

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

ANDREJA RAZTRESEN

DIPLOMSKA NALOGA

**VPLIV MOŽGANSKEGA PODROČJA NA LASTNOSTI
PRIVZEMA HISTAMINA V ASTROCITE**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za *farmacijo*



ANDREJA RAZTRESEN

**VPLIV MOŽGANSKEGA PODROČJA NA LASTNOSTI PRIVZEMA
HISTAMINA V ASTROCITE**

**BRAIN REGION-DEPENDENT CHARACTERISTICS OF HISTAMINE
TRANSPORT INTO ASTROCYTES**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem izdelala na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Mojce KRŽAN.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mojci Kržan za vso strokovno pomoč, nasvete in vzpodbudo pri izdelavi diplomskega dela. Posebej velika zahvala gre Katji Perdan Pirkmajer, dr. med., za vodenje celotne diplomske naloge, za ves vložen trud, potrpežljivost in strokovno pomoč ter za podarjeno znanje in izkušnje.

Zahvaljujem se tudi tehnični sodelavki Jožici Košir za pomoč pri izvajanju poskusov.

Zahvaljujem se tudi staršem in vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri nastajanju dela.

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala, pod mentorstvom prof. dr. Mojce Kržan.

Andreja Rztresen

Predsednik komisije: prof. dr. Danijel Kikelj, mag. farm.

Član komisije: prof. dr. Janko Kos, univ. dipl. kem.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	III
ABSTRACT	V
KAZALO SLIK.....	VI
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO GRAFOV	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV.....	X
1. UVOD	- 1 -
1. 1. MOŽGANI	- 1 -
1. 1. 1. VELIKI MOŽGANI - CEREBRUM	- 1 -
1. 1. 2. MALI MOŽGANI – CEREBELUM.....	- 2 -
1. 1. 3. STRIATUM	- 5 -
1. 2. CELICE	- 7 -
1. 2. 1. CELICE GLIJE	- 7 -
1. 2. 1. 1. ASTROCITI	- 8 -
1. 3. NEVROTRANSMITERJI	- 12 -
1. 3. 1. Sinteza	- 13 -
1. 3. 2. Skladiščenje.....	- 13 -
1. 3. 3. Sproščanje nevrotransmiterjev	- 13 -
1. 3. 4. Mehanizem delovanja nevrotransmiterjev	- 14 -
1. 3. 5. Inaktivacija nevrotransmiterjev	- 15 -
1. 3. 6. Prenos nevrotransmiterjev	- 15 -
1. 4. HISTAMIN.....	- 18 -
1. 4. 1. KEMIČNA STRUKTURA	- 19 -
1. 4. 2. HISTAMIN V CENTRALNEM ŽIVČNEM SISTEMU.....	- 19 -
1. 4. 2. 1. Sinteza	- 20 -
1. 4. 2. 2. Histamin kot nevrotransmitter.....	- 20 -
1. 4. 2. 3. Histaminergični sistem.....	- 21 -
1. 4. 2. 4. Učinkovanje histamina.....	- 22 -
1. 4. 2. 5. Funkcija histamina v CŽS	- 24 -

1. 4. 2. 6. Inaktivacija	- 26 -
2. NAMEN DELA.....	- 30 -
3. MATERIALI.....	- 31 -
3. 1. MATERIALI	- 31 -
3. 2. OPREMA.....	- 32 -
4. METODE	- 33 -
4. 1. POSKUSNE ŽIVALI	- 33 -
4. 2. PRIPRAVA PRIMARNIH KULTUR ASTROCITOV	- 33 -
4. 3. PRIVZEM HISTAMINA V KULTURE ASTROCITOV	- 34 -
4. 4. DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV	- 35 -
4. 5. ANALIZA PODATKOV	- 36 -
5. REZULTATI.....	- 37 -
5. 1. ČASOVNI PRIVZEM ^3H – HISTAMINA.....	- 37 -
5. 2. KONCENTRACIJSKA ODVISNOST.....	- 38 -
5. 2. 1. Od koncentracije ^3H – histamina odvisen privzem	- 39 -
5. 2. 2. Specifični privzem histamina	- 40 -
5. 2. 3. Hitrost privzema histamina	- 41 -
5. 3. INHIBICIJA PRIVZEMA ^3H – HISTAMINA V ASTROCITE.....	- 42 -
5. 3. 1. Vpliv antidepressivnih učinkovin	- 43 -
5. 3. 2. Vpliv inhibitorjev OCT	- 45 -
6. RAZPRAVA	- 47 -
7. SKLEP.....	- 53 -
8. VIRI IN LITERATURA	- 55 -

POVZETEK

Glijo so dolgo časa opisovali kot pasivno in nevzdražno vezivno tkivo. Danes vemo, da ima glija zelo kompleksno vlogo. Astrociti kot najbolj razprostranjena in hkrati najštevilčnejša vrsta celic glije v osrednjem živčevju opravljajo različne vloge v različnih življenjskih obdobjih, med drugim intenzivno sodelujejo pri inaktivaciji številnih neurotransmiterjev. V astrocitih so dokazali prisotnost transportnih proteinov in encimov, ki razgrajujejo številne neurotransmiterje, tudi za biogene amine. Čeprav specifičnega transporterja za histamin še niso identificirali, obstajajo podatki, da astrociti privzemajo histamin.

Histamin kot neurotransmitter tesno sodeluje pri vseh osnovnih možganskih funkcijah, vključen pa je tudi v patofiziologijo nekaterih bolezenskih stanj. Histaminergični nevroni izhajajo iz tuberomamilarnega jedra v posteriornem bazalnem hipotalamusu, od koder projicirajo praktično v celotne možgane in del hrbtenjače. Gostota histaminergičnih vlaken je različna v različnih regijah. V možganski skorji in striatumu je histaminergičnih nevronov več kot v malih možganih. Zaradi slednjega dejstva in zaradi različnih vlog histamina v različnih regijah možganov smo raziskovali, kako se razlikujejo lastnosti privzema histamina v kulture astrocitov, pripravljene iz različnih možganskih regij neonatalnih podgan.

V naši raziskavi so nas zanimale kinetične in farmakološke lastnosti privzema histamina v kulture astrocitov, pripravljene iz malih možganov in striatuma 3 dni starih podgan. Želeli pa smo tudi preveriti morebitno vpletenost OCT-jev (angl. OCT - *organic cation transporter* - transporter organskih kationov) v privzem histamina. Od kinetičnih lastnosti transporta smo proučevali časovno in koncentracijsko odvisnost, izvedli pa smo tudi inhibicijsko študijo z uporabo različnih inhibitorjev privzema.

Rezultati naših raziskav kažejo, da poteka privzem histamina v astrocitne kulture obeh preiskovanih regij, in sicer vsaj preko dveh mehanizmov. Obstajajo precejšnje razlike pri privzemu ^3H -histamina v kulture astrocitov, pripravljene iz različnih možganskih regij neonatalnih podgan. Transportni sistem striatuma ima veliko večjo kapacitivnost. Privzem histamina v astrocitne kulture striatuma poteka hitreje in z veliko večjo afiniteto kot v astrocitne kulture cerebeluma. Privzem histamina verjetno ne poteka preko OCT.

Farmakološka karakterizacija privzema pa je pokazala, da je dezipramin inhibiral privzem histamina v astrocitne kulture striatuma, na privzem histamina v cerebelarne astrocitne kulture pa ni imel vpliva.

Rezultati diplomskega dela predstavljajo dodaten dokaz, da imajo astrociti različne funkcije v različnih možganskih regijah.

Ključne besede: neurotransmitter histamin, astrociti, privzem

ABSTRACT

Astrocytes, the most abundant cells within the human brain were far long considered as passive, connective tissue. Nowadays, we are aware that astrocytes have a complex function in different phases of brain development and maturation. They also actively participate in the inactivation of neurotransmitters. Thus they express different transporters and enzymes, which take part in the metabolism of neurotransmitters. Histamine transport has not been elucidated, yet. Nevertheless, it has been reported that astrocytes take up histamine.

Neurotransmitter histamine is involved in many brain functions and etiopathogenesis of many neurological diseases. Histaminergic neurons originate in the tuberomammillary nucleus of posterior basal hypothalamus and project into different brain and spinal regions. The density of histaminergic innervations is brain-region dependent. Cortex and striatum possess more histaminergic innervations than cerebellum. Due to this fact and brain-region dependent role of histamine, we decided to investigate the characteristics of histamine uptake in astrocytes raised from rat striatum and cerebellum. We focused our study toward kinetic and pharmacological properties of histamine transport in primary astrocytes cultures, raised from newborn rat cerebellum and striatum. Next goal was to check whether the possible role of OCT (OCT-organic cation transporter) in histamine innervations. We investigated time and concentrations-dependent kinetic parameters and the influence of different compounds on histamine uptake.

Our results showed that histamine is taken up into astrocytes from both brain regions by two different mechanisms. There is a big difference of histamine uptake into astrocytes from different brain-regions. Histamine uptake is higher into striatal astrocytes. Organic cation transporters are not involved in histamine transport. The rate and affinity of histamine uptake is significantly higher for striatal than in cerebellar astrocytes. Desipramine, inhibits the uptake of histamine only into striatal astrocytes, but has no influence on histamine uptake into glial cells from cerebellum.

Our results provide additional evidence for the brain-region specific function of astrocytes.

KAZALO SLIK

Slika 1: Prva slika prikazuje lego malih možganov. Na drugi sliki je predstavljena trodelna zgradba malih možganov in funkcije, ki jih opravlja posamezen del.	- 3 -
Slika 2: Striatum. Sestavljen je iz kavdatnega jedra in putamenta	- 6 -
Slika 3 : Astrocit vzgojen iz korteksa neonatalnih podgan v primarni kulturi in barvan z GFAP (1:1000).	- 9 -
Slika 4: Shematski prikaz dogajanj v sinapsi.	- 14 -
Slika 5: Struktura decinija 22	- 18 -
Slika 6: Shematski in tridimenzionalni prikaz molekule histamina	- 19 -
Slika 7: Tvorba histamina iz aminokisline L-histidin z encimom L-histidin dekarboksilazo in metabolizem histamina.....	- 20 -
Slika 8: Shema histaminergičnega sistema z jedri histaminergičnih nevronov v tuberomamilarnem nukleusu in projekcijami po celotnih možganih	- 21 -
Slika 9: Shematski prikaz metabolizma histamina	- 26 -

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Vloga histamina v osrednjem živčevju.	- 25 -
Preglednica II: Seznam uporabljene opreme	- 32 -

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Odnos hitrosti specifičnega privzema (celokupni minus nespecifični privzem) v odvisnosti od koncentracije ^3H -histamina v primarne kulture astrocitov, pripravljene iz možganske skorje 3 dni starih podgan. Astrocitne kulture so bile inkubirane 20 minut v koncentracijskem območju od 0,125 do 90 $\mu\text{mol/L}$ pri 37 °C in 4 °C. Specifični privzem ^3H -histamina predstavlja razliko med celokupnim (privzem histamina pri 37 °C) in nespecifičnim (privzem histamina pri 4 °C) privzemom. Histamin se v neonatalne astrocite privzema s K_m $3,5 \pm 0,8 \mu\text{M}$ in V_{max} $7,9 \pm 0,3 \text{ pmol/mg}$ proteinov. Vsaka vrednost na sliki predstavlja srednjo vrednost šestih določitev (Osredkar et al., 2009).....	- 28 -
Graf 2: Časovni potek privzema 125 nM ^3H - histamina v primarne kulture astrocitov, pripravljene iz možganske skorje neonatalnih podgan. S polnimi simboli je prikazan celokupni privzem ^3H – histamina pri 37 °C, s praznimi simboli pa nespecifični privzem ^3H – histamina pri 4 °C. Vsaka vrednost na sliki predstavlja srednjo vrednost šestih določitev (Osredkar et al., 2009).....	- 28 -
Graf 3: Časovni potek privzema 125 nM ^3H – histamina v primarne kulture astrocitov, pripravljene iz malih možganov neonatalnih podgan in striatuma neonatalnih podgan. S polnimi simboli je prikazan celokupni privzem ^3H – histamina pri 37 °C, s praznimi simboli pa nespecifični privzem ^3H – histamina pri 4 °C. Vsaka vrednost predstavlja srednjo vrednost dveh poskusov opravljenih v triplikatih.....	- 37 -
Graf 4: Privzem naraščajočih koncentracij ^3H – histamina v primarne kulture astrocitov, pripravljene iz malih možganov in striatuma neonatalnih podgan. S polnimi simboli je prikazan celokupni privzem ^3H – histamina pri 37 °C, s praznimi simboli pa nespecifični privzem ^3H – histamina pri 4 °C. Vsaka vrednost predstavlja srednjo vrednost dveh poskusov opravljenih v triplikatih.....	- 39 -
Graf 5: Koncentracijsko odvisen privzem ^3H - histamina v primarne kulture neonatalnih astrocitov cerebeluma in striatuma. Prikazana je srednja vrednost. Vsaka vrednost predstavlja srednjo vrednost dveh poskusov opravljenih v triplikatih.....	- 40 -
Graf 6: Graf koncentracijske odvisnosti hitrosti privzema ^3H -histamina v primarno kulturo neonatalnih astrocitov cerebeluma in striatuma. Prikazana je srednja vrednost. Vsaka vrednost predstavlja srednjo vrednost dveh poskusov opravljenih v triplikatih.....	- 41 -
Graf 7: Vpliv inhibitorjev na privzem ^3H - histamina v primarne kulture astrocitov, pripravljene iz cerebeluma in striatuma neonatalnih podgan. Uporabili smo predstavnike treh	

različnih skupin antidepresivnih učinkovin, in sicer amitriptilin, dezipramin in fluoksetin. Astrocite smo predinkubirali 20 minut z izbranimi inhibitorji in nato dodali 125 nM ^3H - histamina. Rezultati so predstavljeni s srednjo vrednostjo dveh poskusov opravljenih v triplikatih. Zvezdica označuje statistično značilnost $p < 0,01$, dve zvezdici pa pomenita statistično značilnost $p < 0,001$ - 43 -

Graf 8: Vpliv inhibitorjev na privzem ^3H - histamina v primarne kulture astrocitov, pripravljene iz cerebeluma in striatuma neonatalnih podgan. Astrocite smo predinkubirali 20 minut z izbranimi koncentracijami inhibitorjev OCT (kortikosteron in decinij 22), preden smo dodali 125 nM ^3H - histamina. Po 20 minutah smo reakcijo prekinili. Rezultati so predstavljeni kot % privzema samega ^3H - histamina, kjer kontrola predstavlja 100 %. Podane so srednje vrednosti dveh poskusov opravljenih v triplikatih. - 45 -

SEZNAM OKRAJŠAV

ABC transporterje – (angl. *ATP binding cassettes* - ATP vezavne kasete)

ACTH – adrenokortikotropin

ATP – adenzin-5'-trifosfat

BDNF – (angl. *brain-derived neurotrophic factor*) nevrotrofični dejavnik možganskega izvora

cAMP – adenzin-3',5'-monofosfat

cGMP – gvanozin-3',5'-monofosfat

CNTF – (angl. *ciliary neurotrophic factor*) ciliarni nevrotrofični dejavnik

CSF – (angl. *cerebrospinal fluid*) cerebrospinalna tekočina

CŽS – centralni živčni sistem

D 22 – decinij 22

DAG – diacilglicerol

DAO – diamin oksidaza

FCS – (fetal calf serum) fetalni telečji serum

GABA – gama-aminobutirna kislina

GDNF – (angl. *glial-derived neurotrophic factor*) nevrotrofični dejavnik glialnega izvora

GFAP – (angl. *glial fibrillary acid protein*) glialna fibrilarna kislina beljakovina

HDC – histidin dekarboksilaza

HEPES – 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina

HNMT – histamin N-metiltransferaza

IP₃ – inozitol-1,4,5-trifosfat

K_m – Michaelisova konstanta

KOMT – katehol-o-metil transferaza

LH – luteinizirajoči hormon

MAO A in B – monoamin oksidaza A in B

MIAA – (methylimidazoleacetic acid) 1-metil-4-imidazolacetilne kisline

NCAM – (angl. *neural cell adhesion molecule*)

NET – noradrenalinski transportni proteini

NGF – (angl. *nerve growth factor*) živčni rastni dejavnik

NO – dušikov oksid

NOS – NO-sintaza

NSRI – inhibitorji ponovnega privzema noradrenalina in serotonina

NTT – transporter za nevrotransmitter

OCT –(organic cation transporter) transporter organskih kationov

PKA – protein kinaza A

PKC – protein kinaza C

PLA₂ – fosfolipaza A₂

PLC – fosfolipaza C

R – receptor

SEM – standardna napaka aritmetične sredine

SERT – serotoniniski transportni proteini

SLC – (solute carrier) olajšan transport

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

SNRI – selektivni inhibitor ponovnega privzema noradrenalina

SSRI – selektivni inhibitor ponovnega privzema serotonina

TCA – triciklični antidepresiv

TEA – tetraetilamonij

VMAT-2 – vezikularni monoaminski transporter

V_{max} – maksimalna hitrost privzemanja

1. UVOD

Možgani so najbolj dovršen organ živih bitij. Vodijo in nadzorujejo vse naše početje. Od preprostega gibanja do vrhunskih športnih dosežkov, od učenja poštevanka do ljubezenskih razočaranj (1).

Višje živčne funkcije so splošno ime za tiste zmožnosti, ki so najbolj značilne za človeka (jezik, mišljenje, reševanje problemov, verovanje, etičnost). Nastajajo v kompleksni mreži možganske skorje in ostalih delov živčevja.

Možgani so osrčje naših misli, imajo nadzor nad delovanjem celotnega živčnega sistema in so kot nekakšen »prevajalec« zunanjega okolja. Vzdržujejo zavest, nadzirajo in usklajujejo večino gibanja, vedenja in homeostatskih telesnih funkcij kot so srčni ritem, krvni tlak, ravnovesje telesnih tekočin in telesna temperatura. Odgovorni so za kognitivne in emocionalne procese, pomnjenje, abstraktno mišljenje, razumske reakcije, motorično učenje in druge vrste učenja (2).

1. 1. MOŽGANI

Možgani odraslega človeka tehtajo med 1300 in 1500 g in zasedajo 80% volumna lobanje. Razdeljeni so na 3 dele:

- Veliki možgani (cerebrum)
- Mali možgani (cerebellum)
- Možgansko deblo

1. 1. 1. VELIKI MOŽGANI - CEREBRUM

Velike možgane sestavljata dve polobli (hemisferi), ki sta med seboj povezani z živčnim nitjem. Po kosteh lobanje, ki varujejo možgane, ločimo na vsaki polobli ali hemisferi temenski, zatilni, čelni in senčni reženj. Na površini hemisfer je možganska skorja ali *cortex cerebri*, ki je nagubana v številne vijuge in ima zato veliko površino. V možganski skorji je večina živčnih celic, ki tvorijo možgansko sivino ali *substantia grisea*. Zbrane so tudi v notranjosti možganov, v možganskih jedrih. Preostalo maso hemisfer pa zavzema bela substanca ali *substantia alba*.

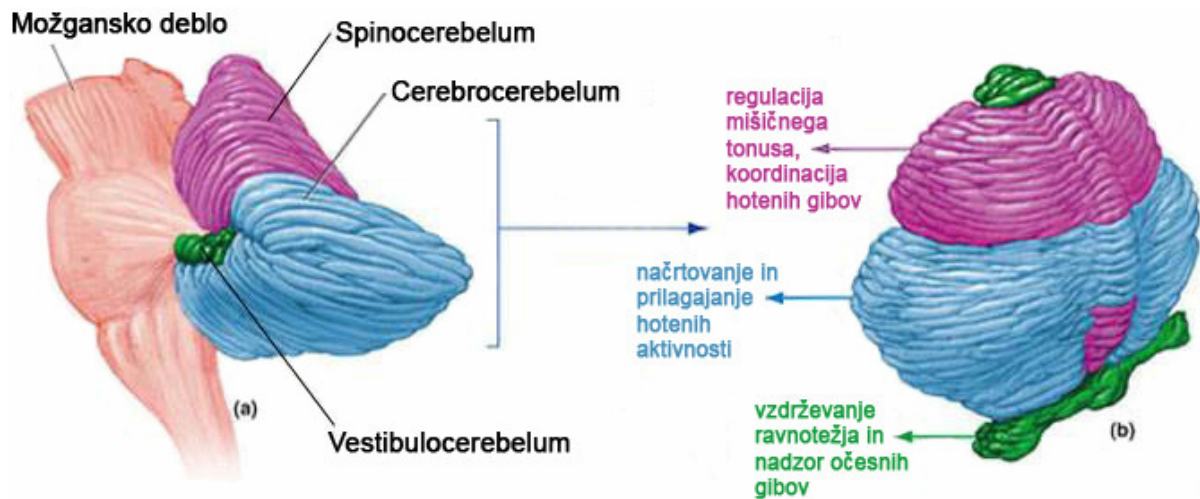
Falx cerebri razdeli možgane v dve cerebralni hemisferi. *Tentorium cerebelli* ločuje male možgane in možgansko debljo od velikih možganov. Celotne možgane prekriva vrsta open, ki jih imenujemo možganske ovojnice, v notranjosti pa se nahajajo 4 prostori, imenovani prekati, in sicer dva lateralna prekata, tretji in četrti prekat.

Nevroni v možganih nenehno sintetizirajo proteine, za kar potrebujejo dovolj energije, zato imajo možgani bogatejši dotok krvi kot katerikoli drug organ v telesu. V njih je na milijone drobnih krvnih žilic, ki celice oskrbujejo s hrano in kisikom. Čeprav možgani predstavljajo le 3 % celotne telesne teže, porabijo kar 25 % kisika (3).

1. 1. 2. MALI MOŽGANI – CEREBELUM

Mali možgani so del centralnega živčevja. Ležijo dorzalno od ponsa in podaljšane hrbtenjače v zadnji lobanjski kotanji. Od okcipitalnega režnja velikih možganov so ločeni s tentorijem. Med možganskim deblom in malimi možgani se nahaja 4. možganski prekat.

Mali možgani so zgrajeni iz medialnega dela, ki se imenuje *vermis* in dveh polobel ali hemisfer, ki ju loči *falx cerebelli*. V vsaki polovici se na zunanji strani nahaja cerebelarna skorja. Tu se nahajajo telesa živčnih celic in njihovi dendriti, ki tvorijo sivino. Pod skorjo je belina, sestavljena iz mieliziranih aksonov, ki loči skorjo od jeder v notranjosti tkiva, v katerem se nahaja izredno veliko število živčnih celic. (4, 5).



Slika 1: Prva slika (Slika a) prikazuje lego malih možganov. Na drugi sliki (Slika b) je predstavljena trodelna zgradba malih možganov in funkcije, ki jih opravlja posamezen del (Povzeto po: <http://www.colorado.edu/intphys/Class/IPHY3730/image/cerebellum.jpg>, dostop: 29.5.2010).

Mali možgani imajo tipično trodelno zgradbo glede na filogenetsko starost, pritok in odtok informacij (Slika 1). Vsak del je povezan s specifično strukturo možganov in opravlja specifično funkcijo:

- *Arhicerebellum-vestibulocerebellum*: povezan je z vestibularnim sistemom. Odgovoren je za vzdrževanje ravnotežja in nadzor očesnih gibov.
- *Paleocerebellum-spinocerebellum*: obsega anteriorni predel hemisfer ter anteriorni in posteriorni vermis. Povezan je s hrbtenjačo in z vplivom na mišični tonus nadzoruje motoriko.
- *Neocerebellum- cerebrocerebellum*. Obsega preostali del malih možganov in je najobsežnejši. Pomemben je za usklajevanje gibanja (7).

Sivino poleg tiste v možganski skorji najdemo tudi v jedrih v notranjosti malih možganov. Ločimo štiri jedra, ki si sledijo od sredine proti zunanosti v naslednjem redu: *nucleus fastigii*, *nucleus globosus*, *nucleus emboliformis* in *nucleus dentatus* (5).

Dotok podatkov v skorjo malih možganov

Bogat dotok informacij dobijo mali možgani iz proprioceptorjev, ki jih obveščajo o izvajanju gibov. Prav tako pa dobijo podatke o motoričnih poveljih, ki potujejo do alfa in gama motoričnih nevronov. Dotok podatkov v skorjo malih možganov poteka po mahastih in plezalnih vlaknih.

1. Plezalna vlakna (*angl. climbing fibers*) izvirajo v spodnjih olivah in tvorijo številne sinapse z Purkynjevimi celicami.
2. Mahasta vlakna (*angl. mossy fibers*) izvirajo na več mestih v možganskem deblu (pontina jedra, hrbtenjača, vestibularna jedra in retikularna formacija), tvorijo sinapse s granularnimi vlakni (5).

Skorjo malih možganov pa oživčujejo tudi številna aminergična vlakna, med drugim tudi histaminergična vlakna (34).

Odtok podatkov iz skorje malih možganov

Nevroni jeder malih možganov predstavljajo glavne eferentne poti iz malih možganov. Odtok podatkov poteka izključno po Purkynjevih celicah, ki so inhibicijski nevroni (nevrotransmitter GABA). Purkynjeve celice tvorijo sinapse z nevroni globokih cerebelarnih jeder in vestibularnega jedra in modulirajo njihovo aktivnost (5).

Funkcije:

Mali možgani imajo mnogo funkcij. Poglavitna naloga malih možganov je njihovo vključevanje v modulacijo izvrševanja motorike. Zagotavljajo primerno delovanje mišic, vplivajo na mišični tonus in skrbijo za ravnotežje. Mali možgani ne sprožijo gibanja, ampak prispevajo k usklajevanju, natančnosti in točnosti giba. So ključni tudi za motorično učenje in prilagajanje. Skoraj vsi hoteni gibi se zanašajo na fini nadzor motoričnega vezja, pri čemer so mali možgani pomembni za njihovo optimalno prilagoditev, kot je na primer časovna usklajenost gibov (5, 8).

Prav tako pa so mali možgani vključeni v nekatere kognitivne funkcije, kot so pomnjenje, učenje in najbrž v nekatere čustvene funkcije. Pomembno vlogo pa imajo tudi pri nesomatskih aktivnostih (9). Direktna povezava med cerebelumom in hipotalamusom naj bi pojasnjevale dejstvo, da je cerebelum vpleten v regulacijo hranjenja, kardiovaskularno regulacijo, respiratorno, imunsko in čustveno regulacijo (9).

V vlaknih, ki povezujejo cerebelum in hipotalamus, so med drugimi prepoznali tudi histaminergična vlakna ter receptorje H₁. Domnevajo, da histamin sodeluje pri prenosu signalov iz hipotalamusa do cerebeluma in je tudi tako vključen v nadzor avtonomnih in čustvenih funkcij (10).

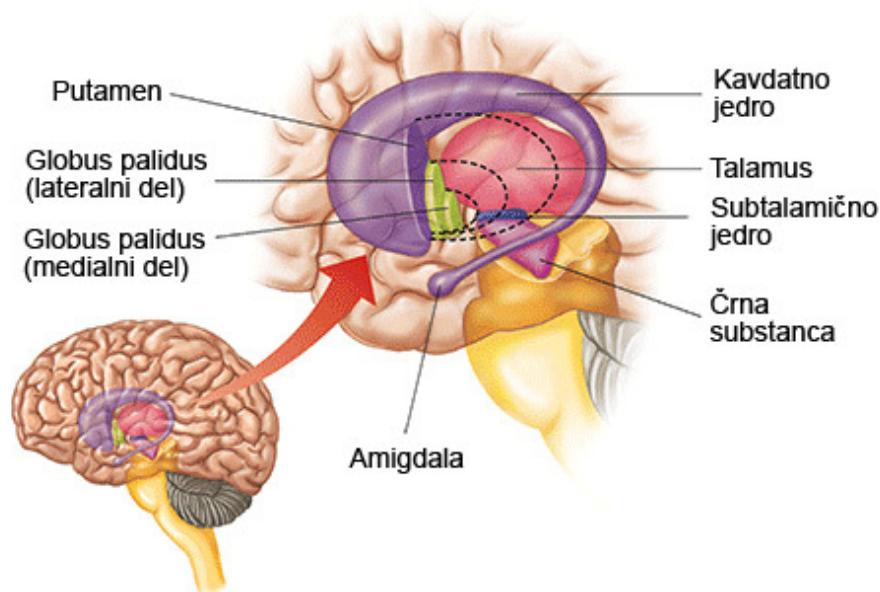
Posledica okvare malih možganov:

Poškodbe na malih možganih ne povzročajo paralize, ampak privedejo do motenj gibanja, ravnotežja, drže. Posledice okvar malih možganov so naslednje:

- izguba koordinacije aktivacije posameznih mišičnih skupin ter posledično negotov začetek giba, asinergija, netočen zaključek obsega gibov (dismetrija), nezmožnost izvedbe hitrih izmeničnih gibov (disdiadohokineza).
- intencijski tremor
- motnje v ravnotežju
- hipotonija
- nejasen govor
- nistagmus (11)

1. 1. 3. STRIATUM

Bazalni gangliji anatomsko vključujejo kavdatno jedro, putamen in *globus pallidus*. Predstavljajo bistveni del ekstrapiramidnega sistema. Kavdatno jedro in putamen tvorita funkcionalno celoto, ki se imenuje striatum. Striatum je torej ena od struktur bazalnih ganglijev v možganih. Kavdatno jedro je jedro v velikih možganih, ki v obliki podkve obkroža talamus. Putamen predstavlja zunanji del lentiformnega nukleusa, ki ga sestavljajo nevroni podobni tistim iz kavdatnega jedra (5).



Slika 2: Striatum. Sestavljen je iz kavdatnega jedra in putamenta (povzeto po <http://brainmind.com/images/basalgangliadetail.gif>, dostop: 29.5.2010)

Povezave:

Striatum je glavno mesto vstopa aferentnih povezav bazalnih ganglijev. Preko t.i. kortikostriatne poti prejema informacije iz možganske skorje, predvsem iz senzomotorične skorje, anteriornega dela premotorične možganske skorje. Te povezave so ekscitatorne. Striatum pa je povezan tudi s talamusom, amigdalo, črno substanco, hipotalamusom in jedri rafe (5).

Striatum oddaja eferentne povezave v notranji del globusa palidusa in retikularno substanco nigro. Globus palidus predstavlja glavno mesto izstopa eferentnih povezav. Z izhodnima jedroma (substanco nigra retikulata/globus palidus internus) je povezan preko neposredne in posredne poti (13).

Značilne povezave lahko združimo v neposredno zanko, katere potek je: cerebralni korteks - striatum - interni segment globusa palidusa - talamus - cerebralni korteks. Gre za monosinaptično pot, ki na notranji del globusa palidusa in retikularno črno substanco deluje zaviralno. Posredna zanka pa poteka od cerebelarnega korteksa - zunanjšega segmenta gl. palidusa - subtalamičnega jedra - notranjšega segmenta gl. palidusa - talamusa - nazaj do cerebralnega korteksa. Slednja povezava je polisinaptična pot preko sinaps v zunanjem delu globusa palidusa in v subtalamičnem jedru (13).

Naloge:

Motorična vloga bazalnih ganglijev je manj raziskana. Iz značilnih povezav lahko sklepamo, da bazalni gangliji modulirajo motoriko prek vpliva na skorjo velikih možganov in tako posredno na kortikospinalni in kortikobulbarni trakt. Razen na dorzolateralni motorični sistem imajo vpliv tudi na ventromedialnega, torej na držo telesa. Ker pa vzpostavljajo bogate povezave s prefrontalnimi področji korteksa, sklepamo, da so bolj kot v modulacijo izvrševanja motorike (za razliko od malih možganov) vključeni v višje kognitivne funkcije motorične kontrole (planiranje, izbira strategij zapletenih gibov glede na informacije iz okolja) (14).

Pri okvarah bazalnih ganglijev nastopijo značilne motorične motnje v obliki nenormalnih, nehotenih gibov (diskinezij), sprememb mišičnega tonusa in počasne iniciacije gibov. V primeru okvare GABA - egičnih in holinergičnih nevronov v striatumu pride do motenj inhibicije. Posledica je pojav hitrih, bizarnih, nenadzorovanih gibov (Huntingtonova bolezen).

Študije kažejo, da je v etiopatogenezo Parkinsonove bolezni vpletenih več neurotransmiterskih sistemov, med drugim tudi histaminergični sistem. Rinne in sodelavci so poročali o povečani koncentraciji histamina v možganih osebkov, obolelih za Parkinsonovo boleznijo (15). Pomembno povečanje koncentracije histamina so našli v regijah, ki so odgovorne za nadzor motorike in v katerih pride do sprememb v stanju bolezni. Mednje spada tudi striatum. Povečanje koncentracije histamina so ugotovili tudi v možganih podgan, ki so jim predhodno izzvali parkinsonizem (16).

1. 2. CELICE

Možgansko tkivo sestavljajo nevroni, ki jih obdaja nevroglia (17). Možgani odraslih osebkov vsebujejo 10^{11} nevronov in 10^{12} celic glije (18), kar pomeni, da so celice glije 10-50 krat številčnejše od nevronov (19). Astrociti veljajo za najštevilčnejše celice v osrednjem živčevju.

1. 2. 1. CELICE GLIJE

Ime teh celic izvira iz grške besede lepilo in zmotnega prepričanja ob njihovem odkritju, da je njihova funkcija zgolj podpora in 'lepilo' za nevrone. Ob odkritju jih je nemški patolog Rudolf Virchow opisal kot električno pasivno in nevzdražno vezivno tkivo. Danes vemo, da je

njihova vloga kompleksna in nikakor ne pasivna (18).

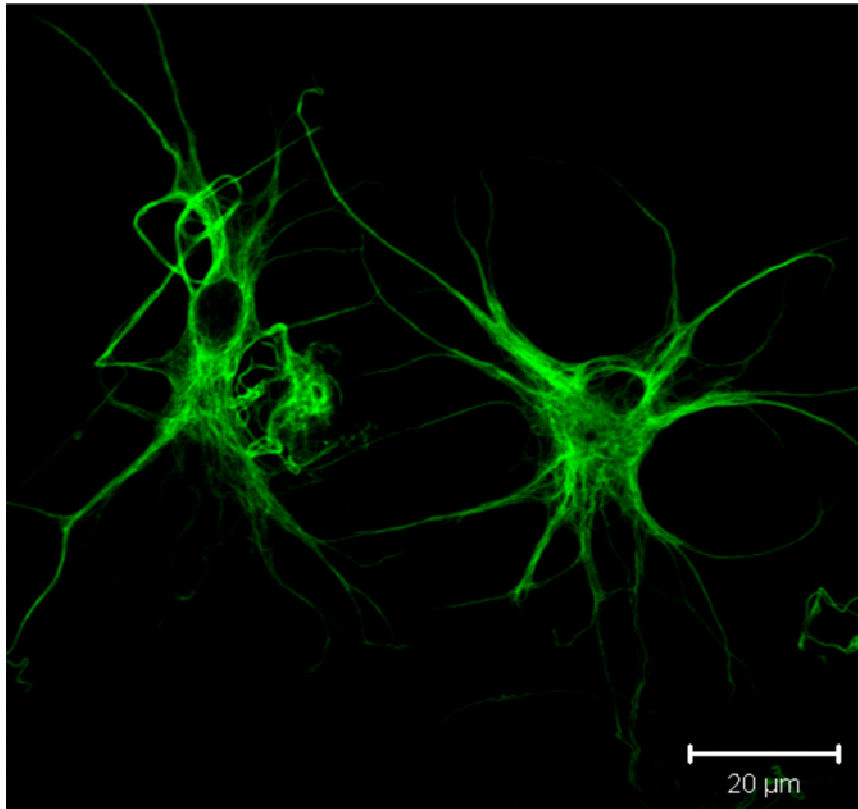
Nevroglijo delimo na makroglijo in mikroglijo.

Med makroglijo štejejo tri glavne skupine celic: oligodendrocite, Schwannove celice in astrocite. Oligodendrociti in Schwannove celice obdajajo aksone živčnih celic in tvorijo mielinske ovojnice. Razlika je v tem, da se oligodendrociti nahajajo v osrednjem živčevju, Schwannove celice pa v perifernem živčnem sistemu (19).

Mikroglija so specializirani makrofagi, ki so sposobni gibanja in fagocitoze ter na ta način ščitijo živčne celice osrednjega živčevja. Izvirajo iz makrofagov izven CŽS in so fiziološko ter embriološko nesorodni drugim celicam osrednjega živčevja (19). V aktivno fazo preidejo ob poškodbi, okužbi ali bolezni (multipla skleroza, nevrodegenerativne bolezni: Parkinsonova bolezen, Alzheimerjeva bolezen).

1. 2. 1. 1. ASTROCITI

So najbolj razprostranjena in hkrati najštevilčnejša vrsta celic glije v osrednjem živčevju, saj predstavljajo približno polovico celic v možganih. Imajo značilno zvezdasto obliko (ali podolgovato), ki jo lahko v skladu s spremembami v neposrednem okolju spreminjajo. Vsebujejo številne filamente, med katerimi je najpomembnejša glialna fibrilarna kislina beljakovina – GFAP (angl. *glial fibrillary acid protein*). GFAP je del citoskeletnega sistema in služi kot nenadomestljiv označevalec teh celic v razmerah *in vivo* in *in vitro* (17, 18).



Slika 3 : Astrocit vzgojen iz korteksa neonatalnih podgan v primarni kulturi in barvan z GFAP (1:1000). Slika je bila posneta na Referenčnem Carl-Zeiss centru za konfokalno mikroskopijo v Laboratoriju za nevroendokrinologijo in celično fiziologijo, PAFI

Pri odraslih osebkih so opredelili več tipov astrocitov, ki se razlikujejo glede na njihovo lokacijo ter vsebnost filamentov. Ločimo protoplazmatske v sivi substanci, vlaknaste v možganski belini in specializirane astroците: Bergmanova glija v malih možganih, Müllerjeve celice v mrežnici in pituicite v hipofizi (18).

Vloga astrocitov:

Astroцитi zaradi vsebnosti filamentov nudijo oporo nevronom. Vendar pa to ni njihova edina funkcija. Astroцитi imajo v različnih življenjskih obdobjih različne vloge.

Razvojno obdobje:

Radialna glija – gre za najzgodnejše diferencirane celice glije, se prvič pojavi v 6. tednu gestacije. Do 20. tedna gestacije se celice podaljšujejo in s svojimi vlakni vodijo in usmerjajo rastoče nevrone.

Astroцитi so glavni vir molekul zunajceličnega matriksa in adhezijskih molekul (NCAM - , angl. *neural cell adhesion molecule*, laminin, fibronektin taktin). Ti proteini pomagajo pri nastanku živčnih jeder, živčnih poti in stikov med posameznimi nevroni.

Radialna glija izloča tudi številne nevrotrofične dejavnike: živčni rastni dejavnik - NGF (angl. *nerve growth factor*), nevrotrofični dejavnik možganskega izvora – BDNF (angl. *brain-derived neurotrophic factor*), ciliarni nevrotrofični dejavnik – CNTF (angl. *ciliary neurotrophic factor*) in nevrotrofični dejavnik glialnega izvora - GDNF (angl. *glial-derived neurotrophic factor*), ki posamično ali v različnih kombinacijah uravnavajo morfolologijo, rast, diferenciacijo pa tudi preživetje določenih nevronov. Nevrotrofični dejavniki pa ne vplivajo le na razvijajoče nevrone, temveč tudi na same celice glije.

Odraslo obdobje:

Nevroni za svoje delovanje potrebujejo primerno okolje, pri ohranjanju le - tega pa imajo pomembno vlogo tudi astroцитi.

Tako se preko presledkovnih stikov, prenašalnega proteina za kalijeve in kloridne ione ter kanalov za kalijeve in kloridne ione v astroците privzame prebitek zunajceličnega kalija, ki nastane ob nevrottransmisiji. S privzemom prebitka zunajceličnega kalija astroцитi ščitijo živčne celice pred ekscitacijsko poškodbo. Pretirana vzdražnost živčnih celic je lahko namreč vzrok za propadanje le – teh pri nekaterih nevrodegenerativnih boleznih osrednjega živčevja (Huntingtonova bolezen, Alzheimerjeva bolezen).

Astroцитi intenzivno sodelujejo tudi pri inaktivaciji različnih nevrottransmitterjev. Na njih so namreč dokazali prisotnost transportnih proteinov za številne nevrottransmitterje, med drugim tudi za biogene amine. Obstajajo podatki, da privzemajo tudi histamin, čeprav transporterja zanj še niso identificirali.

Poleg tega so na astroцитih dokazali tudi prisotnost številnih receptorjev za nevrottransmitterje. Aktivacija glutamatnih receptorjev na astroцитih npr. ima za posledico sprostitvev glutamata iz

celic glije. Sproščeni glutamat modulira sproščanje neurotransmiterja na presinaptičnem živčnem končiču ali pa aktivira receptorje za glutamat na postsinaptičnem nevronu. To pomeni, da astrociti niso le pasivni podporni element, ampak enakopravni del tridelne sinapse. Glikogen predstavlja edino energetska rezervo v osrednjem živčevju. Perivaskularni astrociti privzemajo glukozo neposredno iz možganskih žil, iz nje pa nastaja glikogen. Največ ga je nakopičenega v astrocitih (18).

Astrociti skupaj z endotelnimi celicami kapilar in periciti gradijo in vzdržujejo krvno možgansko pregrado. Indukcija tesnih medceličnih stikov med endotelijskimi celicami je domena astrocitov. Tesni stiki nefenestriranih kapilar preprečujejo prosto prehajanje snovi iz krvi v možgansko medceličnino, tako lahko to pregrado pasivno prehajajo le močno lipidotopne, nepolarne snovi nizkih molekularskih mas, saj morajo prepotovati skozi endotelne celice kapilar. Drug način prestopa te pregrade pa je s specifičnimi prenašalci, ki pa prehod določenim snovem celo zmanjšujejo z aktivnim izplavljanjem snovi nazaj v krvni obtok (20).

Patološki procesi:

Za neonatalno življenjsko obdobje je značilna velika sposobnost regeneracije osrednjega živčevja, ta pa z nadaljnjim razvojem usahne.

Ob možganski poškodbi, ki jo prizadenejo različni dejavniki, kot so virusne okužbe, mehanske poškodbe, degenerativni procesi in nekateri nevrotoksini, se mirujoči astrociti spremenijo v reaktivne celice, ki posredujejo pri procesu regeneracije oz. brazgotinjenja. Reaktivni astrociti so bistveno večji kot mirujoči, vsebujejo več glikogena, citoskeletnih proteinov, poveča pa se tudi izražanje in sproščanje molekul, ki so normalno prisotne le v manjših količinah. To so: različni rastni dejavniki, citokini, encimi, citoskeletni proteini, molekule zunajceličnega matriksa.

Reaktivna glijoza, ki je kompleksen proces in vključuje tako aktivirano mikroglijo kot aktivirane astrocite, ima za posledico regeneracijo in/ali odmrtnje poškodovanih nevronov. Sposobnost sinteze različnih molekul, ki pospešujejo regeneracijo nevronov, se je izkazala za nedvomno koristna. Astrociti pa izločajo tudi inhibitorne substance, npr. heparan sulfat, hondroitin sulfat, keratin in druge proteoglikane, ki onemogočajo regeneracijo.

V patoloških razmerah astrociti lahko tudi nabrekajo. Do tega privedejo večje koncentracije glutamata, aktivacija adenozijskih receptorjev, prebitek kalijev ionov in povečana

koncentracija amoniaka v krvi. Posledica nabrekanja je zmanjšana svetlina kapilar in s tem zmanjšana prekrvljenost. Poveča se tudi vzdražnost živčnih celic zaradi prebitka kalijevih ionov v zunajcelični tekočini, katere volumen se je zmanjšal (18).

Druga skupina celic so nevroni. Skupine nevronov, ki izločajo acetilholin in biogene amine, se lahko imenujejo ali po neurotransmiterju, ki ga izločajo, ali pa po mestu nahajanja v osrednjem živčevju. Vsak sistem omenjenih nevronov ima jedra, iz katerih izhajajo aksoni (projekcije) v točno določene predele možganov. Tako ločimo serotoninski, dopaminski, holinergični, adrenergični in tudi histaminergični sistem. Vsak sistem torej povezujemo z določenim neurotransmiterjem in s specifičnimi funkcijami. Histamin spada med biogene amine. Sam histamin kot tudi histaminergični sistem bosta predstavljena v nadaljevanju.

1. 3. NEVROTRANSMITERJI

Nevrotransmiterji - prenašalci v živčnem sistemu so snovi, ki jih izločajo živčne celice in s tem druga na drugo prenašajo informacije. Prenos informacij iz enega konca živčnega končiča na začetek drugega je omogočen ob dovolj veliki koncentraciji neurotransmiterja v sinaptični špranji, in sicer z vezavo le - tega na ustrezni membranski receptor. Posledica vezave je nastanek akcijskega potenciala na sosednji celici.

Ločimo dva glavna razreda neurotransmiterjev, in sicer glede na velikost molekule:

- nizkomolekularni neurotransmiterji. V tej skupini jih najdemo 9: acetilholin, biogeni amini (dopamin, noradrenalin, serotonin, histamin) in aminokislinski neurotransmiterji (glutamat, GABA, glicin)
- visokomolekularni neurotransmiterji. Gre za nevroativne peptide (enkefalin, dinorfin, itd.).

Da je neka substanca sprejeta kot neurotransmiter, je potrebno, da zadosti določenim pogojem. In sicer:

- Sinteza mora poteči v nevronu iz predhodnih molekul, ki prehajajo krvno možgansko pregrado. Encimi za sintezo se nahajajo v presinaptičnem nevronu. Torej neurotransmiter ne sme prehajati skozi krvno-možgansko pregrado.
- Po sintezi se shranjuje v sinaptičnih veziklih.

- Po stimulaciji presinaptičnega nevrona se mora z eksocitozo sprostiti v sinaptično špranjo.
- Sproščeni neurotransmitter mora delovati na postsinaptični nevron.
- Obstajati morajo specifični mehanizmi za odstranjevanje neurotransmitterja iz sinaptične špranje (19).

1. 3. 1. Sinteza

V splošnem poteka sinteza neurotransmiterjev s specifičnimi encimi, ki se nahajajo v telesu živčnih celic. Prekursorji morajo imeti sposobnost prehoda preko krvno-možganske bariere. Ti so lahko aminokislina (v primeru monoaminskih prenašalcev) ali pa intermediati razgradnje glukoze.

Sinteza nizkomolekularnih neurotransmiterjev se razlikuje od visokomolekularnih. Sinteza nizkomolekularnih poteka v citoplazmi. Citoplazmatski encimi se sicer nahajajo v celotnem nevronu, pa vendar sinteza večinoma poteka v sinaptičnih končičih.

Visokomolekularni neurotransmiterji se sintetizirajo v telesu nevrona iz sekretornih proteinov. Kasneje se prenesejo v Golgijev aparat, kjer potečejo posttranslacijske modifikacije (19).

1. 3. 2. Skladiščenje

Sintetizirani neurotransmiterji se s pomočjo vezikularnih prenašalcev prenesejo v sekretorne vezikle. S tem se zavarujejo pred razgradnjo z encimi. Hkrati pa so zaradi velikega števila teh veziklov v sinaptičnih končičih tako na voljo za sproščanje v relativno visokih koncentracijah. Visokomolekularni neurotransmiterji se prenesejo v vezikle visoke gostote (19).

1. 3. 3. Sproščanje neurotransmiterjev

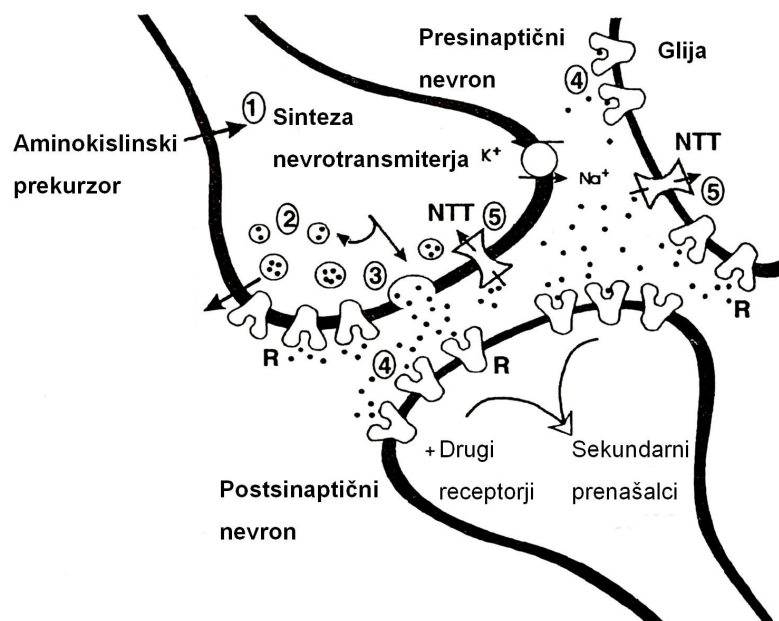
Živčne celice so vzdražne celice in ob dotoku informacij pride do spremembe membranskega potenciala. Če sprememba membranskega potenciala preseže določen prag, se sproži akcijski potencial. Akcijski potencial je hitro napredujoča depolarizacija vzdolž aksonske membrane. Povzroči odprtje od napetosti odvisnih Ca^{2+} kanalčkov na sinaptičnih končičih, kar poveča znotrajcelično koncentracijo Ca^{2+} . Povečana koncentracija Ca^{2+} omogoča zlitje sinaptičnih

veziklov s presinaptično membrano in tako pride do sproščanja neurotransmiterjev v sinaptično špranjo (19).

1. 3. 4. Mehanizem delovanja neurotransmiterjev

Sproščeni neurotransmiterji v sinaptični špranji oddifundirajo do postsinaptične membrane, kjer se vežejo na ustrezne membranske receptorje. Obstajata dva tipa receptorjev, in sicer ionotropni in metabotropni receptorji. Vezava neurotransmiterja na ionotropni receptor lahko povzroči konformacijsko spremembo, kar privede do odprtja ionskega kanalčka in vdora ionov v celico (v odvisnosti od narave ionov pride do nastanka ekscitacijskih ali inhibicijskih postsinaptičnih potencialov). Ob vezavi neurotransmiterja na metabotropni receptor, pa prenos informacij poteka preko sekundarnih prenašalcev na notranji strani celične membrane. Ob vezavi živčnega prenašalca se podenota kanalčka na notranji strani membrane odcepi in aktivira sekundarnega sporočevalca-encim, ki katalizira reakcijo, katere produkti odprejo ionske kanalčke in posledica je enaka kot pri prejšnjem primeru (19).

Shematski prikaz dogodkov v sinapsi prikazuje slika 4.



Slika 4: Shematski prikaz dogajanj v sinapsi. (1,2) Neurotransmiter se sintetizira in nato uskladišči v presinaptične vezikle s pomočjo vezikularnih transporterjev. (3) Sprostitev neurotransmiterja v sinaptično špranjo. (4) Interakcija neurotransmiterja s presinaptičnimi, postsinaptičnimi receptorji in receptorji celic glije. (5) Sproščeni neurotransmiter se prenese nazaj v presinaptični nevron in okoliško glijo s pomočjo membransko vezanih proteinov. NTT - transporter za neurotransmiter; R - receptor. (povzeto po Papler in Pečavar, 2006: str4)

1. 3. 5. Inaktivacija neurotransmiterjev

Ko neurotransmitter opravi svojo nalogo prenosa vzburjenja na postsinaptično celico, se mora čim prej inaktivirati, da ne bi prišlo do prekomernega vzburjenja. Celica namreč ne more vzdrževati svojih funkcij, če je njeno notranje okolje ves čas moteno. Če bi neurotransmitter ostal v sinaptični špranji, bi to vodilo v nenehno stimulacijo postsinaptičnega nevrona in prekomernega proženja akcijskega potenciala. Prekomerna vzdražnost živčne celice vodi v njeno poškodbo ali celo do celične smrti (19). Inaktivacija poteka na več načinov:

1. Difuzija

Neurotransmitter oddifundira v medcelični medij. Zaradi njegove zmanjšane koncentracije na mestu, kjer lahko stimulira receptorje, ne pride do stimulacije prisotnih receptorjev.

2. Encimska razgradnja

Specifični encimi, prisotni v sinaptični špranji, na celičnih membranah in znotraj celice razgradijo neurotransmitter in posledično se ne morejo več vezati na receptorje.

Primer:

MAO – monoaminooksidaza

KOMT – katehol-o-metil transferaza

Inaktivirata monoaminske neurotransmiterje. Nahajata se v znotrajceličnem prostoru.

3. Ponovni privzem

Sproščeni neurotransmiterji se s pomočjo transporterjev na presinaptičnem nevronu prenesejo nazaj v nevron. Gre za visokoafinitetni transport. Sledita dve možnosti: ali se ponovno prenese v sekretorni vezikel ali pa ga razgradijo encimi.

4. Inaktivacija neurotransmiterjev s pomočjo celic glije.

Pomemben način inaktivacije neurotransmiterjev poteka s celicami glije. Te na svoji membrani izražajo številne prenašalne proteine, ki prenesejo neurotransmitter čeznjo. Po privzemu neurotransmiterja se ti v notranjosti z encimi razgradijo ali pa se ponovno sprostijo (19).

1. 3. 6. Prenos neurotransmiterjev

Koncentracija neurotransmiterjev v sinaptični špranji mora biti močno nadzorovana, kar je pomembno za intenzivnost in trajanje akcijskih potencialov in s tem stimulacijo

postsinaptičnega nevrona. Zato je pomembno, da se sproščeni neurotransmiterji v sinaptični špranji hitro odstranijo (19).

Prenos neurotransmiterjev lahko poteka preko visokoafinitetnih in nizkoafinitetnih prenašalcev. Nizkoafinitetni prenašalci omogočajo prenos neurotransmiterjev običajno v primeru, ko so visokoafinitetni prenašalci nasičeni.

Monoaminski neurotransmiterji zaradi svojega pozitivnega naboja pri fiziološkem pH kot taki ne morejo prehajati membrane. Njihovo prehajanje omogočajo transmembranski prenašalci (transporterji) na membrani nevronov in celic glije.

Ko govorimo o transporterjih imamo v mislih membranske proteine, katerih glavna funkcija je olajšati pretok molekul v in iz celic (22). Večina membranskih transporterjev je oligospecifičnih, specializiranih za prenos specifičnih metabolitov ali hranilnih snovi. Polispecifični transporterji pa so sposobni prenosa snovi različnih velikosti in struktur. Transporterje lahko delimo na več načinov. Med pogostejšimi je na *aktivne* npr. ABC transporterje (angl. *ATP binding cassettes* - ATP vezavne kasete), ki za prenos molekul potrebujejo energijo v obliki ATP molekul in *pasivne transporterje* npr. plazemski SLC transporterji (angl. *solute carrier* – nosilci topnih molekul). Le-ti za svoje delovanje ne porabljajo ATP, ampak elektrokemijski potencial, ki izvira iz pretoka Na^+ v smeri koncentracijskega gradienta.

V družino SLC22A superdružine SLC transporterjev so vključene tri izooblike polispecifičnih transporterjev organskih kationov OCT 1-3 oz. SLC22A 1-3. Le ti so transmembranski proteini z 12 domenami, struktura pa vključuje intracelularni C in N- konec, ekstracelularno glikozilirano zanko in intracelularno fosforilirano zanko (23).

Skupne značilnosti SLC22A transporterjev:

- Gre za polispecifične transporterje, ki omogočajo prenos organskih kationskih molekul z zelo različno molekulsko strukturo preko membrane.
- Substance z relativno molekulsko maso pod 500 in premerom manjšim kot 4 Å, so potencialni substrati za OCT.
- So nizkoafinitetni transporterji, z visoko kapaciteto prenosa.

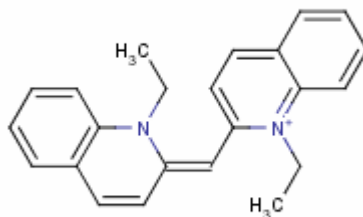
- Prenos ni odvisen od Na^+ in Cl^- ionov.
- Prenos snovi s pomočjo OCT je dvosmeren in poteka z olajšano difuzijo. Za prenos sta potrebna koncentracijski gradient prenešene substance in membranski potencial, ki tudi določata smer prenosa (24, 23).

Izražanje OCT transporterjev je zelo raznoliko, odvisno od podtipa. Nahajajo se tako v perifernih tkivih, kot tudi v CŽS (23). OCT 1 in OCT 2 se primarno nahajata v ledvicah in jetrih (17). V osrednjem živčevju najdemo predvsem OCT 2 in OCT 3, s tem da najširšo razporeditev v osrednjem živčevju kaže prav OCT 3 (25). V podganjem osrednjem živčevju ga največ najdemo v cirkumventrikularnih organih (26), Amphoux pa je s sodelavci dokazal, da se mRNA za OCT 3 nahaja tudi v regijah, kamor projecirajo aminergična vlakna (25). Sprva so poročali o prisotnosti OCT-jev le na nevronih, nekateri avtorji pa so dokazali prisotnost OCT 2 in OCT 3 tudi na podganjih astrocitih (27).

OCT prenašajo organske katione in šibke baze, ki so pozitivno nabite pri fiziološkem pH – ju. Prenašajo endogene substance, kot tudi zdravila in toksične ksenobiotike ter njihove metabolite.

Biogeni amini so substrat za vse tri podtype OCT-jev. Poročali pa so, da je afiniteta za prenos histamina preko podganjih OCT 2 in OCT 3 večja v primerjavi z drugimi biogenimi amini (25). Ker transporterja za histamin še ne poznamo, mRNA za OCT 3 pa najdemo tudi v regijah, ki jih oživčujejo histaminergična vlakna (možganska skorja in striatum), je predvsem OCT3 eden izmed možnih kandidatov pri prenosu histamina.

Snovi, ki niso substrat za OCT transporterje, delujejo lahko kot njihovi inhibitorji in so zelo uporabni pri raziskovanju prenosa preko njih. Znan specifični inhibitor polispecifičnih OCT je npr. decinij 22 (D22). Gre za spojino s sledečim IUPAC imenom: 1-etil-2-[(E)-(1-etilkinolin-2(1H)-iliden)metil] kinolin.



Slika 5: Struktura decinija 22

<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/RenderImage?maxscale=30&width=200&height=200&superlistid=0020766498>, dostop: 29.5.2010)

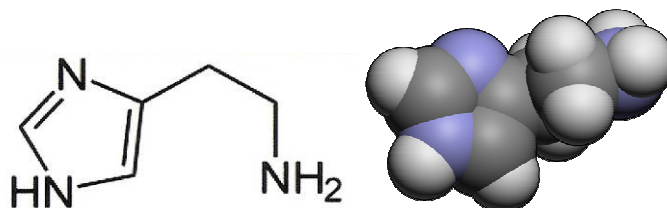
Čeprav je potencialen inhibitor vseh treh podtipov, pa ima 10-krat večjo afiniteto do podtipa OCT 3 (28). Ker D22 ne omogoča razlikovanja med podtipi OCT, je za to potrebna uporaba dodatnih inhibitorjev. Uporaba inhibitorja kortikosterona omogoča razlikovanje med privzemom organskih kationov preko OCT1 in OCT2 oz. OCT3. Estradiol pa je uporaben za razlikovanje privzema preko OCT2 in OCT3 (23).

1. 4. HISTAMIN

Histamin je biogeni amin, ki sta ga odkrila Dale in Laidlaw leta 1910 (30). Vključen je v številne fiziološke in patološke procese tako izven kot v osrednjem živčnem sistemu. Prisoten je praktično v vseh človeških tkivih, v največjih koncentracijah se nahaja v koži, pljučih in gastrointestinalnem traktu (20). Izven osrednjega živčevja se sintetizira in skladišči v citoplazemskih granulah mastocitov, bazofilcev in enterokromatofinih celic. Sprva so ga obravnavali le kot hormon in kot tak naj bi imel naslednje lokalne učinke: pri vnetjih in imunskih reakcijah deluje kot kemični mediator, nadzira izločanje želodčne kisline, povzroča razširjanje kapilar in vpliva na gladke mišice, kjer povzroča kontrakcijo gladkih mišic v bronhijih, v spodnjem delu tankega črevesja in maternici.

1. 4. 1. KEMIČNA STRUKTURA

Histamin (2-(4-imidazolil)etilamin) je hidrofilna molekula. Sestavljen je iz imidazolnega obroča in amino skupine, med seboj pa ju povezujeta dve metilenski skupini. Zaradi visoke elektronske gostote na dušiku primarnega amina in imidazolnega obroča ima molekula histamina dva bazična centra (31).



Slika 6: Shematski in tridimenzionalni prikaz molekule histamina (Povzeto po: http://en.wikipedia.org/wiki/Histamine#Storage_and_release, dostop: 11.5.2010)

Kot biogeni amin kaže strukturne podobnosti z ostalimi biogenimi amini. Etilaminski del je tisti, ki ga najdemo tako pri dopaminu, noradrenalinu in serotoninu. Imidazolni obroč v strukturi histamina vpliva na njegove kemične lastnosti. Omogoča obstoj histamina v dveh tautomernih oblikah, s čimer je povezana sposobnost aktivacije receptorja.

Pri fiziološkem pH se histamin nahaja v ravnotežni zmesi tautomernih kationov, saj ima pKa vrednosti 9,40 (za alifatski primarni amin) in 5,80 (za imidazol). Monokation predstavlja več kot 96 % zvrsti v zmesi, dikation približno 3 %, zelo majhen delež pa predstavlja neprotonirana oblika histamina. Obe protonirani obliki (monokation in dikation) pogosto označujemo kot biološko aktivni obliki (31). Pozitivni naboj je tudi razlog, da histamin ne more prehajati preko celične membrane, za kar potrebuje ustrezen prenašalec, ki do sedaj še ni znan.

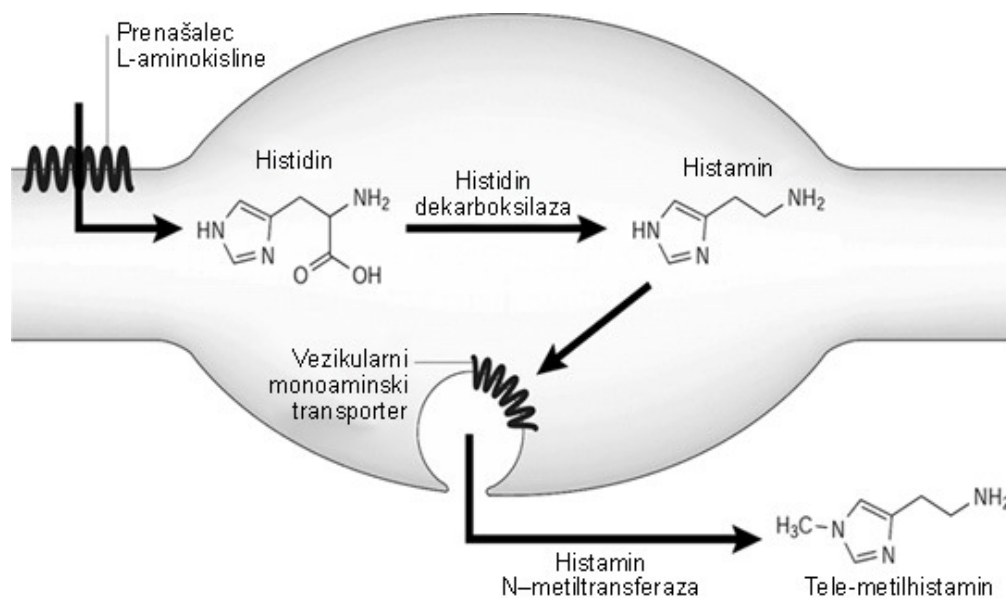
1. 4. 2. HISTAMIN V CENTRALNEM ŽIVČNEM SISTEMU

Histamin je v centralnem živčevju prisoten v manjših količinah kot v nekaterih perifernih tkivih. Nahaja se v histaminergičnih nevronih in tudi v nenevronske celicah, najpomembnejši so mastociti, ki pa so večinoma prisotni le v možganih nižjih živalskih vrst (33).

1. 4. 2. 1. Sinteza

Sinteza histamina se prične s prenosom L-histidina v celico. Iz histidina v reakciji oksidativne dekarboksilacije, ki jo katalizira encim histidin dekarboksilaza (HDC), nastane histamin.

Encim katalizira cepitev močne kovalentne vezi med dvema ogljikoma in sprosti se CO_2 (33, 34).



Slika 7: Tvorba histamina iz aminokislina L-histidin z encimom L-histidin dekarboksilazo in metabolizem histamina (Prirejeno po: Haas et al., 2008)

Sinteza poteka v histaminergičnih nevronih, in sicer v citoplazmi živčnih končičev. Novo sintetiziran histamin se s pomočjo vezikularnega monoaminskega transporterja VMAT-2 prenese v vezikle. Tu ostane shranjen, v primeru depolarizacije pa se histamin sprosti v sinaptično špranjo.

Sinteza in sproščanje histamina sta uravnavana z avtoregulacijo preko histaminskih receptorjev H_3 , ki so locirani presinaptično (33).

1. 4. 2. 2. Histamin kot neurotransmitter

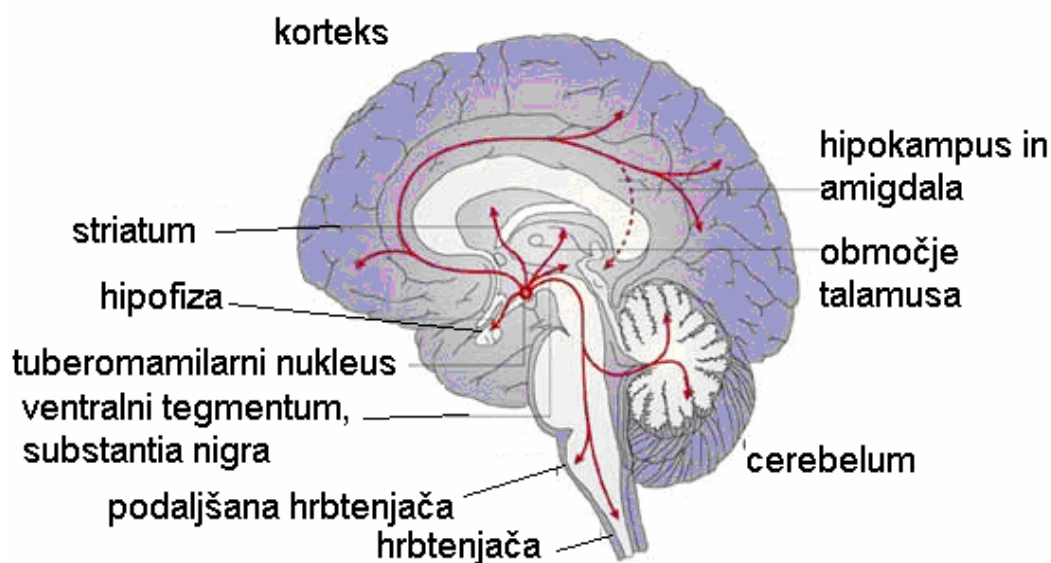
Poznavanje vloge histamina izven osrednjega živčevja je oviralo sprejetje histamina kot neurotransmitterja. Biokemične študije so nakazovale na prisotnost histamina v CZS, šele

razvoj protiteles proti histaminu in HDC pa je omogočil opredelitev prisotnosti in razporeditev histaminergičnih nevronov (35, 33).

Histamin ustreza definiciji in izpolnjuje vse potrebne kriterije, da ga lahko obravnavamo kot neurotransmitter.

1. 4. 2. 3. Histaminergični sistem

Histaminergični nevroni izhajajo iz tuberomamilarnega jedra v posteriornem bazalnem hipotalamusu, od koder projicirajo praktično v celotne možgane in del hrbtenjače. Opredeljeni sta bili dve ascendentni in ena descendentna pot. Ventralna ascendentna pot projicira v hipotalamus, septum in olfaktorni bulbus. Dorzalna ascendentna pot oživčuje talamus, hipokampus, amigdalo in rostralni del prednjih možganov. Descendentna pot oživčuje možgansko deblo in hrbtenjačo (33).



Slika 8: Shema histaminergičnega sistema z jedri histaminergičnih nevronov v tuberomamilarnem nukleusu in projekcijami po celotnih možganih (prirejeno po Haas and Panula (235)).

Med hipotalamusom in cerebelumom obstajajo direktne povezave, ki vodijo iz hipotalamusa v cerebelarno skorjo in jedra cerebeluma. Kot možen neurotransmitter hipotalamo - cerebelarnih projekcij je veljal histamin. Z imunohistokemijskimi raziskavami so dokazali, da del teh

povezav, ki izhajajo iz tuberomamilarnega jedra hipotalamusa, predstavljajo histaminergični nevroni (9). Tang in sodelavci so v svoji študiji dokazali ekscitatorne učinke histamina preko histaminergičnih receptorjev H_2 na nevrone fastigalnega jedra cerebeluma (36). V študiji, ki jo je izvedel Song s sodelavci (37), so preučevali vpletenost histamina v funkcije struktur, ki jih oživčuje. Dokazali so, da histamin preko aktivacije histaminergičnih receptorjev H_2 cerebeluma vpliva na motoriko, izboljša ravnotežje in koordinacijo. V *in vitro* študiji so dokazali ekscitatorne učinke histamina preko histaminergičnih receptorjev H_1 in H_2 na granularnih celicah cerebeluma, s prevlado histaminergičnih receptorjev H_1 . Nakazali pa so tudi vpletenost histaminergičnih vlaken v cerebelarne funkcije (38).

Gostota histaminergičnih vlaken se razlikuje glede na regijo. Največja gostota histaminergičnih vlaken je prisotna v hipotalamusu, medialnem septumu, področju ventralnega tegmentuma. Nekoliko manjšo gostoto najdemo v cerebralni skorji, amigdali, striatumu in substanci nigri. Medtem ko v malih možganih, večini regij možganskega debla, očesni mrežnici in hrbtenjači najdemo le majhno število vlaken (33).

Histaminergični nevroni imajo enake morfološke in elektrofiziološke značilnosti kot nevroni ostalih biogenih aminov. So spontano aktivni in se v budnem stanju osebnika prožijo s frekvenco 3Hz. Njihovo proženje se spreminja med ciklom spanje-budnost. V budnem stanju je frekvenca proženja visoka, med spanjem se zniža, medtem ko v REM fazi spanja proženje popolnoma preneha (33).

1. 4. 2. 4. Učinkovanje histamina

Histamin učinkuje preko vezave na 4 s proteinom G sklopljenimi receptorji. Prvi trije podtipi histaminergičnih receptorjev (H_1 , H_2 in H_3 - številke kažejo na vrstni red odkrivanja) so dodobra raziskani. Najdemo jih tako na živčnih kot tudi na celicah glije in celicah krvnih žil. Nedavno odkriti histaminergični receptor H_4 naj bi deloval podobno kot histaminergični receptor H_3 , vendar njegova vloga še ni v celoti pojasnjena (33, 39).

Histaminergični receptorji H_1

V CZS se nahajajo na postsinaptičnih nevronih. Imajo 7-transmembranskih domen.

Prenos signala:

Po vezavi histamina na receptor, se aktivira $G_{q/11}$, ki stimulira aktivnost fosfolipaze C (PLC). PLC hidrolizira fosfatidil- 4,5-bisfosfonat, kar vodi do nastanka dveh sekundarnih prenašalcev, in sicer IP_3 -inozitol-1,4,5-trifosfat in DAG- diacilglicerol. DAG potencira aktivnost PKC, medtem ko se IP_3 veže na IP_3 -receptor, ki se nahaja na endoplazmatskem retikulumu in omogoča sprostitvev Ca^{2+} v citoplazmo. Stimulacija histaminergičnih receptorjev H_1 vodi tudi do aktivacije fosfolipaze A_2 -PLA $_2$ (posledično se sprošča arahidonska kislina iz membrane) (33).

Histaminergični receptorji H_2

Tako kot receptorji H_1 se tudi receptorji H_2 nahajajo na postsinaptičnih nevronih. Receptorji H_2 kažejo le 40% homologije z receptorji H_1 .

Prenos signala:

Stimulacija histaminergičnih receptorjev H_2 privede do aktivacije adenilat-ciklaze, kar vodi do nastanka sekundarnega prenašalca cAMP iz ATP. Povišana koncentracija vodi do aktivacije PKA, ki fosforilira proteine v citosolu, v celični membrani ali pa se prenese v jedro, kjer vpliva na transkripcijo (33).

Histaminergični receptorji H_3

So avtoreceptorji, ki uravnavajo sintezo in sproščanje histamina v možganih. Prisotni so samo na presinaptičnih nevronih. Histaminergični receptorji H_3 lahko regulirajo tudi sproščanje drugih nevrottransmitterjev, npr. glutamata, GABA, noradrenalina, dopamina, acetilholina, serotonina in različnih peptidov (33).

Prenos signala:

Vezava histamina na receptor vodi v zmanjšanje produkcije cAMP, saj je negativno sklopljen z adenilat ciklazo (G_i/G_o). Aktivacija H_3 receptorjev lahko vodi tudi v inhibicijo napetostno odvisnih Ca^{2+} kanalov (HVACC). Posledica je zmanjšanje sproščanja nevrottransmitterjev iz nevronov.

Histaminergični receptorji H₄

Kot zadnji je bil odkrit histaminergični receptor H₄ leta 2001 (39). Njegova vloga še ni povsem pojasnjena, vendar pa dejstvo, da ga v veliki večini najdemo na celicah hematopoetskega izvora nakazuje, da ima pomembno vlogo pri regulaciji vnetja in kemotaksi (39). Lokalizirali so ga tudi v CŽS. Prisoten je tako v možganski skorji kot tudi v cerebelumu, možganskem deblu, amigdali, talamusu in striatumu, z največjo gostoto izražanja v kortikalni skorji in cerebelumu (40).

1. 4. 2. 5. Funkcija histamina v CŽS

Študije kažejo, da naj bi histamin v osrednjem živčevju deloval kot nevromodulator v neonatalnem obdobju in kot neurotransmiter v odraslem obdobju.

Igra pomembno vlogo v številnih fizioloških procesih v CŽS, kjer ima stimulatorne in inhibitorne učinke (Preglednica I).

Stimulatorni učinki histamina:

- Najbolj raziskan centralni učinek histamina je njegov vpliv na regulacijo ritma budnost/spanje, ima vlogo pri ohranjanju budnosti. Učinek histamina je posledica stimulacije holineričnih jeder, medtem ko medsebojno delovanje ostalih aminergičnih celic še ni pojasnjeno (41). Pomembno vlogo pri ohranjanju budnosti ima interakcija histaminergičnih nevronov z oreksinskimi nevroni.
- Histamin poveča sposobnost pomnenja, učenja in kognicije.
- Poveča lokomotorno aktivnost.
- Poveča zaznavanje bolečine.
- Vpleten je v kontrolo ravnotežja vnosa tekočin. Histamin naj bi induciral vnos tekočin. Poveča tudi izločanje vazopresina.
- Poveča sproščanje ACTH, LH, prolaktina, vazopresina in oksitocina.

Inhibitorni učinki histamina:

- Histamin in snovi, ki povečajo ekstracelularni histamin, zmanjšujejo apetit. Ta učinek naj bi bil povezan z aktivacijo histaminergičnih receptorjev H₁ v ventromedialnem hipotalamusu.

- Zmanjšuje sproščanje rastnega in tireotropnega hormona.

Histamin vpliva tudi na nekatere avtonomne funkcije: poveča krvni tlak, zniža telesno temperaturo in poveča koncentracijo glukoze v krvi.

Histamin ima pomembno zaščitno vlogo pri epileptičnih napadih, torej ima antikonvulzivni učinek. Ta učinek je dosežen preko histaminergičnega receptorja H₁ zavrtega pretoka K⁺ ionov v nevronih.

Vključen je tudi v nekatere patološke procese kot so demenca, depresija, shizofrenija, kjer pa njegova vloga v celoti še ni pojasnjena. V raziskavi vpletenosti histamina v patofiziologijo Alzheimerjeve bolezni, so v nekaterih primerih poročali o povečanih koncentracijah histamina v CSF, druge pa o zmanjšanih koncentracijah histamina (42). Pri shizofreniji so opazili znižan nivo histamina tako v krvi kot v serumu.

Funkcija	Vloga histamina
<i>Stimulativne funkcije</i>	
Cikel spanje/budnost	Vzdrževanje budnosti
Lokomocija	Povečana lokomotorična aktivnost
Kognitivne funkcije	Izboljšanje učenja in pomnenja
Energetski metabolizem	Indukcija hidrolize glikogena v CŽS
Nocicepcija	Povečano zaznavanje bolečine
<i>Inhibitorne funkcije</i>	
Prehranjevanje	Zmanjšan apetit
Konvulzije	Manjša pojavnost krčev
Stres	Manj s stresom povzročene vznemirjenosti
Plastičnost živčevja	Inhibicija z denervacijo povzročene občutljivosti

Preglednica I: Vloga histamina v osrednjem živčevju.

1. 4. 2. 6. Inaktivacija

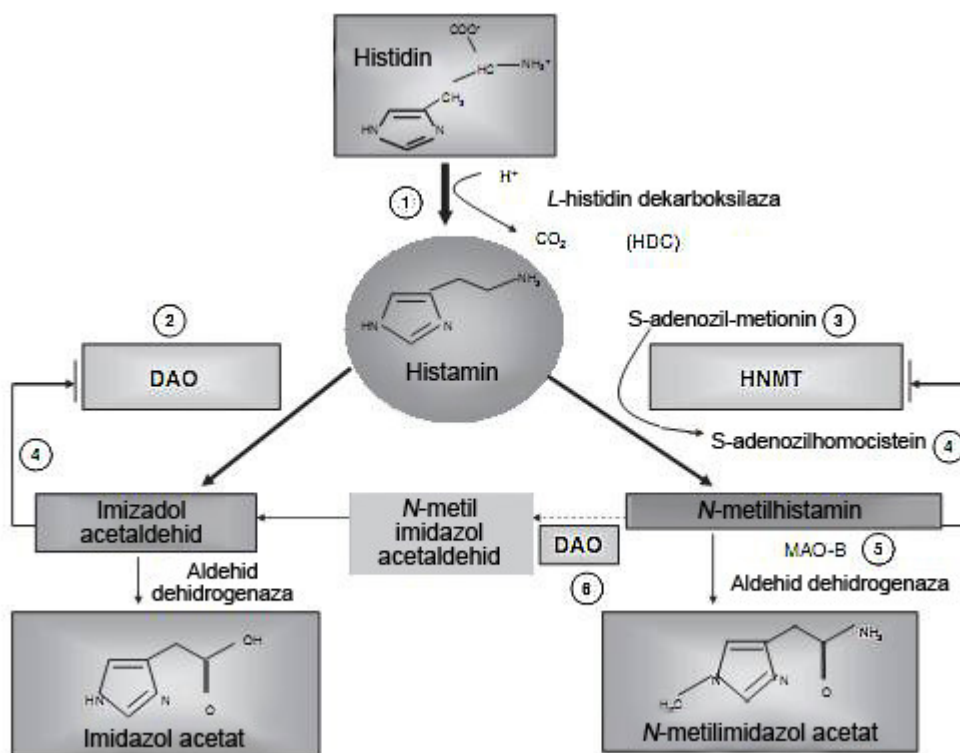
Inaktivacija histamina poteka z razgradnjo in s privzemom.

1. Razgradnja

Metabolizem poteka po dveh poteh:

- N-metiliranje: pod vplivom znotrajceličnega encima *histamin N – metil transferaze*, (HNMT) pride do N - metilacije. Nastane tele-metilhistamin, ki se v reakciji oksidativne deaminacije z encimom monoamino oksidazo B (MAO-B) pretvori v telemetilimidazol acetaldehid. Ta se naprej oksidira z encimom aldehidno dehidrogenaza do telemetilimidazol oetne kisline.
- Oksidacija, ki jo katalizira encim diamino oksidaza (DAO), vodi do nastanka imidazol-oetne kisline (33; 43).

Slednji način je v CZŠ redek, večina poteka N-metilacija.



Slika 9: Shematski prikaz metabolizma histamina (Povzeto po: Maintz et.al., 2007)

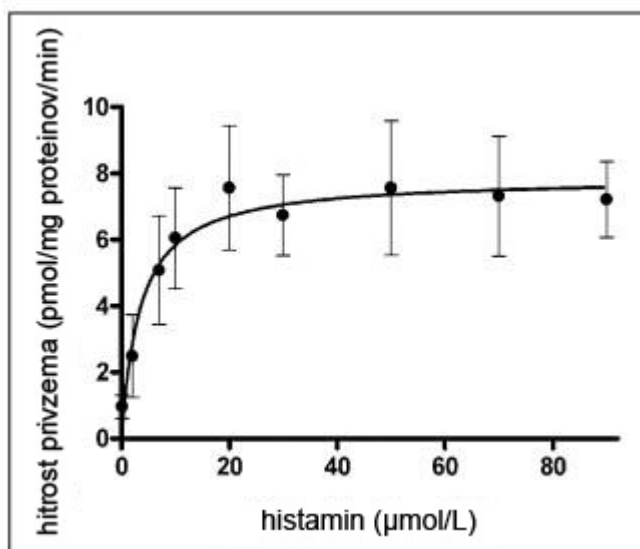
2. Privzem histamina

Rezultati predhodnih raziskav kažejo, da se histamin privzema tako v nevrone (Sakurai et al., 2006) kot tudi v celice glije (45, 46). Privzem histamina v nevrone je majhen. S tem se histaminergični nevroni razlikujejo od ostalih monoaminergičnih nevronov, ki imajo učinkovit sistem privzemanja. Sakurai-a in sodelavci so dokazali, da je transport histamina v nevrone dvosmeren in odvisen od Na^+ , Cl^- in HCO_3^- ionov (43).

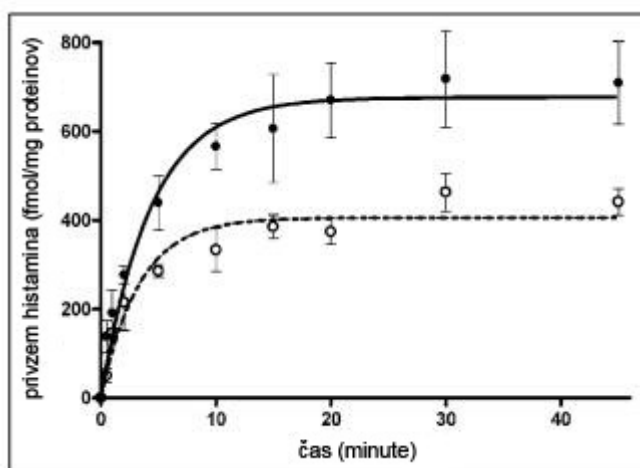
Med celicami glije naj bi pomembno mesto inaktivacije histamina predstavljali prav astrociti. Husztijeva in sodelavci so opisali od Na^+ in Cl^- odvisen, dvosmeren privzem histamina v astrocitne kulture zarodkov piščancev (47) in neonatalnih podgan (48; 45), poleg tega so opisali pomembno vlogo celic glije pri stalnem odstranjevanju histamina iz sinaptične špranje tudi v razmerah *in vivo* (48). Slednjo trditev so v svoji študiji potrdili tudi Kržanova in sodelavci (46). V študiji so dokazali tudi, da se histamin privzema v astrocitate, pripravljene iz možganske skorje tako neonatalnih kot odraslih podgan, in je odvisen od natrijevih ionov.

Lastnosti privzema histamina:

Rezultati predhodnih poskusov na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani so dokazali, da je privzem histamina v primarne kulture astrocitov, vzgojenih iz možganske skorje neonatalnih podgan, od koncentracije odvisen, saturabilen proces. Histamin se v neonatalne astrocitate privzema s K_m $3,5 \pm 0,8 \mu\text{M}$ in V_{\max} $7,9 \pm 0,3 \text{ pmol/mg proteinov}$ (49).



Graf 1: Odnos hitrosti specifičnega privzema (celokupni minus nespecifični privzem) v odvisnosti od koncentracije ^3H -histamina v primarne kulture astrocitov, pripravljene iz možganske skorje 3 dni starih podgan. Astrocitne kulture so bile inkubirane 20 minut v koncentracijskem območju od 0,125 do 90 $\mu\text{mol/L}$ pri 37 °C in 4 °C. Specifični privzem ^3H -histamina predstavlja razliko med celokupnim (privzem histamina pri 37 °C) in nespecifičnim (privzem histamina pri 4 °C) privzemom. Histamin se v neonatalne astrocite privzema s $K_m 3,5 \pm 0,8 \mu\text{M}$ in $V_{max} 7,9 \pm 0,3 \text{ pmol/mg proteinov}$. Vsaka vrednost na sliki predstavlja srednjo vrednost šestih določitev (49).



Graf 2: Časovni potek privzema 125 nM ^3H - histamina v primarne kulture astrocitov, pripravljene iz možganske skorje neonatalnih podgan. S polnimi simboli je prikazan celokupni privzem ^3H - histamina pri 37 °C, s praznimi simboli pa nespecifični privzem ^3H - histamina pri 4 °C. Vsaka vrednost na sliki predstavlja srednjo vrednost šestih določitev (49).

Kljub vsem podatkom in dokazom o privzemu histamina, pa natančnega mehanizma privzema še ne poznamo. Prav tako še vedno ne poznamo specifičnega transporterja za histamin.

Privzem histamina v astrocite naj bi potekal preko vsaj dveh mehanizmov (49, 22). In sicer preko od natrijevih ionov odvisnega aktivnega transporta in od naboja ter koncentracije odvisnega pasivnega transporta (olajšane difuzije).

Študije, ki so potekale na astrocitih, vzgojenih iz možganske skorje, so dokazale, da je privzem histamina temperaturno odvisen, nasitljiv proces (21, 49). Osredkar in sodelavci so v študiji dokazali, da privzem histamina poteka tako pri 37° C (celokupni privzem) kot tudi pri 4 ° C (le energijsko neodvisen, pasivni privzem). Pri obeh temperaturah (37 °C in 4 °C) poteka sprva privzem histamina hitro, nato pa postopoma doseže plato. Hitrost, s katero doseže plato in višina le-tega sta temperaturno odvisna.

S poskusi so dokazali tudi, da je privzem histamina koncentracijsko odvisen, nasitljiv proces (21, 49), in sicer tako pri 4 °C kot tudi pri 37 °C. Dejstvo, da tudi pri 4 °C, ko aktivni procesi ne potekajo, v primeru privzema histamina pride do nasičenja transporta, kaže na to, da so tudi pri pasivnem prenosu udeleženi še neznani transportni proteini. Gre torej za proces olajšane in ne enostavne difuzije (22, 49).

Ker je histamin monoaminski nevrottransmitter, bi aktivni prenos lahko potekal tudi preko katerega od transporterjev za druge monoamine, medtem ko so med možnimi kandidati za energijsko neodvisen prenos histamina tudi transporterji organskih kationov (OCT – angl. organic cation transporter) (46). Te trditve vsaj v primeru kulture neonatalnih astrocitnih kultur, določene že izvedene študije niso potrdile (49, 50).

Omeniti je potrebno, da je večina raziskav privzema histamina potekala na astrocitih, pripravljenih iz možganske skorje neonatalnih podgan. Glede na to, da histaminergična vlakna oživčujejo tudi druge možganske regije, med drugim tudi cerebellum in striatum, kjer bi histamin lahko igral pomembno vlogo, je bilo smiselno raziskati lastnosti privzema histamina v te regije.

2. NAMEN DELA

Ponovni privzem v presinaptične nevrone in celice glije predstavlja enega od pomembnih načinov inaktivacije neurotransmiterjev, tudi histamina. Za prenos preko celične membrane so potrebni specifični transporterji, vendar transporterja, ki bi omogočal privzem histamina, še ne poznamo. Kljub temu pa podatki iz literature potrjujejo, da se histamin privzema v astrocitne kulture neonatalnih podgan. Pri tem je večina do sedaj opravljenih študij potekala samo na astrocitnih kulturah, pripravljenih iz možganske skorje, čeprav je znano, da segajo histaminergična vlakna tudi v druge možganske regije.

Namen diplomske naloge je proučevanje lastnosti privzema ^3H -histamina v kulture astrocitov, pripravljene iz različnih možganskih regij, in sicer iz cerebeluma in striatuma (časovna odvisnost, koncentracijska odvisnost). Poleg tega bomo poskušali pridobiti informacije o tem, preko katerega transportnega sistema se histamin privzema v astrocite (z izvedbo inhibicijskih študij). Dotaknili se bomo tudi vloge transporterjev organskih kationov (OCTs – angl. *organic cation transporters*) pri privzemu histamina.

Preverili bomo naslednje delovne hipoteze

- Astrociti sodelujejo pri privzemu histamina, vendar obstajajo razlike pri privzemu ^3H -histamina v kulture astrocitov, pripravljene iz različnih možganskih regij neonatalnih podgan.
- Privzem histamina v cerebelarne astrocitne kulture bo manjši v primerjavi s privzemom v astrocitne kulture, pripravljene iz striatuma.
- Prenos histamina v kulture neonatalnih astrocitov, ki so pripravljene iz malih možganov in striatuma, poteka tudi preko transporterjev za organske katione.

3. MATERIALI

3. 1. Materiali

- [³H]-histamin (histamine dihydrochloride) (66,7 GB q/mmol; specifična aktivnost 14,2 Ci/mmol in 13,4 Ci/mmol; Perkin Elmer, ZDA)
- Histamin (histamine dihydrochloride)
- L-15 Medium (Leibovitz); Sigma
- Tripsin – EDTA, 0,05 % (1X), GIBCO
- Antibiotik gentamicin – 50mg/ml; GIBCO, 15750-045
- Albumin iz govejega seruma (Sigma)
- DMEM – po Dulbeccu spremenjeno Eaglovo gojišče (1X); GIBCO
- Natrijev piruvat, 100 mM; GIBCO
- L - glutamin, 200 mM (100X); GIBCO
- Amitriptilin hidroklorid; Sigma
- Fluoksetin hidroklorid; Sigma
- Decinij 22, (1,1'-diethyl-2,2'-cyanine iodide, 99%); Sigma
- Dezipramin hidroklorid; Ciba – Geigy
- Kortikosteon (Fluka)
- Sestava pufra za privzem histamina:
 - HEPES (Sigma)
 - MgSO₄X7H₂O (Sigma)
 - CaCl₂ (Sigma)
 - Glukoza (Merck)
 - NaCl (Merck)
 - KCl (Merck)
 - KH₂PO₄ (Merck)
- Scintilacijska tekočina Aquasol (NEN)
- Reagent za barvanje (Bio-Rad Protein Assay)

3. 2. Oprema

Oprema	Proizvajalec
Pipete	Gilson
Nastavki za pipete	TPP, Eppendorf
Brezprašna komora z laminarnim pretokom zraka	Iskra
Centrifuga	Sigma
Centrifugirke (15 in 50 ml)	TPP
Vorteks	Tehtnica Železniki
Tehtnica	Mettler
Plastenke za gojenje s perforiranim zamaškom (25 in 75 cm ²)	TPP
Mikrotitrne plošče z 96 vdolbinicami in pokrovom zraka	TPP
Mikrotitrne plošče z 12 vdolbinicami in pokrovom zraka	TPP
Centrifugirke 1,5 ml	TPP ali Eppendorf
Inkubator	Binder
Hladilnik	Gorenje
Zmrzovalna skrinja	Gorenje
Spektrofotometer	Sinergy Biotech
Scintilacijski števec	Perkin Elmer

Preglednica II: Seznam uporabljene opreme

4. METODE

4. 1. Poskusne živali

Za izvajanje poskusov na živalih smo pridobili dovoljenji Veterinarske uprave Republike Slovenije št. 323-02-232/2005/2. in št. 34401-81/2008/5. Prav tako so bili vsi postopki na živalih opravljeni v skladu s smernicami za delo s poskusnimi živalmi, ki ga je izdal Komite za zaščito živali Nacionalnih Inštitutov zdravja, Bethesda, ZDA.

Za pripravo kultur astrocitov smo uporabili neonatalne (3 dni stare) podgane vrste *Rattus norvegicus* seva Wistar obeh spolov. Živali smo žrtvovali z namenom odstranitve organov (možganov).

Na izbiro živalske vrste so vplivale zlasti možnost primerjave z že objavljenimi študijami in možnost prenosa ugotovitev v humano medicino ter lahka dostopnost. Živali so predstavljale vir tkiva, ker ni ustreznega neživalskega modela za izvajanje poskusov ter s tem preverjanje naših hipotez.

4. 2. Priprava primarnih kultur astrocitov

Za pridobitev čistih kultur astrocitov malih možganov in striatuma smo le-te pripravljali po uveljavljenemu protokolu (51).

Podgane je dekapitiral tehnik, ki ima dovoljenje za izvajanje evtanazije poskusnih živali. Iz lobanje je nato previdno odstranil možgane ter jih potopil v raztopino Leibowitz L-15. Po odstranitvi mening smo ločili striatum in male možgane. Po ločitvi smo mehansko razdrobili možgansko tkivo s pomočjo pipet in injekcijskih igel različnih premerov ter pripravili suspenzijo v Leibowitzevem gojišču L-15.

Po centrifugiranju smo usedlino gojili v gojilnih posodah v gojišču DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*; po Dulbeccu modificirano Eaglovo gojišče). DMEM poleg visoke koncentracije glukoze vsebuje še 10% fetalnega govejega seruma (FBS), 1 mM piruvata, 2 mM glutamina in 25 µg/ml gentamicina. Celice smo vzgajali v inkubatorju pri 37° C, v mešanici 95% zraka in 5% CO₂. Gojišče smo menjali na 7 dni.

Celice smo gojili do prve konfluentnosti, jih nato stresali preko noči pri 225 obratih/minuto in zjutraj zamenjali gojišče. S postopkom, ki smo ga ponovili trikrat zapored, smo odstranili kontaminirajoče celice, predvsem mikroglijo. Nato smo celice v posodicah tripsinizirali in odlepljene celice presadili v nove posode. 24 ur smo jih gojili v prisotnosti 20 μM antimetabolita citozin arabinozida, ki je onemogočil rast fibroblastom. Zaradi prisotnosti tripsina, smo naslednji dan zamenjali gojišče.

Postopek smo dvakrat ponovili in tako dobili drugič konfluentne celice. Celice smo prenesli v 12-prostorske testne posodice in za poskus uporabili kulture astrocitov po treh tednih gojenja.

4. 3. Privzem histamina v kulture astrocitov

Za pridobitev informacij o lastnostih privzema histamina v kulture astrocitov, smo spremljali časovno in koncentracijsko odvisnost ter inhibicijo privzema. V začetni fazi poskusi potekajo na enak način, kasneje pa se razlikujejo.

Vse poskuse smo izvajali v treh paralelkah. V slepi vzorec smo odpipetrali le pufer, v kontrolni vzorec pa pufer in 125 nM ^3H -histamina. Poskuse smo izvajali pri 37 °C, kjer se spremlja celokupni privzem in pri 4 °C, ki pomeni nespecifičen privzem.

Najprej smo odstranili DMEM gojišče in celice dvakrat sprali s pufrom za privzem, katerega sestava je sledeča: 25 mM HEPES, 125 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1,7 mM CaCl₂, 5,6 mM glukoze, pH pufra pa znaša 7,4.

Časovna odvisnost:

Po spiranju plošč smo dodali pufer za privzem, nato 125 nM ^3H -histamin in reakcijo prekinili po 1, 2, 3, 5, 10, 20 in 30 minutah s postavitvijo testne posodice na led in odstranitvijo inkubacijske tekočine. Po trikratnem spiranju z ledeno mrzlim pufrom brez CaCl₂, smo celice lizirali z 300 μl 0,5 M NaOH. V 250 μl lizata smo s tekočinsko scintilacijskim števcem za določanje specifične aktivnosti beta sevalcev izmerili količino privzetega ^3H -histamina, v preostalem lizatu pa smo določili koncentracijo proteinov.

Koncentracijska odvisnost:

Po spiranju plošč in dodanem puftru za privzem smo dodali različne koncentracije ^3H -histamina in histamina, v končnih koncentracijskih območjih od $0,008 \mu\text{M}$ – $50 \mu\text{M}$ in inkubirali 20 minut. Tekom inkubacije pri 4°C smo vzorce postavili na led, pri 37°C pa smo vzorce imeli v inkubatorju. Po preteklem času smo reakcijo prekinili s postavitvijo testne posodice na led ter odstranitvijo inkubacijske tekočine. Sledilo je trikratno spiranje z ledeno mrzlim pufrom brez CaCl_2 in liziranje celic z $300 \mu\text{l}$ $0,5 \text{ M NaOH}$. V $250 \mu\text{l}$ lizata smo s tekočinsko scintilacijskim števcem za določanje specifične aktivnosti beta sevalcev izmerili količino privzetega ^3H -histamina, v preostalem lizatu pa smo določili koncentracijo proteinov.

Inhibicija privzema:

Po spiranju in dodatku pufr za privzem smo v vsako od 12 –ih luknjic testne posodice dodali eno od koncentracij izbranih antidepresivnih učinkovin ter inhibitorja transporterjev organskih kationov. Inkubirali smo 20 minut pri 37°C . Nato smo dodali 125 nM ^3H -histamina in inkubirali nadaljnih 20 minut in reakcijo prekinili s postavitvijo testne posodice na led in odstranitvijo inkubacijske tekočine. Sledilo je trikratno spiranje z ledeno mrzlim pufrom brez CaCl_2 in liziranje celic z $300 \mu\text{l}$ $0,5 \text{ M NaOH}$. V $250 \mu\text{l}$ lizata smo s tekočinsko scintilacijskim števcem za določanje specifične aktivnosti beta sevalcev izmerili količino privzetega ^3H -histamina, v preostalem lizatu pa smo določili koncentracijo proteinov.

4. 4. Določanje koncentracije proteinov

Koncentracijo proteinov smo določali po metodi Bio Rad. Najprej smo odpipetirali standard albumina ($2,5 \mu\text{g}$, $5 \mu\text{g}$, $8 \mu\text{g}$, $10 \mu\text{g}$, $20 \mu\text{g}$, $30 \mu\text{g}$) in $8 \mu\text{l}$ vzorca. Dodali smo $200 \mu\text{L}$ $0,5 \text{ M NaOH}$ in vzorce premešali. Čez 10 minut smo dodali vodo (da bo končni volumen $600 \mu\text{L}$), $200 \mu\text{L}$ $0,5 \text{ M HCl}$ in $200 \mu\text{L}$ reagenta za barvanje ter ponovno premešali. Pripravljene raztopine smo pustili stati 30 min in nato spektrofotometrično izmerili absorpcijo pri 595 nm valovne dolžine. Dobljeno koncentracijo proteinov smo uporabili pri podajanju koncentracij privzetega histamina.

4. 5. Analiza podatkov

Vse poskuse smo večkrat ponovili. Poskuse smo izvajali v treh paralelkah ter rezultate statistično obdelali.

Vse vrednosti so izražene kot aritmetična sredina +/- standardna napaka aritmetične sredine (SEM). Iz saturacijskih poskusov smo izračunali vrednosti K_m in V_{max} , v inhibicijskih poskusih smo s pomočjo linearne regresije izračunali vrednosti, ki povzročijo polovično inhibicijo privzema (IC_{50}).

Statistično značilno razliko smo izračunali s Studentovim t-testom za neodvisne vzorce pri primerjavi dveh skupin rezultatov in enosmerno analizo variance (ANOVA) pri primerjavi več skupin hkrati. Statistično značilno razliko predstavlja stopnja tveganja največ 0,05.

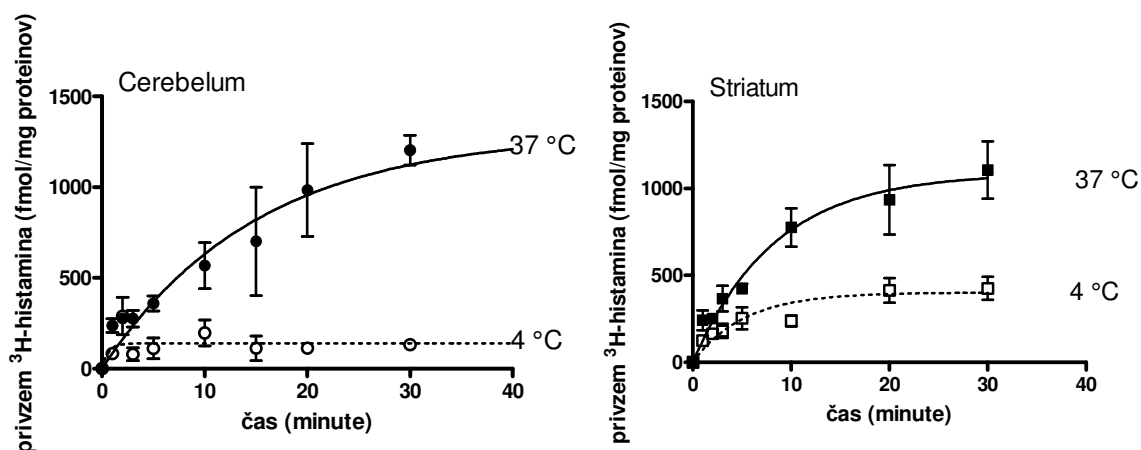
Za izračun smo uporabili računalniški program GraphPad Prism 4.

5. REZULTATI

Iz literature je znano, da astrociti privzemajo histamin. Privzem je odvisen od Na^+ , temperature in koncentracije histamina. Vendar pa je večina raziskav potekala na astrocitnih kulturah, pripravljenih iz možganske skorje.

V diplomski nalogi smo raziskovali vpliv različnih možganskih regij na privzem histamina v kulture astrocitov, vzgojene iz neonatalnih podgan. Z namenom pridobitve informacij o privzemu smo spremljali časovno in koncentracijsko odvisnost ter inhibicijo privzema.

5. 1. Časovni privzem ^3H – histamina



Graf 3: Časovni potek privzema $125 \text{ nM } ^3\text{H}$ – histamina v primarne kulture astrocitov, pripravljene iz malih možganov neonatalnih podgan in striatuma neonatalnih podgan. S polnimi simboli je prikazan celokupni privzem ^3H – histamina pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$, s praznimi simboli pa nespecifični privzem ^3H – histamina pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Vsaka vrednost predstavlja srednjo vrednost dveh poskusov opravljenih v triplicatih.

Graf 3 prikazuje časovno odvisnost privzema histamina v astrocitne kulture pri dveh različnih temperaturah.

Histamin se v obeh primerih privzema enofazno. Privzem histamina v neonatalne astroците sprva narašča, vendar naraščanje ni zelo izrazito. Pri cerebelumu se pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$ po 30 minutah doseže plato, medtem ko je pri striatumu nastop platoja hitrejši, po 20 minutah. Pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$ je nastop platoja hitrejši, po desetih minutah v primeru astrocitnih kultur striatuma in 3 minutah v primeru astrocitnih kultur cerebeluma. Višina platoja in hitrost, s katero se le-ta doseže, je

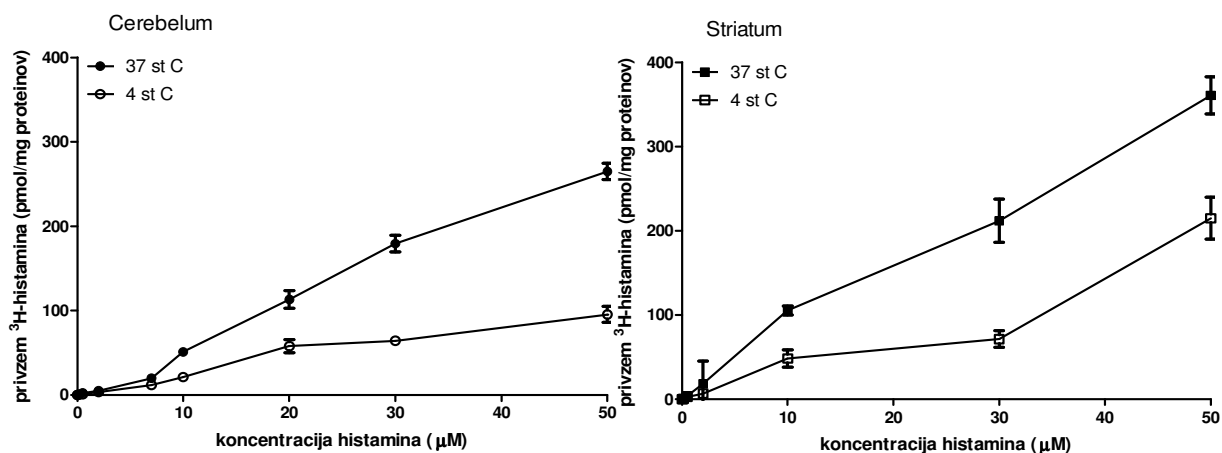
od temperature odvisen proces. Pri 37 °C je privzem histamina značilno višji kot pri 4 °C, čeprav sam privzem histamina tudi pri 4 °C ni popolnoma inhibiran. Primerjava celokupnega maksimalnega privzema histamina ne kaže bistvene razlike med regijama. Razlikuje pa se hitrost, s katero se dosežeta. Polovico maksimalne koncentracije se v primeru cerebelarnih astrocitov privzame v 10,4 minutah, v astrocitne kulture striatuma pa v 5,8 minutah. Pri 4 °C znaša maksimalni privzem v primeru astrocitnih kultur cerebeluma 150 fmol/mg proteinov, v primeru astrocitnih kultur striatuma pa 301,8 fmol/mg proteinov.

5. 2. Koncentracijska odvisnost

Kulture astrocitov, vzgojene iz malih možganov in striatuma, smo izpostavili naraščajočim koncentracijam ³H-histamina pri 37 °C, kar je predstavljalo celokupen privzem ter pri 4 °C, kar je predstavljalo nespecifični privzem. Koncentracijsko območje se je gibalo od 0,008 do 50 μM.

Rezultate smo predstavili v treh sklopih. V prvem sklopu smo predstavili koncentracijsko odvisen privzem histamina pri 4 °C in 37 °C, v drugem sklopu pa rezultate specifičnega privzema. Specifični privzem predstavlja razliko med celokupnim (pri 37 °C) in nespecifičnim privzemom (pri 4 °C). V tretjem sklopu smo predstavili hitrost privzema histamina v odvisnosti od koncentracije ³H - histamina.

5. 2. 1. Od koncentracije ^3H – histamina odvisen privzem



Graf 4: Privzem naraščajočih koncentracij ^3H – histamina v primarne kulture astrocitov, pripravljene iz malih možganov in striatuma neonatalnih podgan. S polnimi simboli je prikazan celokupni privzem ^3H – histamina pri 37 °C, s praznimi simboli pa nespecifični privzem ^3H – histamina pri 4 °C. Vsaka vrednost predstavlja srednjo vrednost dveh poskusov opravljenih v triplikatih.

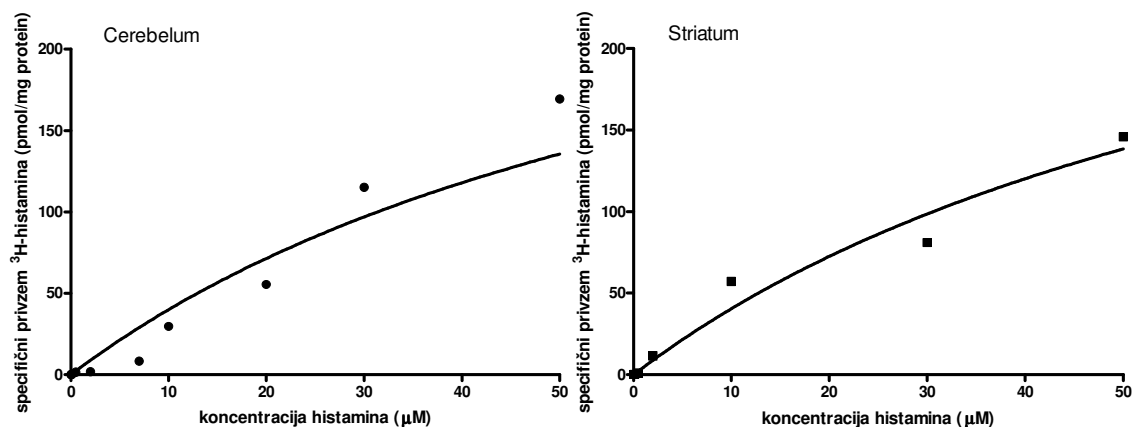
Iz grafa koncentracijske odvisnosti privzema histamina v kulture neonatalnih astrocitov cerebeluma in striatuma (Graf 4) je razvidno, da je količina privzetega ^3H - histamina v astrocitate koncentracijsko odvisen proces. Oblika krivulj pa se zelo razlikuje med seboj.

Pri astrocitnih kulturah cerebeluma (Graf 4 levo) količina privzetega histamina pri 37 °C skoraj linearno narašča do 50 μM zunanje koncentracije. Maksimalni celokupni privzem znaša $264,80 \pm 16,92$ pmol/mg proteinov pri 50 μM koncentraciji zunanjega ^3H - histamina. Pri 4 °C količina privzetega histamina do zunanje koncentracije 20 μM nekoliko hitreje narašča, nato se ustali in v nadaljevanju počasi narašča, dokler ne doseže največjo vrednost $95,46 \pm 16,32$ pmol/mg proteinov pri 50 μM koncentraciji zunanjega ^3H -histamina.

Pri opazovanju koncentracijske odvisnosti privzema histamina v kulture neonatalnih astrocitov striatuma je opazno izrazitejše naraščanje koncentracije privzetega histamina. Količina privzetega histamina pri obeh temperaturah narašča, dokler zunanja koncentracija histamina ne doseže 50 μM . Maksimalni privzem histamina znaša $360,70 \pm 38,30$ pmol/mg

proteinov ob zunanji koncentraciji 50 μM pri 37 $^{\circ}\text{C}$ in $214,90 \pm 43,19$ pmol/mg proteinov ob zunanji koncentraciji 50 μM pri 4 $^{\circ}\text{C}$.

5. 2. 2. Specifični privzem histamina

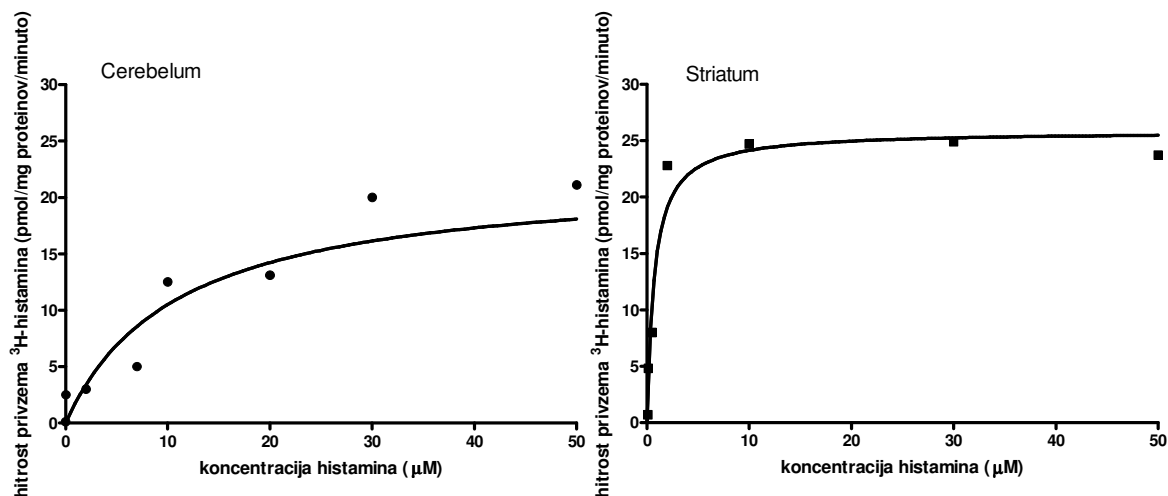


Graf 5: Koncentracijsko odvisen privzem ^3H - histamina v primarne kulture neonatalnih astrocitov cerebeluma in striatuma. Prikazana je srednja vrednost. Vsaka vrednost predstavlja srednjo vrednost dveh poskusov opravljenih v triplikatih.

Pri opazovanju specifičnega privzema ^3H - histamina v kulturo neonatalnih astrocitov cerebeluma (Graf 5 levo) sprva zaznamo linearno naraščanje privzema histamina. Ob uporabi zunanjih koncentracij ^3H - histamina višjih od 50 μM pa vrednost privzetega histamina nakazuje nastop platoja. Maksimalna vrednost specifičnega privzema ^3H - histamina v cerebelarne astroците podgane znaša 169,34 pmol/mg proteinov.

Na grafu specifičnega privzema ^3H - histamina v kulturo neonatalnih astrocitov striatuma (Graf 5 desno) vidimo, da količina privzetega histamina skoraj linearno narašča do 50 μM zunanje koncentracije ^3H -histamina in se v nadaljevanju začne ustaljevati. Maksimalni specifični privzem znaša 145,80 pmol/mg proteinov.

5. 2. 3. Hitrost privzema histamina



Graf 6: Graf koncentracijske odvisnosti hitrosti privzema ³H-histamina v primarno kulturo neonatalnih astrocitov cerebeluma in striatuma. Prikazana je srednja vrednost. Vsaka vrednost predstavlja srednjo vrednost dveh poskusov opravljenih v triplikatih.

Z analizo specifičnega privzema ³H-histamina v astrocite z modelom nelinearne regresije smo izračunali, da se histamin v astrocitne kulture cerebeluma privzema z maksimalno hitrostjo (V_{max}) $22,05 \pm 3,94$ pmol/mg proteinov/min, pri tem je Michaelisova konstanta (K_m) $11,01 \pm 6,39$ μM.

V astrocitne kulture striatuma pa se histamin privzema z V_{max} $25,84 \pm 1,53$ pmol/mg proteinov/min, medtem ko znaša K_m $0,71 \pm 0,22$ μM.

5. 3. Inhibicija privzema ^3H – histamina v astrocite

Raziskovali smo vpliv antidepresivnih učinkovin iz različnih skupin na privzem histamina v primarne kulture astrocitov vzgojenih iz cerebeluma in striatuma neonatalnih podgan. Zanimalo nas je, če bi pri privzemu histamina lahko sodelovala noradrenalinski ali pa serotoninški transporter. Uporabili smo:

- Dezipramin (pKa 10,44), kot selektivni inhibitor ponovnega privzema noradrenalina (SNRI)
- Amitriptilin (pKa 9,42) neselektivni zaviralec privzema kateholaminov (NSRI)
- Fluoksetin (pKa 10,72) selektivni inhibitor privzema serotonina (SSRI)

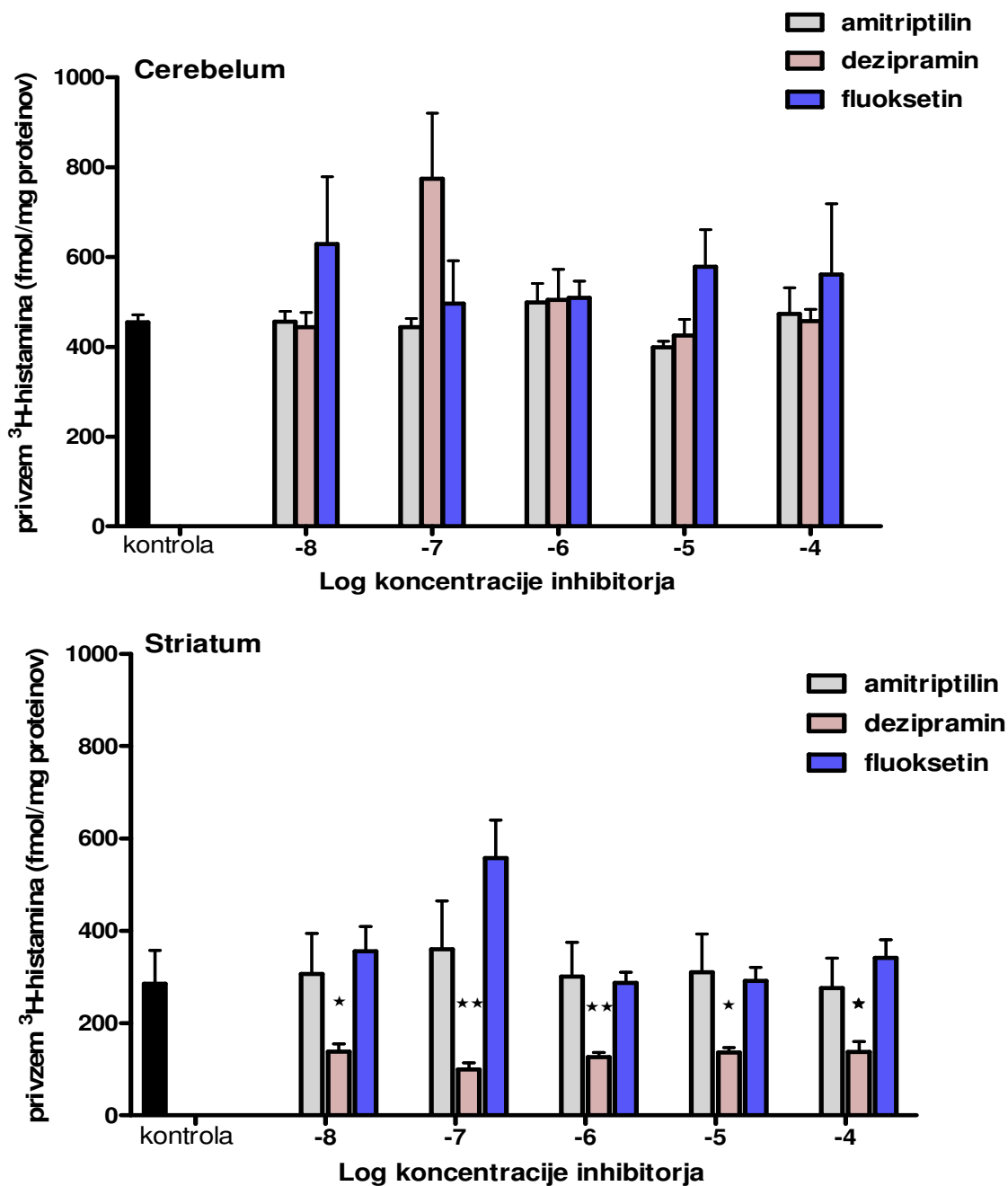
Prav tako nas je zanimala morebitna vloga OCT pri privzemu histamina, zato smo izbrali snovi, ki so znani inhibitorji OCT. V ta namen smo uporabili:

- Decinij 22, specifični inhibitor polispecifičnih OCT
- Kortikosteron

Koncentracijsko območje uporabljenih inhibitorjev se je gibalo med 10^{-8} in 10^{-4} M.

Rezultate smo prikazali v dveh skupinah. Na prvem grafu je prikazan privzem ^3H – histamina ob prisotnosti antidepresivnih učinkovin kot morebitnih inhibitorjev privzema histamina. Na drugem grafu smo predstavili vpliv inhibitorjev OCT.

5. 3. 1. Vpliv antidepresivnih učinkovin

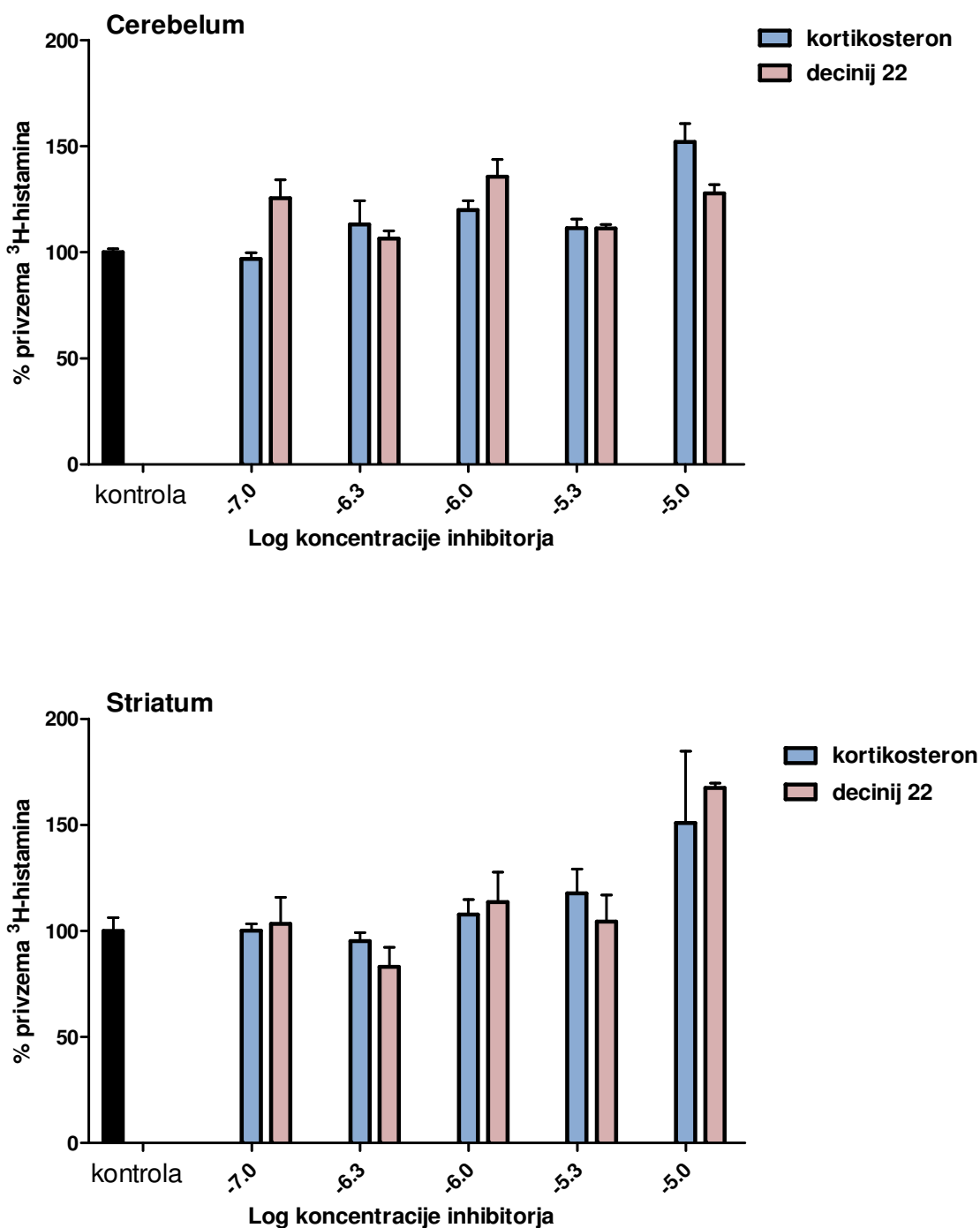


Graf 7: Vpliv inhibitorjev na privzem ^3H -histamina v primarne kulture astrocitov, pripravljene iz cerebeluma in striatuma neonatalnih podgan. Uporabili smo predstavnike treh različnih skupin antidepresivnih učinkovin, in sicer amitriptilin, dezipramin in fluoksetin. Astroците smo predinkubirali 20 minut z izbranimi inhibitorji in nato dodali 125 nM ^3H -histamin. Rezultati so predstavljeni s srednjo vrednostjo dveh poskusov opravljenih v triplikatih. Zvezdica označuje statistično značilnost $p < 0,01$, dve zvezdici pa pomenita statistično značilnost $p < 0,001$.

Iz grafa cerebeluma (Graf 7 zgoraj) je razvidno, da v primerjavi s kontrolno skupino noben od uporabljenih inhibitorjev ne kaže statistično značilnega vpliva na privzem histamina v astrocite. V nekaterih primerih je prišlo celo do povečanega privzema histamina. Pri uporabi višjih koncentracij dezipramina in amitriptilina je sicer opazna manjša inhibicija privzema, ki pa ni statistično značilna. Do inhibicije privzema je prišlo pri uporabi 10^{-5} M amitriptilina, ki znaša 12,19 %. Dezipramin prav tako inhibira privzem histamina pri 10^{-5} M koncentraciji.

Pri astrocitnih kulturah, pripravljenih iz striatuma (Graf 7 spodaj), se pri uporabi inhibitorja dezipramina kaže vpliv na privzema histamina. Dezipramin, v koncentracijskem območju od 10^{-8} in 10^{-4} M, statistično značilno inhibira privzem histamina v neonatalne astrocitne kulture. Pri tem se je stopnja inhibicije gibala med 35% kontrolne vrednosti (10^{-7} M dezipramina) in 49% kontrolne vrednosti (10^{-8} M dezipramina). Rezultati kažejo, da ostali uporabljeni inhibitorji nimajo vpliva na privzem histamina v kulture astrocitov striatuma.

5. 3. 2. Vpliv inhibitorjev OCT



Graf 8: Vpliv inhibitorjev na privzem ^3H - histamina v primarne kulture astrocitov, pripravljene iz cerebeluma in striatuma neonatalnih podgan. Astrocitne kulture smo predinkubirali 20 minut z izbranimi koncentracijami inhibitorjev OCT (kortikosteron in decinij 22), preden smo dodali 125 nM ^3H - histamin. Po 20 minutah smo reakcijo prekinili. Rezultati so predstavljeni kot % privzema samega ^3H - histamina, kjer kontrola predstavlja 100 %. Podane so srednje vrednosti dveh poskusov opravljenih v triplikatih.

Rezultati inhibicijske študije kažejo, da kortikosteron in decinij 22 ne vplivata na privzem histamina v kulture astrocitov cerebeluma in striatuma.

6. RAZPRAVA

Koncentracija neurotransmiterjev v sinaptični špranji mora biti natančno nadzorovana. Po sprostitvi neurotransmiterja v sinaptično špranjo se mora le-ta po določenem času tudi inaktivirati. Prekomerna vzdražnost živčne celice namreč vodi v njeno poškodbo ali celo v celično smrt. Odstranjevanje neurotransmiterjev iz sinaptične špranje je tako izrednega pomena, tudi zaradi vzdrževanja homeostaze v osrednjem živčevju. Privzem histamina v astrocite je eden od pomembnejših načinov inaktivacije histamina, pri čemer pa je znanje o njem še zelo pomanjkljivo.

Znano je, da igra histamin različne vloge v različnih življenjskih obdobjih, poleg tega pa je vpleten v zelo raznolike procese v centralnem živčevju (34). Oishi in sodelavci so leta 2002 objavili zanimivo študijo, kjer so pokazali, da se razpolovni čas histamina v nevronih različnih možganskih regij spreminja (52) in je najkrajši v področju striatuma, vsaj dvakrat daljši pa v predelih, kot sta možganska skorja in cerebelum. Poleg tega vemo, da se tudi lastnosti astrocitov, ki naj bi bili eno izmed pomembnejših mest inaktivacije histamina, spreminjajo tako med dozorevanjem organizma (21) kot tudi posameznimi regijami (53). Kljub temu je večina do sedaj opravljenih raziskav privzema histamina v astrocite *in vitro* potekala le na kulturah, pripravljenih iz možganske skorje. Možno, da je izražanje receptorjev in transporterjev na membranah astrocitov za različne sisteme različno oz. da je različna njihova aktivnost.

V diplomski nalogi smo se zato posvetili lastnostim privzema histamina v primarne kulture astrocitov cerebeluma in striatuma neonatalnih podgan. Da bi dobili odgovor na prvi dve hipotezi smo spremljali časovno, temperaturno in koncentracijsko odvisnost privzema histamina v kulture astrocitov. Astrocite, vzgojene iz malih možganov in striatuma, smo izpostavili histaminu pri 37 °C, kar je predstavljalo celokupen privzem ter pri 4 °C, kar je predstavljalo nespecifičen privzem.

Ugotovili smo, da se histamin privzema v kulturo astrocitov obeh preiskovanih regij, in sicer tako pri 37 °C kot tudi pri 4 °C (Graf 3). Rezultati kažejo, da je privzem histamina pri 37 °C pomembno višji kot pri 4 °C, čeprav sam privzem histamina tudi pri 4 °C ni popolnoma inhibiran. Pri 37 °C, ko potekata tako pasivni kot aktivni transport, sta višja tako doseženi plato privzema histamina kot tudi hitrost, s katero je le-ta dosežen. Privzem histamina v

astrocitne kulture striatuma in cerebeluma je torej temperaturno odvisen proces. Dobljeni rezultati dopolnjujejo ugotovitve poskusov na astrocitnih kulturah možganskega korteksa, (22, 49), kjer so predlagali, da poteka privzem histamina z aktivnim in pasivnim transportom, pri čemer sta za privzem pri 37 °C odgovorna oba.

S proučevanjem privzema pri 4 °C smo ugotavljali nespecifičen privzem histamina, torej pri temperaturi, ko energijsko odvisni procesi v celici ne potekajo. Zato privzem pri 4 °C predstavlja nespecifični, od ATP-neodvisen privzem. Zanimivo je, da privzem pri 4 °C tako pri grafu časovne (Graf 3) kot tudi koncentracijske odvisnosti (Graf 4) ne poteka linearno, kot bi pričakovali pri pasivnem procesu enostavne difuzije, ampak se po določenem času ustalil. Pri cerebelarnih astrocitih pride do nasičenja že po 3 minutah, medtem ko se pri striatumu pri 4 °C koncentracija privzetega histamina ustali po 10 minutah. Ker pri 4 °C ne potekajo energijsko odvisni procesi in ker pride po določenem času do nasičenja, pomeni da prenos verjetno poteka z olajšano difuzijo, za kar je potreben ustrezen transporter. Ko pride do nasičenja transporterjev, se koncentracija privzetega histamina ustali.

Pri primerjavi maksimalnega privzema histamina na grafu časovne odvisnosti (Graf 3) med regijama pri 4 °C opazimo, da je delež nespecifičnega privzema pri astrocitih, pripravljenih iz striatuma, znatno večji v primerjavi z deležem nespecifičnega privzema v astrocitnih kulturah cerebeluma. Doprinos nespecifičnega privzema k celokupnem privzemu znaša kar 38,48 % pri striatumu, pri cerebelumu pa le 10,9 %. Pri cerebelumu tako specifični privzem histamina predstavlja kar 89,1 % celokupnega privzema. Primerjava deleža nespecifičnega privzema nakazuje, da ima nespecifični privzem histamina v striatumu pomembnejšo vlogo kot jo ima le-ta v cerebelumu.

Za določitev nespecifičnega privzema bi lahko opazovali privzem v prisotnosti prebitka selektivnega inhibitorja določenega transporterja (npr. fluoksetina, če bi opazovali privzem serotonina). Tega ne moremo uporabiti pri študiji privzema histamina, ker ne poznamo niti specifičnega prenašalca, niti molekul, ki selektivno preprečujejo privzem histamina.

Če primerjamo dobljene rezultate z rezultati privzema histamina v astrocitne kulture možganske skorje opazimo, da do nasičenja pride v približno enakem časovnem intervalu, vendar pa je količina celokupnega privzema histamina pri 37 °C v primeru astrocitnih kultur možganske skorje bistveno nižja, znaša 670 ± 85 fmol/mg proteinov (49). Prav nasprotno pa

je nespecifični privzem v astrocitne kulture možganske skorje v primerjavi z nespecifičnim privzemom naših opazovanih regij občutno večji.

Ker nas je zanimalo, če obstaja razlika v kinetiki transportnih mehanizmov med astrocitnimi kulturami različnih regij, smo opazovali tudi koncentracijsko odvisnost privzema histamina. Celokupni maksimalni privzem v astrocitne kulture striatuma tako znaša 360,70 pmol/mg proteinov, medtem ko maksimalni celokupni privzem histamina v astrocitne kulture cerebeluma doseže za 100 pmol/mg proteinov nižje vrednosti, in sicer znaša 264,80 pmol/mg proteinov. Razlika v kapacitivnosti se kaže tudi pri nespecifičnem privzemu. Vrednost nespecifičnega privzema histamina v astrocitne kulture striatuma je vsaj dvakrat višja kot vrednost pri cerebelumu. Pri tem pa primerjava vrednosti specifičnega privzema med regijama pokaže zanimivo razliko, in sicer da je vrednost specifičnega privzema cerebeluma nekoliko višja kot vrednost specifičnega privzema striatuma (Graf 5). Sklepamo torej lahko, da je privzem histamina v astrocitne kulture striatuma večji kot v kulture cerebeluma, pri čemer pa je za razliko odgovoren predvsem pasivni del transporta.

Analiza specifičnega privzema histamina v kulture astrocitov je pokazala, da obstaja razlika v hitrosti privzema histamina v astrocitne kulture različnih regij (Graf 6). V astrocitne kulture cerebeluma se histamin privzema z V_{\max} 22,05 pmol/mg proteinov/min, v astrocitne kulture striatuma pa z V_{\max} 25,84 pmol/mg proteinov/ minuto. Možna razlaga bi bila, da je v striatumu prisotno večje število transporterjev oz. transportnih mehanizmov, ki omogočajo privzem histamina, kot v cerebelumu, še veliko bolj verjetno pa gre celo za popolnoma drugačen transportni protein.

Hitrosti privzema histamina v kulture astrocitov omenjenih regij sta v primerjavi s hitrostjo privzema v astrocitne kulture, pripravljene iz možganske skorje za več kot dvakrat višji. Kot so poročali Osredkar in sodelavci (49) znaša namreč hitrost privzema histamina v astrocitne kulture, pripravljene iz možganske skorje, $7,9 \pm 0,3$ pmol/mg proteinov/min. Znatno pa se razlikujejo tudi K_m vrednosti, in sicer poteka transport histamina tako v kulturo astrocitov striatuma (K_m 0,71 μ M) z veliko višjo afiniteto kot v astrocitne kulture cerebeluma (K_m 11,01 μ M) in možganske skorje (K_m 3,5 μ M) (49). Afiniteta histamina do (histaminskega ?) transporterja je torej bistveno večja v astrocitih vzgojenih iz striatuma kot iz malih možganov, kar poleg hitrejše inaktivacije histamina v striatumu, potrjuje, da se v striatumu nahajajo večje količine histaminergičnih nevronov in histaminskih receptorjev kot v malih možganih.

Kot je bilo omenjeno v uvodu, histamin zaradi neto pozitivnega naboja ne more prosto prehajati preko celične membrane. Prehod nabitim molekulam omogočajo transporterji. Ker specifičnega transporterja, ki bi omogočal privzem histamina, še ne poznamo, smo želeli preveriti morebitno vpletenost serotoninskega in noradrenalinskega transporterja v privzem histamina v celice. V ta namen smo uporabili različne antidepresivne učinkovine: *dezipramin* (pKa 10,44), ki v nižjih koncentracijah selektivno inhibira privzem noradrenalina, v višjih koncentracijah pa inhibira tudi privzem serotonina, *amitriptilin* (pKa 9,42), kot neselektivni zaviralec privzema noradrenalina in serotonina in *fluoksetin* (pKa 10,72), selektivni inhibitor privzema serotonina. Na izbor uporabljenih inhibitorjev so vplivali tudi predhodni rezultati raziskovalne skupine na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, na Medicinski fakulteti. S poskusi, ki so jih izvedli na astrocitnih kulturah, pripravljenih iz možganske skorje neonatalnih podgan, so dokazali, da tako dezipramin kot amitriptilin inhibirata privzem histamina.

V tokratnih poskusih je bila situacija precej drugačna. Pri kulturi astrocitov striatuma, gojenih v popolnoma enakih pogojih, kot v poskusih z možganskim korteksom (49) smo opazili pomemben inhibitorski učinek dezipramina v vseh uporabljenih koncentracijah. Vrednosti IC_{50} za dezipramin ni bilo mogoče izračunati, ker učinek ne sledi krivulji odvisnosti učinka od koncentracije. Do maksimalnega učinka je prišlo že pri najnižji uporabljeni koncentraciji. Tako fluoksetin kot amitriptilin vpliva na privzem histamina nista imela, pri fluoksetinu je prišlo celo do povišanja privzema, kar je verjetno posledica poškodbe celic. Povsem drugačna pa je slika pri cerebelarnih astrocitih, kjer inhibicijskega učinka nismo opazili pri nobenem izmed uporabljenih antidepresivov.

Naši poskusi so sicer izvedeni na modelnem *in vitro* sistemu živalskega izvora, zato neposreden prenos rezultatov na človeka seveda ni možen. Vendar pa bi v primeru, da bi bila situacija pri človeku podobna in bi dezipramin vplival na inaktivacijo histamina v sinapsah striatuma morda lahko tako pojasnili del neželenih učinkov te antidepresivne učinkovine. Med redkejšo namreč sodijo tudi ohromelost okončin, nekoordinirani gibi, ataksija, tremor, ekstrapiramidni simptomi. Slednji bi bili lahko posledica povečanih koncentracij histamina v striatumu, do katerih pride zaradi inhibicije privzema histamina.

Dezipramin in amitriptilin sta strukturno zelo podobni spojini in spadata v skupino tricikličnih antidepressivnih učinkovin. Znano je, da se triciklični antidepressivi na serotoninski transporter vežejo na druga mesta kot SSRI, zaradi svoje neselektivnosti pa tudi na druga tarčna mesta. Amitriptilin je med uporabljenimi antidepressivnimi učinkovinami najbolj neselektivna učinkovina. Ker je dezipramin, ki je strukturno zelo podoben amitriptilinu, inhibiral privzem histamina v astrocitno kulturo striatuma, bi pričakovali, da bo podobno pri amitriptilinu. Zanimivo je, da temu ni tako. Rezultat bi lahko interpretirali predvsem tako, da pri privzemu histamina verjetno sodeluje specifičen še neodkrit transporter, ki ni ne NET in ne SERT. Ob tem pa je vredno omeniti, da so podobno situacijo zabeležili pri primerjavi lastnosti privzema histamina v kulture astrocitov neonatalnih in odraslih podgan (21), kjer je amitriptilin pri kulturi odraslih astrocitov prav tako izgubil inhibitorni učinek, ki ga je v neonatalni kulturi imel. Lahko torej sklepamo, da dozorijski transportni mehanizmi v striatumu veliko prej, kot v možganski skorji in cerebelumu in v isti starosti že imajo lastnosti transportnih mehanizmov odraslih astrocitov.

Vsekakor pa lahko predvidimo, da serotoninski transporter nima pomembnega vpliva na privzem ^3H -histamina v podganje astrocite.

Nakazan inhibicijski učinek dezipramina pri astrocitni kulturi striatuma je vodil v nadaljnje raziskave, saj smo poskusili razložiti mehanizem, preko katerega deluje. Histamin je eden izmed substratov za transporterje organskih kationov (vseh treh podtipov: OCT1, OCT2, OCT3) (23). Le-ti se med drugim izražajo tudi na membrani astrocitov (17). Iz literature je znano, da deluje dezipramin tudi kot inhibitor OCT1 (23). Deluje torej dezipramin inhibitorno na privzem histamina preko transporterjev organskih kationov?

Inhibicijska študija z dvema specifičnima inhibitorjema OCT, D22 in kortikosteronom, te trditve ni potrdila, saj omenjena inhibitorja nista imela učinka na privzem histamina v nobeni izmed preučevanih regij. Podobno so ugotovili tudi Perdan in sodelavci (50) v kulturi podganjih astrocitov možganske skorje.

Engel in sodelavci so poročali o odkritju novega monoaminskega transporterja PMAT – angl. *plasma membrane monoamine transporter* (54). Tako kot OCT3 sodi v skupino polispecifičnih nizkoafinitetnih transporterjev organskih kationov (55) in je prisoten v številnih regijah človeških možganov, tudi v cerebelumu in striatumu. Biogeni amini,

vklučno s histaminom, so sicer substrat tudi za ta transporter, vendar pa sta med inhibitorji PMAT tudi D22 in kortikosteron, ki vpliva na privzem histamina nista pokazala. Torej je tudi vpletenost tega transporterja v privzem histamina malo verjetna.

Zaključim naj z mislijo, da je histamin evolucijsko ohranjena majhna signalna molekula, ki kot neurotransmitter tesno sodeluje pri vseh osnovnih možganskih funkcijah, usklajuje vedenje na eni strani in bioritem na drugi, vegetativne funkcije in endokrini nadzor telesne mase ter temperature, hkrati pa deluje na vratih zavesti. Vedno več je podatkov, da igra pomembno vlogo pri signalnih poteh med hipotalamusom in malimi možgani ter tako sodeluje pri sensorimotorični integraciji in avtonomnih odzivih. Poleg tega se vpleta v nadzor drugih neurotransmiterjev v področju striatuma. V različnih regijah igra različno pomembne vloge, s čimer bi bile lahko verjetno povezane tudi znatne razlike v lastnostih privzema histamina v astrocite v različnih regijah. Glede na rezultate predstavljene v moji nalogi, so veliko bolj primerljivi transportni mehanizmi v astrocitih možganske skorje in malih možganov, kot pa tisti v striatumu. Bistvene razlike v afiniteti transportnih mehanizmov v posameznih regijah nakazujejo možnost, da ne samo, da je pri inaktivaciji histamina v centralnem živčevju pomemben še neodkrit transportni protein, ampak obstaja velika verjetnost, da je le teh celo več in da so različni v različnih možganskih regijah. Vsekakor bodo za razjasnitev tega problema potrebni nadaljnji poskusi, ki bodo pomembni tako zaradi pridobivanja novega znanja, kot tudi zaradi novih tarč za razvoj zdravil. Poznavanje transporterjev, ki so pomembni pri inaktivaciji neurotransmiterja s tako širokim spektrom delovanja, kot je histamin, bi nas namreč lahko v prihodnosti pripeljalo tudi do novih učinkovitih farmakoterapevtikov.

7. SKLEP

V raziskavi smo želeli ugotoviti, kako se razlikujejo lastnosti privzema ^3H -histamina v kulture astrocitov neonatalnih podgan, pripravljene iz različnih možganskih regij. Spremljali smo časovno in koncentracijsko odvisnost privzema histamina. Pri časovni odvisnosti smo spremljali privzem ^3H -histamina v različnih časovnih intervalih, pri koncentracijski odvisnosti pa smo merili privzem ^3H -histamina ob povečevanju koncentracije ^3H -histamina. Obakrat smo primarne celične kulture inkubirali z ^3H -histaminom. Izvedli pa smo tudi inhibicijsko študijo (uporabili smo različne antidepresivne učinkovine in nekatere znane inhibitorje OCT).

Potrdili smo dve in ovrgli eno od zastavljenih delovnih hipotez

- Astrociti obeh preiskovanih regij sodelujejo pri privzemu histamina. Vendar smo ugotovili, da obstajajo precejšnje razlike pri privzemu ^3H -histamina v kulture astrocitov, pripravljene iz različnih možganskih regij neonatalnih podgan. Transportni sistem striatuma ima veliko večjo kapacitivnost. Privzem histamina v astrocitne kulture striatuma poteka hitreje in z veliko večjo afiniteto kot v astrocitne kulture cerebeluma. Tudi delež nespecifičnega privzema striatuma je precej večji od deleža nespecifičnega privzema pri astrocitnih kulturah cerebeluma. Očitno ima histamin v striatumu pomembnejšo vlogo kot jo ima v cerebelumu in posledično je tudi transportni sistem, ki predstavlja eno od možnosti inaktivacije, bolj razvit.
- Predvidevali smo tudi, da bo privzem histamina v cerebelarne astrocitne kulture manjši v primerjavi s privzemom v kulture astrocitov, pripravljene iz striatuma. To hipotezo smo potrdili, saj je kapacitivnost transportnega sistema cerebeluma znatno manjša kot je le – ta v striatumu.
- Privzem histamina v astrocitne kulture poteka preko vsaj dveh mehanizmov. In sicer preko od natrijevih ionov odvisnega aktivnega transporta in od naboja ter koncentracije odvisnega pasivnega transporta (olajšane difuzije). Z izvedbo inhibicijskih študij smo ugotovili, da selektivni zaviralec ponovnega privzema serotonina fluoksetin ni vplival na privzem histamina v astrocitne kulture obeh preiskovanih regij. Dezipramin je statistično značilno inhibiral privzem histamina v astrocitne kulture striatuma, medtem ko pri astrocitnih kulturah cerebeluma ni vidnih učinkov. Amitriptilin na privzem histamina v kulture astrocitov ni imel bistvenega

vpliva, tako pri striatumu kot pri cerebelumu. Histamin se verjetno privzema preko svojega transporterja, ki do sedaj še ni identificiran in ne preko SERT niti preko NET. Tako decinij 22 kot kortikosteron (kot inhibitorja OCT) nista vplivala na privzem histamina. Zato lahko z veliko verjetnostjo trdimo, da privzem histamina ne poteka preko transporterjev organskih kationov. In s tem zavrnemo našo zadnjo postavljeno hipotezo.

8. VIRI IN LITERATURA

1. <http://www.sinapsa.org/TM/poljudno.php?id=9>
2. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Možgani>
3. Kirsch Thomas D, Lipinski Christopher A, "Chapter 255. Head Injury" (Chapter). Tintinalli JE, Kelen GD, Stapczynski JS, Ma OJ, Cline DM: Tintinalli's Emergency Medicine: A Comprehensive Study Guide, 6e: <http://www.accessmedicine.com/content.aspx?aID=610258>
4. http://sl.wikipedia.org/wiki/Mali_možgani
5. Waxman SG, "Chapter 7. The Brain Stem and Cerebellum" (Chapter). Waxman SG: Clinical Neuroanatomy, 26e: <http://www.accessmedicine.com/content.aspx?aID=5272329>.
6. <http://www.colorado.edu/intphys/Class/IPHY3730/image/cerebellum.jpg>, dostop: 29.5.2010
7. Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks H, "Chapter 16. Control of Posture & Movement" (Chapter). Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks H: Ganong's Review of Medical Physiology, 23e: <http://www.accessmedicine.com/content.aspx?aID=5240856>.
8. <http://en.wikipedia.org/wiki/Cerebellum>
9. Zhu JN, Yung WH, Kwok-Chong Chow B, Chan YS, Wang JJ: The cerebellar-hypothalamic circuits: potential pathways underlying cerebellar involvement in somatic-visceral integration. *Brain Res Rev.* 2006; 52: 93-106
10. Takemura M, Kitanaka N, Kitanaka J: Signal transduction by histamine in the cerebellum and its modulation by N-methyltransferase. *Cerebellum* 2003; 2: 39–43
11. <http://www.neuroskills.com/tbi/bcerebel.shtml>
12. <http://brainmind.com/images/basalgangliadetail.gif>, dostop: 29.5.2010
13. Živin M. Parkinsonova bolezen. In: Ribarič S, ed. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 9. izdaja. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani; 2003: 324–34
14. Koeppen BM., Stanton BA: Berne and Levy Physiology, 6th edition, Philadelphia, Elsevier Limited: 2008, 157-192 str
15. Rinne JO, Anichtchik OV, Eriksson KS, Kaslin J, Tuomisto L, Kalimo H, Røyttä M, Panula P: Increased brain histamine levels in Parkinson's disease but not in multiple system atrophy. *J Neurochem.* 2002; 81: 954-60.

16. Nowak P, Noras L, Jochem J, Szkilnik R, Brus H, Körossy E, Drab J, Kostrzewa RM, Brus R: Histaminergic activity in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurotox Res.* 2009; 15: 246-51.
17. Lee G, Dallas S, Hong M, Bendayan R: Drug transporters in the central nervous System: Brain Barriers and Brain Parenchyma Consideration. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 569-596
18. Kržan M. Funkcija Astrocitov. *Zdravniški vestnik*, 2001: 70: 553-9
19. Kandel ER., Schwartz JH., Jessel TM: *Principles of Neural Science*. 4th edition. New York, McGraw-Hill: 2000: 280-286; 894-895, 1210-26 str
20. Rang HP., Dale MM., Ritter JM., Flower RJ: *Rand and Dale's Pharmacology*, 6th edition, Philadelphia, Elsevier Limited: 2007: 829 str
21. Papler T., Pečavar B., 2007: Vpliv antidepressivnih zdravil na privzem histamina v astrocite. Študentsko raziskovalno delo, Medicinska fakulteta
22. Perdan-Pirkmajer K, Mavri J, Krzan M: Histamine (re)uptake by astrocytes: an experimental and computational study. *J Mol Model* 2010; 16: 1151-8.
23. Koepsell H, Lips K and Volk C: Polyspecific Organic Cation Transporters: Structure, Function, Physiological Roles, and Biopharmaceutical Implications. *Pharmaceutical Research* 2007; 24 (7): 1227-51.
24. Koepsell H: Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs. *Trends in Pharmacological Sciences* 2004; 25 (7): 375-81.
25. Amphoux A, Vialou V, Drescher E, Brüss M, Mannoury La Cour C, Rochat C, Millan MJ, Giros B, Bönisch H, Gautron S: Differential pharmacological in vitro properties of organic cation transporters and regional distribution in rat brain. *Neuropharmacology* 2006; 50: 941-952.
26. Vialou V, Amphoux A, Zwart R, Giros B, Gautron S: Organic cation transporter 3 (Slc22a3) is implicated in salt intake regulation. *J Neurosci* 2004; 24:2846-2851.
27. Vialou V, Balasse L, Callebert J, Launay JM, Giros B, Gautron S: Altered aminergic neurotransmission in the brain of organic cation transporter 3-deficient mice. *J Neurochem* 2008; 106:1471-1482.
28. <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/RenderImage?maxscale=30&width=200&height=200&superlistid=0020766498>

29. Hayer-Zillgen M, Brüß M, Bönisch H: Expression and pharmacological profile of human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. *British Journal of Pharmacology* 2002; 136: 829-36.
30. Dale HH, Laidlaw PP: The physiological action of beta-iminazolyethylamine. *J Physiol.* 1910; 41(5): 318-44.
31. Foye WO: Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008: 1004-9
32. http://en.wikipedia.org/wiki/Histamine#Storage_and_release
33. Brown RE., Stevens DR., Haas HL: The Physiology of Brain Histamine. *Progress in Neurobiology*, 2001; 63: 637-672
34. Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O: Histamine in the nervous system. *Physiological Reviews* 2008 Jul; 88(3): 1183-241.
35. Panula P, Yang HY, Costa E: Histamine containing neurons in the rat hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 2572-6.
36. Tang B, Zhang J, Yu L, Li HZ, Zhu JN, Wang JJ: Excitation of histamine on neuronal activity of cerebellar fastigial nucleus in rat. *Inflammation Research* 2008; 57: 41-2.
37. Song YN, Li HZ, Zhu JN, Guo CL, Wang JJ: Histamine improves rat rota-rod and balance beam performances through H(2) receptors in the cerebellar interpositus nucleus. *Neuroscience*. 2006; 140(1): 33-43
38. Li WC, Tang XH, Li HZ, Wang JJ: Histamine excites rat cerebellar granule cells in vitro through H1 and H2 receptors. *J Physiol Paris*. 1999; 93(3): 239-44.
39. Nguyen T, Shapiro DA, George SR, Setola V, Lee DK, Cheng R, Rauser L, Lee SP, Lynch KR, Roth BL, O'Dowd BF: Discovery of novel member of the histamine receptor family. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 427-33
40. Strakhova MI, Nikkel AL, Manelli AM, Hsieh GC, Esbenshade TA, Brioni JD, Bitner RS: Localization of histamine H4 receptors in the central nervous system of human and rat. *Brain Res.* 2009; 1250: 41-8
41. Passani MB, Giannoni P, Bucherelli C, Baldi E, Blandina P: Histamine in the brain: Beyond sleep and memory. *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 1113-1122.
42. Fernández-Novoa L, Cacabelos R: Histamine function in brain disorders. *Behavioural Brain Research* 2001; 124: 213-233.

43. Sakurai E, Sakurai E, Orelan L, Nishiyama S, Kato M, Watanabe T, Yanai K:
Evidence for the presence of histamine uptake into the synaptosomes of rat brain.
Pharmacology 2006; 78: 72-80.
44. Maintz L, Novak N: Histamine and histamine intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007; 85:
1185-96.
45. Huszti Z: Histamine uptake into non-neuronal brain cells. *Inflamm Res* 2003; 52:3-6.
46. Kržan M., Schwartz JP: Histamine Transport in Neonatal and Adult Astrocytes.
Inflammation Research, 2006; 55 Suppl : S36-7
47. Huszti Z, Rimanoczy A, Juhasz A, Magyar K: Uptake, metabolism and release of
³[H]-histamine by glial cells in primary cultures of chicken cerebral hemispheres. *Glia*
1990; 3: 159-168.
48. Huszti Z, Prast H, Tran MH, Fischer H, Philippu A: Glial cells participate in histamine
inactivation in vivo. *Naunyn-Schmied Arch Pharm* 1998; 357: 49-53.
49. Osredkar D, Burnik-Papler T, Pečavar B, Kralj-Iglič V, Kržan M: Kinetic and
pharmacological properties of ³[H] –histamine transport into cultured type 1 astrocytes
from neonatal rats. *Inflamm Res* 2009; 58: 94-102.
50. Perdan K, Kobe Z, Krzan M: Nature of histamine transport in neonatal rat cultured
type 1 astrocytes-organic cation transporters are not involved. *Inflamm Res.* 2009; 58
Suppl 1: 32-3.
51. Schwartz JP, Wilson DJ: Preparation and characterisation of type 1 astrocytes cultured
from adult rat cortex, cerebellum, and striatum. *Glia* 1992; 5:75-80.
52. Oishi R, Nishibori M, Saeki K: Regional differences in the turnover of neuronal
histamine in the rat brain. *Life Sci.* 1984; 34(7) :691-9.
53. Kimelberg HK, Katz DM: Regional differences in 5-hydroxytryptamine and
catecholamine uptake in primary astrocyte cultures. *J Neurochem.* 1986; 47(5): 1647-52.
54. Engel K, Zhou M, Wang J: Identification and characterization of a novel monoamine
transporter in the human brain. *J Biol Chem.* 2004; 279(48): 50042-9.
55. Engel K, Wang J: Interaction of Organic Cations with a Newly Identified Plasma
Membrane Monoamine Transporter. *Mol Pharmacol.* 2005; 68(5): 1397-407.

