSTI HISTAMINSKIH RECEPTORJEV H<sub>2</sub> NA ASTROCITIH, INKUBIRANIH V D<sub>2</sub>O

V drugem delu diplomske naloge smo astrocite inkubirali v fosfatnem pufru, pripravljenem v težki vodi. Raziskali smo vpliv devteracije na vezavne lastnosti histaminskega receptorja H<sub>2</sub> v primarni kulturi astrocitov možganske skorje. Inkubacija receptorja in ligandov v težki vodi je imela za posledico izmenjavo OH in NH protonov z devterijem in s tem spremenjeno jakost intramolekularnih in intermolekularnih vodikovih vezi. Po pričakovanju so se spremenili parametri vezave ligandov na histaminski receptor H<sub>2</sub>.

Pri saturacijskih vezavnih študijah smo z uporabo radioliganda ugotavljali vpliv devteracije na vezavo <sup>3</sup>H-tiotidina na receptor H<sub>2</sub>. Spremenila se je afiniteta vezave – zmanjšala se je celokupna, nespecifična in specifična vezava <sup>3</sup>H-tiotidina, ki je antagonist histaminskih receptorjev H<sub>2</sub>. Prav tako so se spremenile oblike krivulj, saj se je pri vseh pojavil plato in s tem nasičenje vezavnih mest. Zmanjšala se je tudi količina vezavnih mest - količina nespecifičnih vezavnih mest se je zmanjšala za 3,2-krat, specifičnih za 1,6-krat, pri celokupni vezavi pa za 2,2-krat. Sklepamo lahko, da je pri inkubaciji v težki vodi na histaminskem receptorju manj razpoložljivih vezavnih mest (sliki 13 in 14).

Pri inhibicijskih študijah smo z različnimi inhibitorji izpodrivali specifično vezan <sup>3</sup>H-tiotidin z vezavnih mest histaminskega receptorja H<sub>2</sub> (slika 16). Zamenjava bidestilirane z devterirano vodo v inkubacijskem mediju je povzročila, da se je spremenila afiniteta do izpodrivanja <sup>3</sup>H-tiotidina. Pri cimetidinu, ki je antagonist receptorjev H<sub>2</sub>, se je pIC<sub>50</sub> povečal, torej se je afiniteta zmanjšala. Pri histaminu se je moč izpodrivanja povečala, medtem ko je pri mepiraminu, antagonistu receptorjev H<sub>1</sub>, ostala nespremenjena. Spremenila se je tudi oblika inhibicijskih krivulj - inhibicijska krivulja histamina je postala bolj položna (slika 17), pri cimetidinu bolj strma (slika 18), pri mepiraminu pa je inhibicijska krivulja ostala nespremenjena (slika 19).

Inkubacija receptorja H<sub>2</sub> in ligandov v težki vodi ter posledična zamenjava vodikovih atomov z atomi devterija v vodikovih vezeh je povzročila torej spremembo afinitete vezave pri cimetidinu in tiotidinu (antagonista receptorjev H<sub>2</sub>) ter histaminu (agonist receptorjev H<sub>2</sub>), ki so H<sub>2</sub> selektivni ligandi. Posledica devteracije je bila zmanjšanje afinitete pri antagonistoma in povečanje afinitete pri agonistu, vendar spremembe niso bile statistično značilne. Zanimivo je, da se parametri inhibicije pri mepiraminu, ki je antagonist



receptorjev H<sub>1</sub>, niso spremenili. Sklepamo lahko, da se mepiramin veže na drugo mesto na histaminskem receptorju H<sub>2</sub>. Pri zamenjavi vodikovih atomov z atomi devterija v vodikovih vezeh je zato verjetno pomembna selektivnost liganda za določen podtip receptorja. Za vezavo ligandov na receptor so ključne spremembe na vezavnem mestu, zato so vezavne lastnosti za histaminski receptor H<sub>2</sub> selektivnih ligandov bolj izrazite.

Za načrtovanje novih učinkovitih in specifičnih ligandov za histaminski receptor je potrebno natančno poznavanje njegove strukture in vezavnih mest. Pri vezavi ligandov je pomembna tako primarna, kot sekundarna in terciarna struktura receptorskega proteina, saj sta afiniteta vezave in učinkovitost liganda pogojena s specifičnimi karakteristikami. Ključna vezavna mesta histaminskega receptorja H<sub>2</sub> za endogeni ligand so bila na podlagi metode usmerjene mutageneze določena konec dvajsetega stoletja. Izhajali so iz podobnosti receptorja H<sub>2</sub> z adrenergičnim receptorjem β<sub>2</sub>, katerega struktura in lastnosti so bile predhodno že znane (40, 43). Rezultati so veliko pripomogli k poznavanju lastnosti receptorja. Določili so, katere aminokisliline so ključne za vezavo endogenega liganda na receptor, niso pa mogli predvideti, kako pomembne so vodikove vezi za samo vezavo ter za posledično aktivacijo receptorja po vezavi agonista. Prav tako niso uspeli ugotoviti, ali obstajajo razlike v naravi vezave agonistov in antagonistov na receptor.

V diplomskem delu smo želeli preučiti pomen vodikovih vezi pri vezavi ligandov na histaminski receptor H<sub>2</sub>. Študija, komplementarna dosedanjim ugotovitvam, tako potrjuje pomembnost vodikovih vezi pri vezavi endogenega liganda histamina na receptor H<sub>2</sub>, saj so se z devteracijo receptorja, in s tem spremenjeno jakostjo vodikovih vezi, spremenili tudi parametri vezave različnih ligandov na receptor.

Možna posledica zamenjave vodikovih atomov z atomi devterija v histaminskem receptorju H<sub>2</sub> je, da vezava agonistov na receptor ne bo povzročila konformacijskih sprememb, ki so potrebne za sklopitev s proteinom G ter posledične kaskadne aktivacije receptorja in končnega učinka. Slednje moramo potrditi še z biokemičnimi študijami, kjer bi ugotavljali vpliv devteracije receptorja na nastanek sekundarnih prenašalcev ter s funkcijskimi študijami, kjer bi preučili učinek aktivacije histaminskega receptorja H<sub>2</sub>. Diplomsko delo predstavlja prvo stopnjo raziskovanja učinkov devteracije na funkcijo receptorja, v našem primeru na interakcijo ligand – vezavno mesto na receptorju. Vse nadaljnje študije pa ostajajo izziv za prihodnost.

## 6. SKLEP

Rezultate diplomskega dela lahko povzamemo z naslednjimi ugotovitvami:

1. Vezavne študije z uporabo radioliganda <sup>3</sup>H-tiotidina, antagonist histaminskih receptorjev H<sub>2</sub>, so pokazale, da astrociti vsebujejo vezavna mesta tega receptorja. Vezava <sup>3</sup>H-tiotidina je bila nasitljiva in reverzibilna ter je potrdila prisotnost homogene populacije vezavnih mest z ravnotežno disociacijsko konstanto  $5,6 \pm 2,3$  nM in maksimalno gostoto  $23,9 \pm 4,9$  fmol/mg proteina. Ker je imel cimetidin, ki je antagonist receptorjev H<sub>2</sub>, večjo afiniteto do izpodrivanja specifično vezanega <sup>3</sup>H-tiotidina kot mepiramin, antagonist receptorjev H<sub>1</sub>, lahko sklepamo, da specifična vezavna mesta <sup>3</sup>H-tiotidina pripadajo histaminskemu receptorju H<sub>2</sub>.
2. Dodatek devterirane vode v inkubacijski medij je povzročil zamenjavo vodikovega atoma z devterijem, kar se je odražalo kot spremenjena moč vodikovih vezi. Posledično se je spremenila afiniteta vezave tiotidina, cimetidina in histamina do vezavnih mest histaminskega receptorja H<sub>2</sub>. Afiniteta vezave mepiramina do receptorja H<sub>2</sub> se ni spremenila.
3. Dodatek D<sub>2</sub>O in s tem povezana devteracija receptorja in ligandov je povzročila zmanjšanje afinitete tiotidina in cimetidina, ki sta H<sub>2</sub> selektivna antagonist, do vezavnih mest histaminskega receptorja H<sub>2</sub>. Afiniteta histamina se je povečala, afiniteta mepiramina, ki je H<sub>1</sub> selektiven antagonist, pa je ostala nespremenjena. Pri devteraciji torej nismo dokazali razlik v spremembi afinitete vezave med agonisti in antagonist, temveč se je izkazalo, da je pomembna selektivnost liganda za določen podtip receptorja.

Zaključimo lahko, da je vodikova vez zelo pomembna za vezavo ligandov na histaminski receptor H<sub>2</sub>. Devteracija povzroči spremembo razdalje in s tem tudi jakosti vodikovih vezi, kar posledično vpliva na vezavne lastnosti histaminskega receptorja H<sub>2</sub>.

## 7. VIRI IN LITERATURA

- 1 Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM: **Principles of Neural Science**, 4<sup>th</sup> Edition, McGraw-Hill, New York, 2000: 20-35.
- 2 Koeppen BM, Stanton BA: **Berne & Levy Physiology**, 6<sup>th</sup> Edition, Mosby Elsevier, Philadelphia, 2008: 53-104.
- 3 Conn PM: **Neuroscience in Medicine**, 2<sup>nd</sup> Edition, Humana Press, New Jersey, 2003: 1-24.
- 4 Bear MF, Connors BW, Paradiso MA: **Neuroscience: Exploring the Brain**, 3<sup>rd</sup> Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2007: 23-167.
- 5 Guyton AC, Hall JE: **Textbook of Medical Physiology**, 11<sup>th</sup> Edition, Elsevier Saunders, Philadelphia, 2006: 57-71, 555-71.
- 6 Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC: **Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience**, 2<sup>nd</sup> Edition, McGraw-Hill, New York, 2008: 3-116.
- 7 Siegel GJ: **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**, 7<sup>th</sup> Edition, Elsevier Academic Press, Burlington, 2006: 123-37, 167-83, 249-65.
- 8 Kržan M: **Funkcija astrocitov**. Zdravniški vestnik 2001; 70: 553-9.
- 9 Alberts B: **Molecular Biology of the Cell**, 5<sup>th</sup> Edition, Garland Science, London, 2008: 1491.
- 10 Pfrieger FW, Barres BA: **Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro**. Science 1997; 277: 1684-7.

- 11 Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA: **Control of synapse number by glia**. Science 2001; 291: 657-60.
- 12 Wang DD, Bordey A: **The Astrocyte Odyssey**. Progress in Neurobiology 2008; 86: 342-67.
- 13 Parpura V, Scemes E, Spray DC: **Mechanisms of glutamate release from astrocytes: gap junction “hemichannels”, purinergic receptors and exocytotic release**. Neurochemistry International 2004; 40: 259-64.
- 14 Magistretti PJ: **Astrocytes and brain energy metabolism: possible influence on eating behavior**. Biological Psychiatry 1996; 39: 504.
- 15 Goldstein GW: **Endothelial cell-astrocyte interactions: a cellular model for the blood-brain barrier**. Annals of the New York Academy of Sciences 1988; 529: 31-9.
- 16 Lipnik-Štangelj M: **Vpliv histamina na sproščanje živčnega rastnega dejavnika iz astrocitov možganske skorje**. Doktorska disertacija, Medicinska fakulteta, 1999.
- 17 Carey J: **Brain Facts: A Primer on the Brain and Nervous System**, 4<sup>th</sup> Edition, The Society for Neuroscience, Washington, 2002: 4-7, 46.
- 18 Lipnik-Štangelj M, Čarman-Kržan M: **The influence of histamine H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> and H<sub>3</sub>-receptor antagonists on histamine stimulated NGF release from cultured astrocytes**. Inflammation Research 2001, 50: 84-5.
- 19 Rang HP, Dale MM, Flower RJ: **Rang & Dale's Pharmacology**, 6<sup>th</sup> Edition, Churchill Livingstone, Oxford, 2007: 8-53, 213-4.
- 20 Barocelli E, Ballabeni V: **Histamine in the control of gastric acid secretion: a topic review**. Pharmacological Research 2003; 47: 299-304.

- 21 Lemke TM, Williams DA, Roche VF, Zito SW: **Foye's Principles of Medical Chemistry**, 6<sup>th</sup> Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2008. 1004-27.
- 22 Rajtar S: **Vpliv amitriptilina in sertralina na kinetiko eksogenega histamina v krvi mačke v in vitro poskusih**. Medicinski razgledi 2004; 43: 339-49.
- 23 Ogasawara M, Yamauchi K, Satoh Y, Yamaji R, Inui K, Jonker JW, Schinkel AH, Maeyama K: **Recent Advances in Molecular Pharmacology of the Histamine Systems: Organic Cation Transporters as a Histamine Transporter and Histamine Metabolism**. Journal of Pharmacological Sciences 2006; 101: 24-30.
- 24 Yokoyama H: **The role of central histaminergic neuron system as an anticonvulsive mechanism in developing brain**. Brain & Development 2001; 23: 542-7.
- 25 Brown RE, Stevens DR, Haas HL: **The Physiology of brain Histamine**. Progress in Neurobiology 2001; 63: 637-72.
- 26 Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O: **Histamine in the Nervous System**. Physiological Reviews 2008; 88: 1183-241.
- 27 Passani MB, Bacciottini L, Mannaioni PF, Blandina P: **Central histaminergic system and cognition**. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 2000; 24: 107-13.
- 28 MacGlashan D: **Histamine: A mediator of inflammation**. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2003; 112: 53-9.
- 29 Akdis A, Blaser K: **Histamine in the immune regulation of allergic inflammation**. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2003; 112: 15-22.
- 30 Togias A: **H<sub>1</sub>-Receptors: Localization and role in airway physiology and in immune functions**. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2003; 112: 60-8.

- 31 Kržan M: **Razporeditev, značilnosti, pomen in vloga histaminskih receptorjev H<sub>1</sub> in H<sub>2</sub> v srcu.** Doktorska disertacija, Medicinska fakulteta, 1995.
- 32 Blyth DI: **Some effects of histamine in the depolarized rat uterus.** British Journal of Pharmacology 1973; 49: 445-56.
- 33 Yanai K, Tashiro M: **The physiological and pathophysiological roles of neuronal histamine: An insight from human positron emission tomography studies.** Pharmacology & Therapeutics 2007; 113: 1-15.
- 34 Passani MB, Giannoni P, Bucherelli C, Baldi E, Blandina P: **Histamine in the brain: Beyond sleep and memory.** Biochemical Pharmacology 2007; 73: 1113-22.
- 35 Blandina P, Efooudebe M, Cenni G, Mannaioni P, Passani MB: **Acetylcholine, Histamine and Cognition: Two Sides of the Same Coin.** Learning & Memory 2004; 11: 1-8.
- 36 Anaclet C, Parmentier R, Ouk K, Guidon G, Buda C, Sastre JP, Akaoka H, Sergeeva OA, Yanagisawa M, Ohtsu H, Franco P, Haas HL, Lin JS: **Orexin/Hypocretin and Histamine: Distinct Roles in the Control of Wakefulness Demonstrated Using Knock-Out Mouse Models.** The Journal of Neuroscience 2009; 29: 14423-38.
- 37 Schwartz JC, Arrang JM, Garbarg M, Pollard H, Ruat M: **Histaminergic Transmission in the Mammalian Brain.** Physiological Reviews 1991; 71: 1-51.
- 38 Fernandez-Novoa L, Cacabelos R: **Histamine function in brain disorders.** Behavioural Brain Research 2001; 124: 213-33.
- 39 Čarman-Kržan M: **Molekularna farmakologija membranskih receptorjev.** Medicinski razgledi 1987; 26: 31-51.

- 40 Leurs R, Smit MJ, Timmerman H: **Molecular Pharmacological Aspects of Histamine Receptors**. *Pharmacology & Therapeutics* 1995; 66: 413-63.
- 41 Čarman-Kržan M, Lipnik-Štangelj M: **Molecular properties of central and peripheral histamine H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptors**. *European Journal of Physiology* 2000; 439: 131-2.
- 42 de Esch IJP, Thurmond RL, Jongejan A, Leurs R: **The Histamine H<sub>4</sub> receptor as a new therapeutic target for inflammation**. *Trends in Pharmacological Sciences* 2005; 26: 462-9.
- 43 Del Valle J, Gantz I: **Novel insight into histamine H<sub>2</sub> receptor biology**. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 1997; 273: 987-96.
- 44 Kenakin T: **A Pharmacology Primer: Theory, Application and Methods**, 1<sup>st</sup> Edition, Elsevier Academic Press, San Diego, 2004: 37-122.
- 45 Martini FH, Bartholomew EF: **Essentials of Anatomy & Physiology**, 4<sup>th</sup> Edition, Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, 2007: 28-55.
- 46 Sheu SY, Schlag EW, Selzle HL, Yang DY: **Molecular Dynamics of Hydrogen Bonds in Protein - D<sub>2</sub>O: The Solvent Isotope Effect**. *Journal of Physical Chemistry A* 2008; 112: 797-802.
- 47 Jasnin M: **Atomic-scale dynamics inside living cells explored by neutron scattering**. *Journal of the Royal Society Interface* 2009; 6: 611-7.
- 48 Klaholz BP, Moras D: **C-H---O Hydrogen Bonds in the Nuclear Receptor RAR $\gamma$  – a Potential Tool for Drug Selectivity**. *Structure* 2002; 10: 1197-204.
- 49 Goodey NM, Benkovic SJ: **Allosteric regulation and catalysis emerge via a common route**. *Nature Chemical Biology* 2008; 4: 474-82.

- 50 Efimova YM, Haemers S, Wierczinski B, Norde W: **Stability of Globular Proteins in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O**. Biopolymers 2006; 85: 264-73.
- 51 Stare J: **Dinamika in struktura sistemov s kratkimi vodikovimi vezmi**. Doktorska disertacija, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2003.
- 52 Schwartz JP, Wilson DJ: **Preparation and characterization of type 1 astrocytes cultured from adult rat cortex, cerebellum and striatum**. Glia 1992; 5: 75-80.