

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ESTERA FIJAN

**VPLIV DEUTERIRANE VODE NA VEZAVO AGONISTOV NA
HISTAMINSKI RECEPTOR H₂**

**THE INFLUENCE OF DEUTERIUM OXIDE ON AGONIST
BINDING TO HISTAMINE H₂ RECEPTOR SUBTYPE**

Ljubljana, 2011

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

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mojci Kržan za vso vzpodbudo, nasvete, pomoč, strokovno vodstvo, temeljit pregled diplomske naloge, prijateljstvo in vse nepozabne trenutke.

Zahvala gre tudi somentorju doc. dr. Janezu Mavriju za strokovno pomoč, razlago in pregled diplomske naloge.

Posebej se zahvaljujem tehnični sodelavki Jožici Košir za pomoč in napotke pri izvajanju eksperimentalnega dela, prijaznost in prijetno kramljanje v laboratoriju.

Hvala vsem prijateljem, sošolcem, ki so mi kakorkoli stali ob strani in popestrili nepozabna študentska leta.

Hvala Marti za temeljito lektoriranje diplomske naloge.

Zahvaljujem se svojim staršem, ki so mi omogočili študij, me ves čas podpirali in stali ob strani, ter sestram za vso vzpodbudo, pomoč in prijateljstvo.

Posebej bi se zahvalila Tomažu za vso podporo in strokovne nasvete tekom študija, pomoč pri diplomski nalogi ter za iskreno zaupanje vame.

Izjava

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

Estera Fijan

KAZALO VSEBINE

POVZETEK.....	VI
ABSTRACT	VII
ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD	1
1.1. LIGANDI	1
1.1.1. HISTAMIN.....	2
1.2. RECEPTORJI	6
1.2.1 HISTAMINSKI RECEPTORJI	8
1.3. INTERAKCIJA RECEPTOR - AGONIST	10
1.4. KEMIJSKE VEZI	12
1.4.1. KOVALENTNA VEZ.....	12
1.4.2. IONSKA VEZ.....	13
1.4.3. HIDROFOBNE INTERAKCIJE	13
1.4.4. VODIKOVA VEZ IN DEVTERACIJA	13
1.5. ASTROCITI.....	15
2. NAMEN DELA	17
3. MATERIALI IN METODE	18
3.1. MATERIALI.....	18
3.1.1. RAZTOPINE.....	19
3.2. METODE	20
3.2.1. POSKUSNE ŽIVALI.....	20
3.2.2. PRIPRAVA PRIMARNIH KULTUR ASTROCITOV	20
3.2.3. DOLOČITEV KONCENTRACIJE PROTEINOV.....	21
3.2.4. VEZAVA ³ H-TIOTIDINA NA RECEPTORJE H ₂ V ASTROCITIH	22
3.2.5. RAČUNANJE PARAMETROV VEZAVNIH ŠTUDIJ.....	24
4. REZULTATI.....	27
4.1. SATURACIJSKA VEZAVA ³ H-TIOTIDINA V FOSFATNEM PUFRU	27
4.2. SATURACIJSKA VEZAVA ³ H-TIOTIDINA V DEVTERIRANEM OKOLJU	29
4.3. INHIBICIJA SPECIFIČNE VEZAVE ³ H-TIOTIDINA V FOSFATNEM PUFRU	32
4.4. INHIBICIJA SPECIFIČNE VEZAVE ³ H-TIOTIDINA V DEVTERIRANEM OKOLJU.....	35
5. RAZPRAVA.....	42
6. SKLEP	47
7. LITERATURA	49

KAZALO SLIK

Slika 1: Molekula histamina	2
Slika 2: Tautomerni obliki histamina.....	3
Slika 3: Biosinteza histamina.....	3
Slika 4: Presnova histamina, kot poteka pri sesalcih	4
Slika 5: Histaminergični sistem v človeškem osrednjem živčnem sistemu.....	5
Slika 6: Struktura GPCR.....	7
Slika 7: Shematska ponazoritev strukture in vezavnega mesta za histaminski receptor H_2	9
Slika 8: Saturacijska vezava	11
Slika 9: Ubbelohdejev efekt.....	14
Slika 10: Astrocita vzgojena iz korteksa neonatalnih podgan v primarni kulturi, označena s protitelesi proti GFAP (za astrocite značilen protein).	15
Slika 11: Saturacijska krivulja celokupne, nespecifične in specifične vezave 3H -tiotidina na histaminski receptor H_2 na astrocitih kot funkcija koncentracije radioliganda (0,15 M fosfatni pufer, pH=7,4)	28
Slika 12: Saturacijska krivulja celokupna nespecifične in specifične vezave 3H -tiotidina na histaminski receptor H_2 na astrocitih kot funkcija koncentracije radioliganda (0,15 M fosfatni pufer v devterirani vodi, pH=7,4).....	30
Slika 13: Primerjava specifične vezave 3H -tiotidina na histaminski receptor H_2 na astrocitih kot funkcija koncentracije radioliganda v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H_2O) in v fosfatnem pufru v devterirani vodi (D_2O)	31
Slika 14: Molekula 2-metilhistamina.....	33
Slika 15: Molekula 4-metilhistamina.....	33
Slika 16: Molekula impromidina	33
Slika 17: Molekula histamina	33
Slika 18: Krivulja inhibicije specifične vezave 3H -tiotidina na histaminski receptor H_2 v astrocitih kot funkcija različnih ligandov: 2-metilhistamin, 4-metilhistamin, histamin in impromidin (0,15 M fosfatni pufer, pH=7,4)	34

Slika 19: Krivulja inhibicije specifične vezave ^3H -tiotidina na histaminski receptor H_2 v astrocitih kot funkcija različnih ligandov: 2-metilhistamin, 4-metilhistamin, histamin in impromidin (0,15 M fosfatni pufer v devterirani vodi, $\text{pH}=7,4$).....	36
Slika 20: Primerjava inhibicije specifične vezave ^3H -tiotidina na histaminski receptor H_2 na astrocitih kot funkcija logaritma različnih koncentracij 2-metilhistamina v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H_2O) in v fosfatnem pufru v devterirani vodi (D_2O).....	37
Slika 21: Primerjava inhibicije specifične vezave ^3H -tiotidina na histaminski receptor H_2 na astrocitih kot funkcija logaritma različnih koncentracij 4-metilhistamina v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H_2O) in v fosfatnem pufru v devterirani vodi (D_2O).....	38
Slika 22: Primerjava inhibicije specifične vezave ^3H -tiotidina na histaminski receptor H_2 na astrocitih kot funkcija logaritma različnih koncentracij histamina v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H_2O) in v fosfatnem pufru v devterirani vodi (D_2O)	39
Slika 23: Primerjava inhibicije specifične vezave ^3H -tiotidina na histaminski receptor H_2 na astrocitih kot funkcija logaritma različnih koncentracij impromidina v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H_2O) in v fosfatnem pufru v devterirani vodi (D_2O)	40

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Nahajanje in učinki posameznih tipov histaminskih receptorjev	8
Preglednica II: Glavne funkcije astrocitov v različnih življenjskih obdobjih	16
Preglednica III: Sestava preparacijske raztopine.....	19
Preglednica IV: Sestava hranilnega medija	19
Preglednica V: Sestava 0,5 M Na^+/K^+ fosfatnega pufru	19
Preglednica VI: Sestava raztopine za razredčevanje ^3H -tiotidina	19
Preglednica VII: Časovni prikaz poteka vezavnega poskusa	23
Preglednica VIII: Primerjava vrednosti K_D [nmol/L] in $B_{\max}$ [fmol/mg proteina] specifične vezave ^3H -tiotidina na histaminski receptor H_2 v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H_2O) in v fosfatnem pufru v devterirani vodi (D_2O)	31
Preglednica IX: Primerjava vrednosti pIC_{50} za inhibitorje specifične vezave ^3H -tiotidina na histaminski receptor H_2 v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi in v fosfatnem pufru v devterirani vodi.....	41
Preglednica X: Primerjava vrednosti K_i [nM] za inhibitorje specifične vezave ^3H -tiotidina na histaminski receptor H_2 v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi in v fosfatnem pufru v devterirani vodi.....	41

POVZETEK

Histamin je pomemben endogeni mediator, saj je prisoten v večini rastlinskih in živalskih tkiv. Izven osrednjega živčevja deluje kot lokalni hormon, v osrednjem živčevju ima vlogo nevrottransmitterja. Svoje učinke posreduje preko aktivacije histaminskih receptorjev: H_1 , H_2 , H_3 in H_4 . To so metabotropni receptorji, ki za prenos informacije v celico potrebujejo sklopitev s proteinom G.

Histaminski receptor H_2 smo uporabili kot modelni sistem, ker ima poznano primarno strukturo. Vsebuje sedem hidrofobnih transmembranskih področij. Aminokislinski preostanki na tretjem in petem transmembranskem področju sodelujejo pri vezavi endogenega histamina na ta podtip receptorja. Ključno vlogo pri tej vezavi naj bi imele vodikove vezi. Če zamenjamo vodikove atome, ki so udeleženi pri vezavi ligandov, z atomi devterija, pride do sprememb intermolekularnih in intramolekularnih razdalj. To vodi do strukturnih sprememb vezavnih mest na receptorju in ligandov ter se odraža v spremenjenih vezavnih parametrih histaminskega receptorja H_2 .

V diplomskem delu smo želeli opredeliti vezavna receptorska mesta na histaminskem receptorju H_2 na astrocitih neonatalnih podgan, vzgojenih v primarni kulturi in pokazati ključno vlogo vodikove vezi pri interakciji ligandov na ta podtip receptorja.

Uporabili smo metode vezavnih študij, kjer smo z uporabo radioliganda 3H -tiotidina dokazali prisotnost histaminskih receptorjev H_2 na astrocitih neonatalnih podgan, vzgojenih v primarni kulturi, z maksimalno gostoto vezavnih mest $21,95 \pm 3,2$ fmol/mg proteina in ravnotežno disociacijsko konstanto $6,3 \pm 1,9$ nM. V devteriranem okolju je maksimalna gostota vezavnih mest za 3H -tiotidin znašala $17,42 \pm 5,2$ fmol/mg proteina, vendar razlika ni statistično značilna. Spremenile so se afinitete inhibitorjev (4-metilhistamin, histamin, impromidin in 2-metilhistamin) do izpodrivanja specifično vezanega 3H -tiotidina. Do statistično značilnih razlik je prišlo samo pri izpodrivanju vezanega 3H -tiotidina z 2-metilhistaminom in impromidinom.

Sklenemo lahko, da vodikova vez igra pomembno vlogo pri vezavi histamina in agonistov na histaminski receptor H_2 na astrocitih neonatalnih podgan. Devterirana voda vpliva na vezavo agonistov na histaminski receptor H_2 , saj povzroči spremembo razdalje in jakosti vodikovih vezi, kar vpliva na vezavne lastnosti histaminskega receptorja H_2 .

Ključne besede: histamin, histaminski receptor H_2 , vodikova vez, devterirana voda.

ABSTRACT

Histamine is an ubiquitous molecule and important endogenous mediator. It acts as a local hormone, whereas in the central nervous system histamine plays a role of a neurotransmitter. Its effects are mediated by activation of histamine H₁, H₂, H₃ and H₄ receptors. They all belong to class II of pharmacological receptors, G-protein coupled receptors.

Histamine H₂ receptor was used as a study model. Histamine H₂ receptors consist of seven transmembrane domains. Amino acid residues on the third and the fifth transmembrane domain are involved in binding of endogenous histamine to this receptor subtype. Hydrogen bonds are supposed to have crucial role in this interaction. If hydrogen atoms are replaced with deuterium ones, the intermolecular and intramolecular distances would change, thus leading to structural changes of binding sites on receptor and ligands. Final results would be modification of binding parameters of histamine H₂ receptor.

In the present study, we wanted to define binding sites on histamine H₂ receptor subtype on cortical astrocytes in a primary culture, and to demonstrate the importance of the hydrogen bond in ligand-receptor interactions.

Using ³H-tiotidine as a radioligand, we determined the presence of histamine H₂ receptor subtype on newborn rat cortical astrocytes in primary culture, with maximal binding capacity at $21,95 \pm 3,2$ fmol/mg protein and a dissociation constant $6,3 \pm 1,9$ nM. In the deuterium milieu maximal binding capacity was $17,42 \pm 5,2$ fmol/mg protein, but the differences were not statistically significant. 4-methylhistamine, histamine, impromidine and 2-methylhistamine were all able to displace specifically bound ³H-tiotidine in control and deuterium containing buffer. The presence of heavy water affect only affinities of 2-methylhistamine and impromidine towards ³H-tiotidin labelled histamine H₂ receptors.

We can conclude that hydrogen bond is crucial for the binding of histamine and its analogues to histamine H₂ receptor on newborn rat cortical astrocytes in a primary culture. The addition of deuterium oxide changes the distance and the strength of hydrogen bonds, which affects the binding characteristics of histamine H₂ receptor and therefore has an influence on the binding of agonists to histamine H₂ receptor.

Key words: histamine, histamine H₂ receptor subtype, hydrogen bond, deuterium oxide.

ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV

AC	adenilat-ciklaza
B _{max}	maksimalno število specifičnih vezavnih mest
cAMP	ciklični adenzin-3', 5'-monofosfat
CO ₂	ogljikov dioksid
CPM	število zaznav radioaktivnih razpadov na minuto (counts per minute)
DAO	diamino-oksidaža
DMEM	po Dulbeccu spremenjen Eaglov medij (Dulbecco's modified Eagle medium)
DPM	število radioaktivnih razpadov na minuto (decay per minute)
D ₂ O	devterirana voda
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
GDP	gvanozin-5'-difosfat
GFAP	glialna fibrilarna kislina beljakovina
GPCR	receptorji sklopljeni s proteinom G (G-protein coupled receptors)
G _s	stimulatorni gvanin-nukleotid vezavni protein
GTP	gvanozin-5'-trifosfat
HDC	histidin-dekarboksilaza
HNMT	histamin-N-metiltransferaza
IC ₅₀	molarna koncentracija hladnega liganda, ki povzroči 50 % inhibicijo specifične vezave radioliganda
K _D	ravnotežna konstanta disociacije kompleksa receptor – radioligand
K _i	ravnotežna konstanta disociacije kompleksa receptor – inhibitor
MAO-B	monoamin-oksidaža B
NGF	živčni rastni dejavnik
NF-3	nevrotrofični dejavnik 3
OŽS	osrednji živčni sistem
PBS	fosfatni pufer (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
PKA	protein-kinaza A
PLP	piridoksal-5'-fosfat

1. UVOD

1.1. LIGANDI

Če želimo, da bo neko zdravilo – ligand uporabno kot terapevtsko ali raziskovalno orodje, mora delovati selektivno na določene celice ali tkiva. Izkazovati mora visoko stopnjo specifičnosti za željeno vezavno mesto. Po drugi strani pa proteini, ki so tarče zdravil, na splošno izkazujejo visoko stopnjo specifičnosti do določenih ligandov in prepoznajo samo ligande s točno določeno molekulsko strukturo. Komplementarna specifičnost liganda in vezavnega mesta omogoča proteinom možnost zelo natančnega molekularnega prepoznavanja in povezovanja, kar je ključno pri razlagi mnogih fenomenov v farmakologiji. Vendar je treba poudariti, da nobeno zdravilo ne deluje popolnoma specifično na tarčno mesto (1).

Agonist je ligand, ki se veže na vezavno mesto na receptorju tako, da ga aktivira in s tem sproži učinek v tarčni celici. Polni agonisti lahko povzročijo maksimalen učinek, medtem ko delni agonisti kljub 100 % zasedenosti receptorjev ne povzročijo maksimalnega učinka. Afiniteta liganda je sposobnost liganda, da se veže na določen receptor, zmožnost liganda, da aktivira receptor in izzove učinek, pa opredelimo kot učinkovitost liganda. Dober agonist ima visoko afiniteto in učinkovitost pri nizki koncentraciji (1). Agonisti se lahko vežejo na isto vezavno mesto kot endogeni mediator, to vezavno mesto imenujemo primarno ali ortosterično. Manj pogosto pa pride do vezave agonista na drugo mesto na makromolekuli receptorja. V tem primeru gre za alosterično ali alotopično vezavno mesto in ligandi, ki se vežejo na to mesto, so alosterični agonisti (2).

Antagonist se veže na vezavno mesto na receptorju, vendar vezava ne aktivira receptorja in ne privede do učinka. Običajno imajo večjo afiniteto kot agonisti, vendar imajo nizko ali nično učinkovitost (1).

Receptorska teorija modela dveh stanj opisuje receptor v dveh oblikah, aktivna oblika (R*) in neaktivna oblika (R), ki sta ves čas v ravnotežju in lahko prehajata druga v drugo. Po tej teoriji imajo agonisti večjo afiniteto do R* in pomaknejo ravnotežje v smer R*. Večja kot je afiniteta agonista do R*, večja je tudi učinkovitost agonista. Inverzni agonist ima večjo

afiniteto do R kot do R^* , zato pomakne ravnotežje proti R. Medtem ko antagonist nima večje afinitete do posamezne oblike in ne vpliva na premik ravnotežja, ampak samo prepreči vezavo agonistu (1).

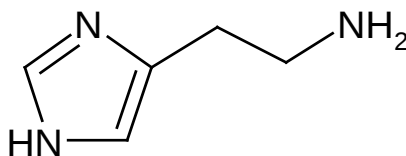
1.1.1. HISTAMIN

Fiziološko funkcijo histamina je odkril britanski fiziolog Sir Henry Dale leta 1910. Še preden je bila znana fiziološka vloga histamina, je bila sintetizirana molekula histamina.

Njegovo ime »histos« v grščini pomeni tkivo. Prisotnost histamina v večini telesnih tkiv potrjuje, da je zelo pomemben endogeni mediator. Na celičnem nivoju je največ histamina shranjenega v zrnih mastocitov, ki so prisotni v koži, prebavilih in sluznici dihal. V želodcu se histamin nahaja v enterokromafinim celicam podobnih celicah. V krvi ga najdemo predvsem v bazofilnih granulocitih. V možganih je histamin prisoten v precej nižjih koncentracijah kot v drugih tkivih (1, 3, 4, 10).

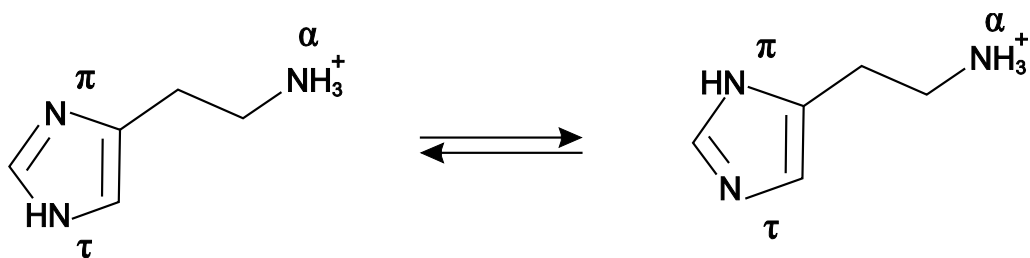
Histamin ima pomembno vlogo pri vnetnih procesih, alergičnih reakcijah, stimulira izločanje želodčne kisline, povzroča kontrakcijo gladkih mišic v bronhijih, tankem črevesju in vranici, poveča frekvenco in moč delovanja srca. Zunaj osrednjega živčevja deluje kot lokalni hormon, v osrednjem živčevju deluje kot nevrottransmitter (4).

Kemijsko ime za histamin je 2-(1*H*-imidazol-4-il) etilamin (slika 1).



Slika 1: Molekula histamina.

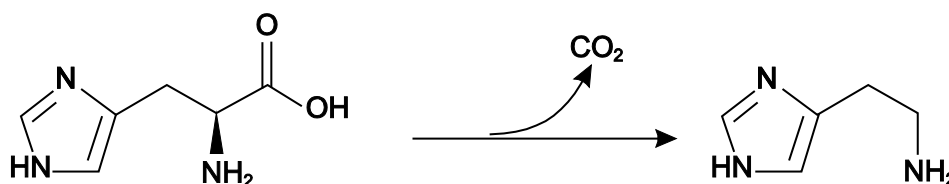
Molekula histamina ima tako kot mnogi drugi aaminski nevrottransmitterji (npr. noradrenalin, serotonin, dopamin) etilaminski del, posebne kemijske lastnosti, kot npr. tautomerizem, pa pripisujemo imidazolnemu delu molekule histamina. Histamin obstaja v dveh tautomernih oblikah, N^1 -H in N^3 -H (slika 2). V molekuli sta prisotna dva bazična centra. Pri fiziološkem pH se histamin nahaja v zmesi obeh tautomernih oblik, ki sta v obliki monokationov (96 %), le majhen delež pa v obliki dikationa (3 %) (5–7).



Slika 2: Tavtomerni obliki histamina. Histamin obstaja v dveh tautomernih oblikah N¹-H in N³-H, ki sta pri fiziološkem pH v obliki monokationov (96 %) (prirejeno po 5).

Biosinteza in presnova histamina

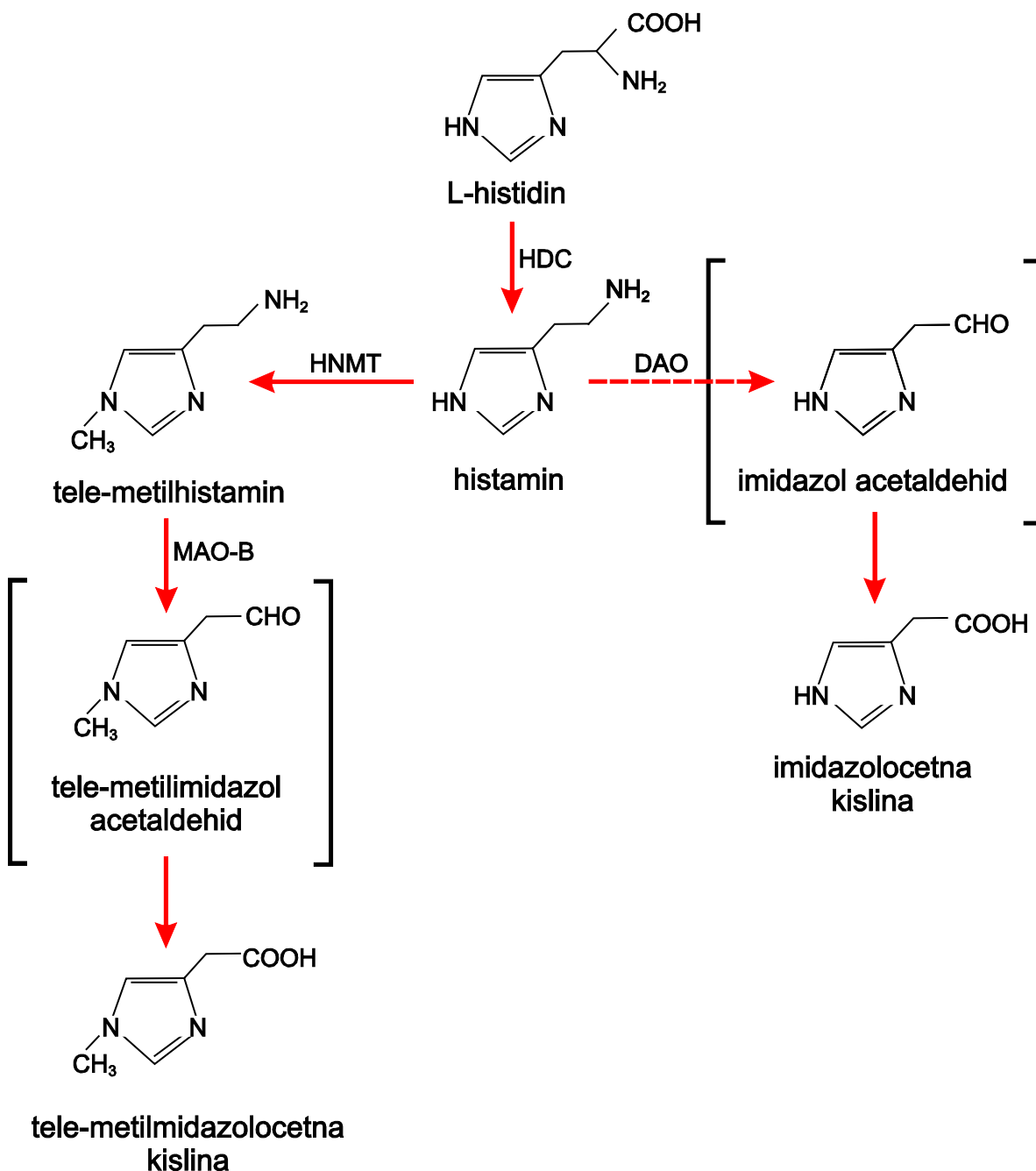
Histamin se sintetizira iz aminokisline L-histidin pod katalitičnim vplivom encima histidin-dekarboksilaze (HDC), kot kofaktor pri reakciji dekarboksilacije je potreben piridoksal-5'-fosfat (PLP) (slika 3).



Slika 3: Biosinteza histamina. Dekarboksilacija histidina v histamin poteka pod vplivom histidin-dekarboksilaze (HDC), kot kofaktor deluje piridoksal-5'-fosfat (PLP), pri reakciji nastaja stranski produkt CO₂.

Presnova histamina poteka po dveh glavnih encimskih poteh: N-metilacija in oksidativna deaminacija. Histamin v možganih se metabolizira samo z N-metilacijo. Reakcijo metilacije katalizira encim histamin-N-metiltransferaza (HNMT). Donor metilne skupine je S-adenozil-L-metionin. N-metilacija histamina lahko poteče na dušiku, ki je na stranski verigi, nastane α -metilhistamin ali dimetilhistamin. Če poteče N-metilacija na dušiku na mestu 1 (tele-mestu), nastane tele-metilhistamin (1-metilhistamin). Tele-metilhistamin oz. 1-metilhistamin, ki nastane, je vmesni produkt, ki se delno izloči z urinom. V naslednji stopnji se tele-metilhistamin oksidira v metilimidazolocetno kislino, ki se nato izloči z urinom. Reakcijo katalizirata encima monoamin-oksidaza B (MAO-B) ali diamino-oksidaza (DAO).

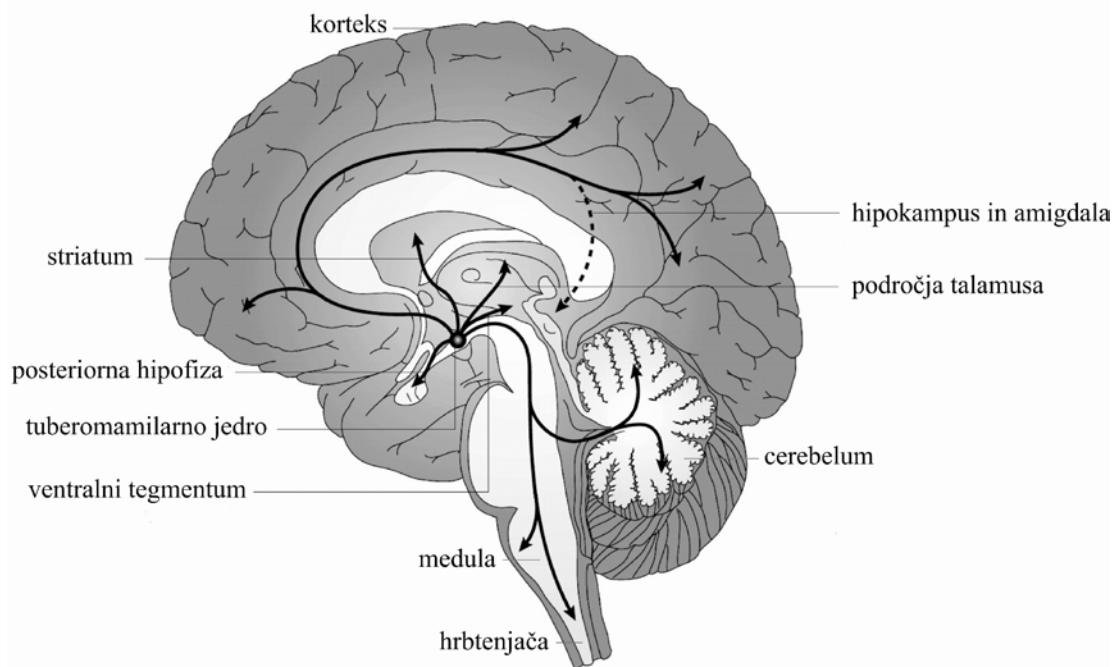
Po drugi encimski poti, oksidativne deaminacije primarne amino skupine histamina z molekularnim kisikom, nastane aldehyd in nato imidazolocetna kislina. Reakcijo katalizira diamino-oksidaza (DAO). Imidazol-ocetna kislina se v naslednji stopnji presnove konjugira z ribozo in se kot 1-ribozil-imidazol-4-ocetna kislina zaradi večje hidrofilnosti kot sama imidazolocetna kislina izloči z urinom (slika 4) (8–10).



Slika 4: Presnova histamina, kot poteka pri sesalcih.

Histamin v OŽS

Histamin v osrednjem živčnem sistemu (OŽS) deluje kot nevrottransmitter. V možganih je prisoten v nevronih in v mastocitih. Vloga mastocitov v OŽS je še nepoznana. Histaminergični nevroni se nahajajo v področju tuberomamilarnega jedra v posteriornem delu hipotalamusa. Histaminergični aksoni so široko razvejani in oživčujejo skoraj celotne možgane in del možganskega debla (slika 5). Histaminergični sistem je morfološko podoben drugim živčnim sistemom, kot sta noradrenergični in serotoninški. Študije so pokazale, da ima histamin pomembno vlogo pri uravnavanju ciklusa spanje-budnost, saj uničenje histaminergičnih nevronov v posteriornem delu hipotalamusu podaljša spanje. Prispeva k regulaciji cirkadianega ritma. Udeležen je pri kognitivnih procesih, kot sta učenje in pomnjenje. Vpliva še na termoregulacijo, regulacijo hranjenja in sekrecijo hormonov (npr. oreksina). Histaminergični sistem je verjetno udeležen pri etiopatogenezi nevroloških bolezni – Alzheimerjevi in Parkinsonovi bolezni, Tourettovem sindromu (9, 11, 12).



Slika 5: Histaminergični sistem v človeškem osrednjem živčnem sistemu (prirejeno po 12).

1.2. RECEPTORJI

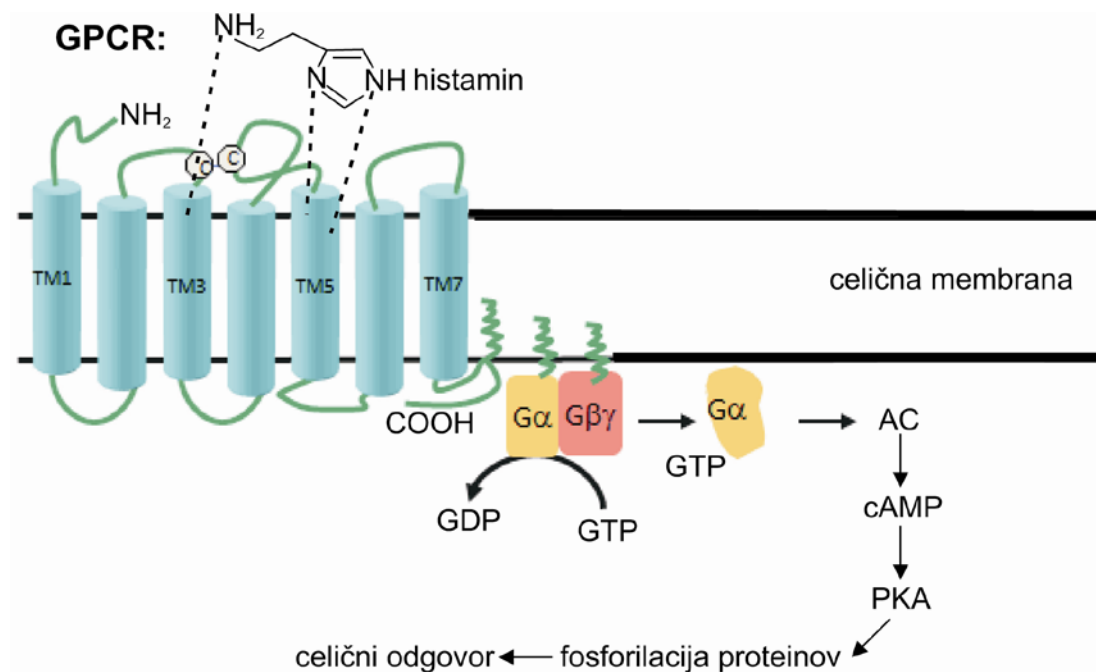
John Newport Langley, eden od pionirskih raziskovalcev na področju farmakologije, je receptorje opisal kot »stikala«, ki lahko sprejemajo in sprožajo dražljaje. Na »stikala« pa delujejo specifične molekule, ki jih aktivirajo ali blokirajo (13). Proteinske molekule, ki so tarče delovanja številnih zdravil, imenujemo receptorji za zdravila. Med tarče delovanja zdravil spadajo: receptorji za endogene prenašalce (farmakološki receptorji), ionski kanali, encimi in transportni sistemi. Na podlagi molekularne strukture in mehanizma prenosa delimo farmakološke receptorje na štiri razrede: ionski kanali (ionotropni receptorji), receptorji sklopljeni s proteinom G (metabotropni receptorji), receptorji vezani na kinaze in jedrni receptorji (1).

Razred I.: Ionski kanali so membranski proteini, ki imajo vključeno vezavno mesto za ligande. Na te receptorje se običajno vežejo hitro delujoči nevrotransmiterji (primer predstavlja nikotinski acetilholinski receptor) (1).

Razred II.: Receptorji sklopljeni s proteinom G (GPCR) predstavljajo najbolj bogato družino receptorjev, ki se nahajajo na celični membrani. Sestavljeni so iz enojne polipeptidne verige. Strukturne značilnosti GPCR obsegajo sedem transmembranskih heliksov alfa z zunajcelično N-končno domeno in znotrajcelično C-končno domeno. Tretja znotrajcelična zanka predstavlja področje na molekuli, kjer je receptor sklopljen s proteinom G. Ta je membranski protein, sestavljen iz treh podenot, alfa, beta in gama (α , β , in γ), ki so zasidrane na membrano preko verige maščobnih kislin. Podenota α ima GTP-azno aktivnost, kar pomeni, da izmenja vezani GDP (gvanozin-5'-difosfat) za GTP (gvanozin-5'-trifosfat), kar povzroči razpad trimernega proteina na kompleks $\beta\gamma$ in podenoto α . Obstajajo štirje razredi proteinov G, ki so farmakološko pomembni in se razlikujejo glede na podenoto α (G_s , G_i , G_o in G_q). Histaminski receptorji so sklopljeni z različnimi razredi proteinov G: receptorji H_1 so sklopljeni s G_q , receptorji H_2 s G_s , receptorji H_3 naj bi bili sklopljeni s proteinom G_i (1, 14).

Primer GPCR je histaminski receptor H_2 . Pri vezavi agonistov na histaminski receptor H_2 pride do konformacijske spremembe receptorja, to pa omogoči sklopitev s stimulatornim gvanin-nukleotid vezavnim proteinom (G_s -proteinom). Ko pride do sklopitve, se iz podenote α sprosti GDP. Sledi vezava gvanozin-5'-trifosfata GTP na podenoto α , ki skupaj z vezanim GTP disociira z G_s -proteina in aktivira encim adenilat-ciklazo (AC). Zaradi

aktivacije AC se poveča koncentracija znotrajceličnega cikličnega adenozin-3', 5'-monofosfata (cAMP). V naslednji stopnji cAMP aktivira protein-kinazo A (PKA). Vloga PKA je fosforilacija celičnih proteinov, fosforilira in s tem aktivira kalcijeve kanale (L-tip). Aktivacija kalcijevih kanalov vodi do povečanja znotrajceličnega kalcija in celičnega učinka, ki je odvisen od specializiranosti celice (4, 12).



Slika 6: Struktura GPCR. Shematska ponazoritev strukture GPCR in vezave histamina na receptor. Vezava histamina povzroči sklopitev receptorja s proteinom G, nato kompleks receptor – protein G aktivira primarni efektni encim (AC). Le ta omogoči nastanek drugega prenašalca (cAMP), ki aktivira sekundarni efektni encim (PKA), kar privede do celičnega odgovora.

Razred III.: Receptorji vezani na kinaze predstavljajo veliko in heterogeno skupino membranskih receptorjev, na katere delujejo predvsem proteinski prenašalci. Sestavljeni so iz zunajcelične in znotrajcelične domene, ki ju povezuje transmembranski heliks (Primer: receptorji za inzulin, rastne faktorje in citokine) (1).

Razred IV.: Jedrni receptorji regulirajo transkripcijo genov. Primeri jedrnih receptorjev so receptorji za steroidne in ščitnične hormone (1).

1.2.1 HISTAMINSKI RECEPTORJI

Histamin posreduje svoje učinke preko histaminskih receptorjev. Do sedaj so odkrili že 4 tipe histaminskih receptorjev: H₁, H₂, H₃ in H₄. Spadajo v razred II. farmakoloških receptorjev.

Preglednica I: Nahajanje in učinki posameznih tipov histaminskih receptorjev (prirejeno po 1, 4, 6, 11, 12, 15).

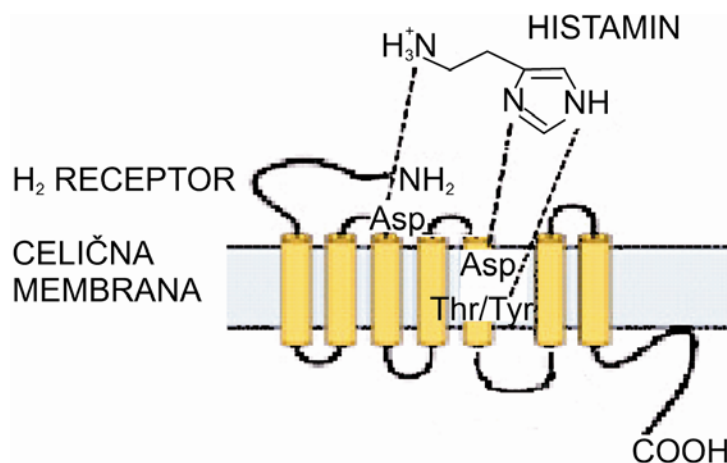
Tip receptorja	Nahajanje	Učinki
H ₁	gladke mišice (bronhijev, žil, tankega črevesja, maternice)	Vazodilatacija, povečana prepustnost žilja, kontrakcija gladkih mišic, emetični učinek.
	OŽS: področje talamusa in korteksa	Regulacija ciklusa spanje-budnost, uravnavanje kognitivnih funkcij.
H ₂	parietalne celice želodca, srce in stene žil	Stimulacija izločanja želodčne kisline; povišana frekvenca in moč delovanja srca.
	OŽS; nevroni in astrociti	Funkcija še ni pojasnjena.
H ₃	OŽS; nevroni in astrociti	Delujejo kot avtoreceptorji; proces spomina in učenja.
H ₄ (nedavno odkriti)	CŽS	Funkcija še ni pojasnjena.
	Mastociti in levkociti	Udeleženi pri vnetju in kemotaksi.

Struktura H₂ receptorja:

Človeški histaminski receptor H₂ vsebuje 359 aminokislin, kar je nekoliko krajše zaporedje, kot je običajno za GPCR. Vsebuje sedem hidrofobnih transmembranskih področjih, zunajcelično končno aminsko verigo, ki vključuje N-glikozilacijsko mesto in znotrajcelično končno karboksilno verigo. Vsebuje tudi relativno kratko znotrajcelično zanko, ki je lastnost receptorjev, ki prenašajo kemično sporočilo preko membranskega encima adenilat-ciklaze. V drugi in tretji zunajcelični zanki so prisotni cisteinski preostanki, ki tvorijo strukturno pomembne disulfidne vezi. Ključne za vezavo in učinek histamina in drugih agonistov so aminokisline na tretjem in petem transmembranskem

področju histaminskega receptorja H_2 . Aminokislina aspartat (Asp^{98}) na tretjem transmembranskem področju, ki je značilna za monoaminske receptorje, naj bi predstavljala primarno vezavno mesto za pozitivno nabiti dušikov atom na alifatski verigi molekule histamina. Za tvorbo vodikovih vezi z dušikovimi atomi v imidazolnem obroču histamina, naj bi imela ključno vlogo aspartat na mestu 186 (Asp^{186}) in treonin na mestu 190 (Thr^{190}) oziroma tirozin na mestu 182 (Tyr^{182}) na petem transmembranskem področju. N^1 imidazolnega obroča se veže na Thr^{190}/Tyr^{182} , N^3 imidazolnega obroča pa se veže na Asp^{186} (3, 4, 6, 16).

Da pride do aktivacije histaminskega receptorja H_2 , sta potrebni proton donorska in proton akceptorska skupina. Priti mora do tautomerizacije molekule histamina. Histamin, v obliki monokationa, se receptorju približa kot N^1 -H tautomerna oblika. NH_3^+ skupina stranske verige se veže na Asp^{98} , ki se nahaja na tretjem transmembranskem področju in skupaj tvorita ionski par. Ko se zasidra stranska veriga, pride do nevtralizacije naboja, ki povzroči premik tautomere z mesta N^1 -H na N^3 -H. Domnevno N^3 imidazolnega obroča deluje kot akceptor protona in sprejme proton od Asp^{186} , N^1 imidazolnega obroča deluje kot donor protona in se veže na Thr^{190}/Tyr^{182} . Sicer lahko obe mesti delujeta, ali kot donor ali kot akceptor protona (3, 4).



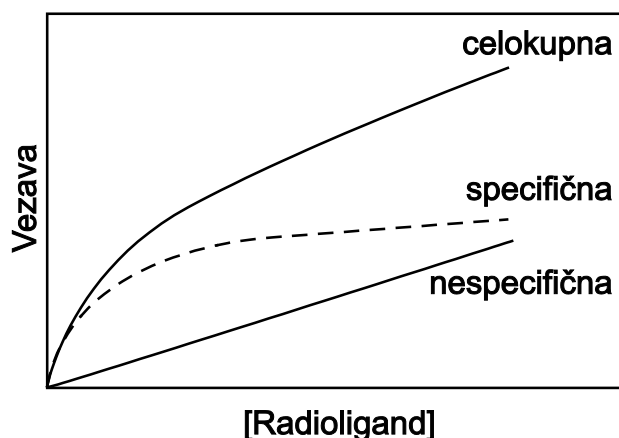
Slika 7: Shematska ponazoritev strukture in vezavnega mesta za histaminski receptor H_2
(prirejeno po 3 in 16).

1.3. INTERAKCIJA RECEPTOR – AGONIST

Za opredelitev vezave ligandov na farmakološki receptor se lahko poslužujemo vezavnih študij s pomočjo radioaktivno označenega liganda (radioligand), ki je lahko agonist ali antagonist. Radioligand mora imeti visoko specifičnost in afiniteto do receptorja. Za potek vezavnega poskusa potrebujemo tkivo, celice ali izolirane celične membrane, ki vsebujejo receptorje, ki jih raziskujemo, radioligand in primerno okolje (temperatura, pH). Po določenem času inkubacije poteče reakcija med radioligandom in tkivom ter se vzpostavi ravnotežje med vezanim in nevezanim radioligandom. Ločitev vezanega in nevezanega radioliganda lahko izvedemo s centrifugiranjem, filtracijo ali dializo. Obstajajo trije načini vezavnih poskusov: saturacija, inhibicija in kinetika. Namen vezavnih študij je določiti in kvantitativno ovrednotiti odnos med koncentracijo liganda v okolju receptorja in deležem liganda, ki se veže na receptor (13, 17).

Saturacija

Pri saturaciji opazujemo vezavo radioliganda na receptor. Z metodo saturacije lahko določimo maksimalno število oziroma gostoto vezavnih mest ($B_{\max}$) in afiniteto liganda do vezavnih mest (K_d -ravnotežna konstanta disociacije kompleksa receptor-radioligand). Določamo celokupno vezavo radioliganda, ki je vsota nespecifične in specifične vezave. Za določanje nespecifične vezave potrebujemo poleg radioliganda še hladni antagonist v visokih koncentracijah ($10-100 \cdot K_d$). Pod temi pogoji hladni antagonist zasede vsa vezavna mesta na receptorju, zato se radioligand lahko veže samo na nespecifična vezavna mesta. Nespecifična vezava biološko aktivnega liganda je pri nizkih koncentracijah, ki se uporabljajo v farmakoloških vezavnih poskusih, v osnovi linearen in nenasitljiv proces, saj predstavlja vezavo radioliganda na druga mesta v okolici receptorja. Razlika med celokupno in nespecifično vezavo je specifična vezava, ki predstavlja vezavo liganda na receptor in je nasitljiv proces. Celokupna in nespecifična vezava radioliganda sta spremenljivki, ki ju lahko eksperimentalno določimo, medtem ko specifično vezavo izračunamo (slika 8) (13, 17).



Slika 8: Saturacijska vezava. Krivulje prikazujejo celokupno, nespecifično in specifično vezavo. Specifična vezava je razlika med celokupno in nespecifično vezavo. Nespecifična vezava je linearen in nenasitljiv proces. Specifična vezava je nasitljiv proces (prirejeno po 18).

Specifično vezavo grafično prikažemo z modelom nelinearne regresije. Ravnotežno stanje opisuje Langmuirova izoterma:

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

B.....specifična vezava radioliganda

B_{max}.....maksimalno število specifičnih vezavnih mest

K_D.....ravnotežna konstanta disociacije kompleksa receptor – radioligand

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

Inhibicija

Z inhibicijskimi vezavnimi poskusi potrdimo prisotnost vezavnih receptorskih mest. Z različnimi agonisti ali antagonisti v določenem koncentracijskem območju izpodrivamo radioligand z receptorskih vezavnih mest. Afiniteto do izpodrivanja kvantitativno

opredelimo z IC₅₀, ki predstavlja koncentracijo hladnega liganda, ki povzroči 50 % inhibicijo specifične vezave radioliganda. S pomočjo Cheng-Prusoff-ove enačbe izračunamo K_i-ravnotežno konstanto disociacije kompleksa receptor – inhibitor:

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

K_i.....ravnotežna konstanta disociacije kompleksa receptor – inhibitor

K_D.....ravnotežna konstanta disociacije kompleksa receptor – radioligand

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

IC₅₀.....molarna koncentracija hladnega liganda, ki povzroči 50 % inhibicijo specifične vezave radioliganda

1.4. KEMIJSKE VEZI

Pomembno vlogo pri vezavi liganda na receptor imajo kemijske vezi, saj je od tipa in moči kemijskih vezi odvisna afiniteta med ligandom in receptorjem. Kemijske vezi, udeležene v interakciji med ligandom in receptorjem, se razlikujejo v energiji, specifičnosti in trajanju (reverzibilnosti) (5).

1.4.1. KOVALENTNA VEZ

Predstavlja najmočnejšo vez (50–150 kcal/mol), ki je udeležena v interakciji ligand – receptor. Pri kovalentni vezi si dva atoma, eden od agonista in drugi od receptorja, delita skupni elektronski par. Običajno je kovalentna vez ireverzibilna, zato je ta vez zelo redko prisotna pri vezavi učinkovine na receptor, kjer je pogostejše zaželena reverzibilna vezava (5).

1.4.2. IONSKA VEZ

Kadar se dva nasprotno nabita iona privlačita z elektrostatskimi silami, se tvori ionska vez. Moč vezi se giblje med 5–10 kcal/mol in se zmanjšuje sorazmermo z večanjem razdalje med dvema atomoma. Sposobnost učinkovine, da se veže na receptor preko ionske vezi, je tem večja, čim bližje je učinkovina receptorju. Moč ionske vezi je dovolj velika, da pride do interakcije ligand – receptor, vendar z razliko od kovalentne vezi, ni tako močna vez, da bi preprečevala razpad kompleksa ligand – receptor (5).

1.4.3. HIDROFOBNE INTERAKCIJE

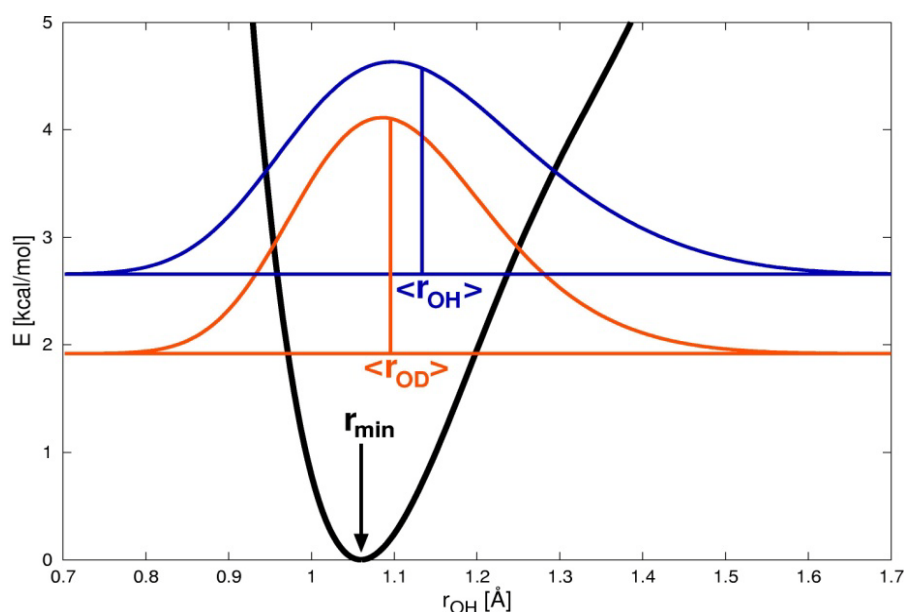
Spadajo med van der Waalsove sile oziroma Londonove sile. Hidrofobne interakcije prispevajo k vezavi liganda na receptor. So zelo šibke vezi (0.5–1 kcal/mol), z večanjem razdalje pa moč vezi pada. Preden se ligand veže na vezavno mesto na receptorju, se mora delno hidratirati, zato so pri vezavi pomembne interakcije voda – protein, voda – ligand in voda – voda. Hidratacijska komponenta je odgovorna za hidrofobno interakcijo (5).

1.4.4. VODIKOVA VEZ IN DEVTERACIJA

Vodikova vez ima pomembno vlogo pri marsikateri interakciji učinkovina – receptor. Nastane med dvema elektronegativnima atomoma, kjer je elektrostatski odboj kompenziran s pozitivnim nabojem protona med njima. Kadar vodik leži med dvema močno elektronegativnima elementoma, je z enim povezan s kovalentno vezjo, z drugim pa z elektrostatikom. Vodikova vez je šibka kemijska vez, ki poteka med proton donorsko (-OH, -SH, =NH) in proton akceptorsko ($=C=O$, -O-, -S-, -F, R₁R₂R₃N) skupino. Lahko poteka intermolekularno ali intramolekularno.

Vodikova vez ima velik vpliv na strukturo in lastnosti molekule vode. Odgovorna je za strukturo in stabilnost vode in biopolimerov. Receptor, ki je hidratiran, je stabiliziran z intramolekularnimi vodikovimi vezmi, intermolekularnimi vodikovimi vezmi receptor-voda in strukturo vode v neposredni okolici. Vodikova vez je tip interakcije, ki ima ključno vlogo pri vezavi liganda na receptor. Tovrstna interakcija ima znaten nuklearni kvantni

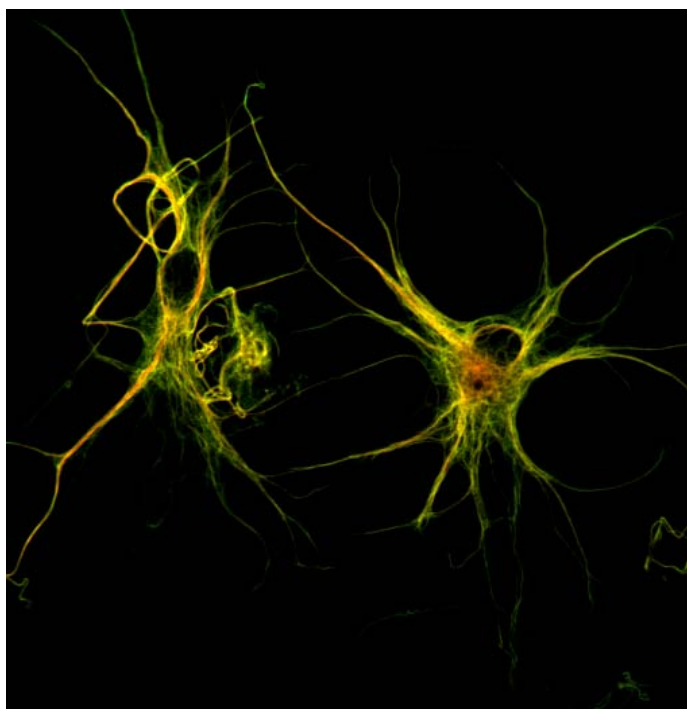
karakter zaradi udeležbe lahkega vodikovega atoma v vodikovi vezi. Atom vodika potrebuje kvantno obravnavo gibanja njegovega jedra, ki je odvisno od njegove mase. Atomi, ki so težji, so bolj lokalizirani kot lažji. Vodikov proton ima maso 1 amu in ga lahko zamenjamo z devteronom, ki ima maso 2 amu (slika 9). Za proteine je značilno, da proces devteracije steče že, če proteine inkubiramo v devterirani vodi (D_2O). V procesu devteracije se vodikovi atomi, vezani na elektronegativne atome, izmenjajo z atomi devterija. Spremeni se struktura in stabilnost bioloških makromolekul in njihovih ligandov kot posledica kvantne narave gibanja jeder. Zaradi kvantne narave gibanja protona pride pri devteraciji do spremembe O-H razdalje, prav tako pa se spremeni razdalja med donorjem in akceptorjem protona. Devteracija spremeni jakost vodikove vezi, saj se s spremembo razdalje vodikove vezi spremeni tudi energija interakcij. Vodikova vez je odgovorna za velik del interakcij v sistemu receptor-voda-ligand, zato lahko pričakujemo, da se bo z devteracijo spremenila afiniteta vezave devteriranega liganda na devteriran receptor. Ker se spremenijo jakosti vodikovih vezi voda-voda, voda–receptor, voda–ligand, ligand–receptor in intramolekularne vodikove vezi receptor–receptor, se lahko afiniteta poveča ali zmanjša (5, 16, 19–23.).



Slika 9: Ubbelohdejev efekt. Če zamenjamo proton z devteronom, zmanjšamo razdaljo med donorjem protona in protonom, ker ima valovna funkcija za devteron manjšo amplitudo gibanja kot vodikov proton. Če zmanjšamo razdaljo med donorjem in devteronom, se poveča razdalja med donorjem in akceptorjem protona. Spremeni se dolžina in stabilnost vodikovih vezi (prirejeno po 24).

1.5. ASTROCITI

Astroцити so najštevilčnejše celice glije, saj predstavljajo 50 % celic v osrednjem živčevju. So ektodermalnega izvora in so tudi vzdražni, vendar manj kot živčne celice. Astroцити ali zvezdaste celice so dobili ime zaradi nepravilne zvezdaste oblike s številnimi izrastki (slika 10). Dolgo časa so jim pripisovali le pasivno podporno funkcijo, skrb za homeostazo in vzdrževanje primerne mikrokoli za delovanje nevronov. Danes vemo, da je njihova funkcija precej širša, saj imajo edinstveno lastnost sposobnosti spreminjanja svoje oblike in funkcije med življenjem v skladu s spremembami v neposrednem okolju. Njihova oblika in funkcija se razlikujeta v različnih življenjskih obdobjih, tako je drugačna v obdobju med razvojem, v odraslem obdobju in v času po poškodbi v osrednjem živčevju (preglednica II). Astroцити so tudi enakovredni član tridelne sinapse in regulirajo tvorbo in vzdrževanje sinaps. Tvorijo številne presledkovne stike, ki omogočajo medcelično komunikacijo z astroцити in z nevroni predvsem z uporabo kalcijevih tokov. Astroцити izražajo številne receptorje za veliko prenašalcev v osrednjem živčevju, med njimi tudi histaminske receptorje H_1 , H_2 in H_3 (25).



Slika 10: Astroцити, vzgojena iz korteksa neonatalnih podgan v primarni kulturi, označena s protitelesi proti GFAP (za astroцити značilen protein).

Preglednica II: Glavne funkcije astrocitov v različnih življenjskih obdobjih (prirejeno po 25).

Obdobje:	Glavne funkcije:
Razvojno obdobje	Vodenje in usmerjanje rastočih nevronov. Sinteza trofičnih dejavnikov. Tvorba sinaps.
Normalno odraslo obdobje	Ohranjanje homeostaze (privzem kalija in nevrottransmitterjev). Vpliv na sinaptično plastičnost. Tridelna sinapsa.
Po možganski poškodbi	Nabrekanje astrocitov. Reaktivna glijoza.

2. NAMEN DELA

Astrociti neonatalnih podgan, vzgojeni v primarni kulturi, izražajo številne biološko pomembne molekule, med drugim tudi histaminske receptorje H_1 , H_2 in H_3 , ter so ustrezen model za preučevanje vezavnih lastnosti farmakoloških receptorjev. Afiniteta in vezava ligandov na histaminski receptor H_2 je različna. Pomembno vlogo pri vezavi ligandov na receptor ima vodikova vez. Pri procesu devteracije se vodik zamenja z devterijem, ki je dvakrat težji. Če se ta zamenjava zgodi v biomolekuli, kot je farmakološki receptor, se spremenijo intermolekularne in intramolekularne razdalje in spremeni se afiniteta posameznega liganda za vezavo na receptor.

V diplomskem delu smo preverili naslednje delovne hipoteze:

1. Histaminski receptorji H_2 so prisotni na astrocitih neonatalnih podgan, vzgojenih v primarni kulturi.
2. Ligandi, ki se vežejo na histaminski receptor H_2 , bodo izpodrivali vezan 3H -tiotidin.
3. Zamenjava bidestilirane vode v fosfatnem pufru z devterirano vodo bo povzročila spremembo intermolekularne in intramolekulane razdalje v histaminskih receptorjih H_2 , zaradi tega se bo spremenila afiniteta za vezavo agonistov na histaminski receptor H_2 .

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

- Goveji serumski albumin: Sigma, ZDA
- Antibiotik gentamicin: Gibco, ZDA
- Medij Leibovitz L-15: Sigma, ZDA
- DMEM medij: Gibco, ZDA
- Piruvat: Gibco, ZDA
- L-glutamat: Gibco, ZDA
- Fetalni goveji serum: Lonza, Belgija
- Trypsin-EDTA, 0,05 %: Gibco, ZDA
- PBS pufer: pH=7,4: Gibco, ZDA
- Bio-Rad Protein Assay: Bio-Rad Laboratories, ZDA
- Bio-Rad Protein Assay, Standard I: Bio-Rad Laboratories, ZDA
- Scintilacijska tekočina Aquasol: New England Nuclear, ZDA
- ³H-tiotidin, specifična aktivnost 82,2 Ci/mmol: New England Nuclear, ZDA
- Na₂HPO₄·2H₂O p.a: Merck, Nemčija
- KHPO₄ p.a: Riedel de Haen, Nemčija
- Cimetidin: GSK, Velika Britanija
- Histamin: Sigma, ZDA
- Impromidin: GSK, Velika Britanija
- 2-metilhistamin: GSK, Velika britanija
- 4-metilhistamin: GSK, Velika britanija
- Devterirana voda p.a: Cambridge Isotope Laboratories, ZDA
- 99,9 % etanol: Riedel de Haen, Nemčija
- 0,5 M HCl p.a: Riedel de Haen, Nemčija
- 0,1 % askorbinska kislina p.a: Merck, Nemčija

3.1.1. RAZTOPINE

Preglednica III: Sestava preparacijske raztopine.

PREPARACIJSKA RAZTOPINA
50 ml medij Leibovitz L-15
0,05 g goveji serumski albumin
50 µl gentamicin

Preglednica IV: Sestava hranilnega medija.

HRANILNI MEDIJ
50 ml DMEM medij; po Dulbeccu spremenjen Eaglov medij
5 ml fetalni goveji serum
500 µl 100 mM piruvat
500 µl 200 mM L-glutamat
50 µl 50 mg/ml gentamicin

Preglednica V: Sestava 0,5 M Na⁺/K⁺ fosfatnega pufra.

0,5 M Na⁺/K⁺ fosfatni pufer; pH=7,4; za 1L
818 ml 66,7 mM raztopina Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
182 ml 66,7 mM raztopina KH ₂ PO ₄

Preglednica VI: Sestava raztopine za razredčevanje ³H-tiotidina.

RAZTOPINA ZA RAZREDČEVANJE ³H-TIOTIDINA
5 ml 99,9 % etanol
100 µl 0,5 M HCl p.a
44,9 ml 0,1 % askorbinska kislina

3.2. METODE

3.2.1. POSKUSNE ŽIVALI

Vse postopke na živalih smo izvedli v skladu z dovoljenjem Veterinarske uprave Republike Slovenije št. 34401-1/2010/8, prav tako smo poskuse na živalih izvajali po smernicah za delo s poskusnimi živalmi, ki ga je izdal Komite za zaščito živali Nacionalnih inštitutov zdravja, Bethesda, ZDA.

Iz možganskih skorij neonatalnih (3 dni stari mladiči) podgan obeh spolov seva Wistar smo pripravili primarne kulture astrocitov. Postopek smo izvedli po metodi Schwartzove in Wilsonove (28).

3.2.2. PRIPRAVA PRIMARNIH KULTUR ASTROCITOV

Neonatalne podgane je dekapitiral tehnik z dovoljenjem za izvajanje evtanazije poskusnih živali. Iz lobanje dekapitiranih podgan smo previdno odstranili možgane in jih potopili v 4 ml preparacijske raztopine. Z možganov smo odstranili možganske ovojnice ter izolirali možgansko skorjo. Dodali smo 4 ml preparacijske raztopine in centrifugirali pri času 4 minute in 1200 obratih/minuto pri sobni temperaturi. Nato smo supernatant odlili in usedlini dodali 4 ml preparacijske raztopine. Suspenzijo možganskega tkiva smo s pomočjo pipete mehansko razdrobili. Postopek centrifugiranja in suspendiranja smo ponovili pri enakih pogojih. Nastalo suspenzijo smo prenesli v petrijevke in suspendirali s pomočjo igel različnih debelin (20, 22, 25 gauge) in prenesli v centrifugirko preko sterilne najlonske mrežice (Nitex, premer pore 75 µm). Po centrifugiranju smo supernatant odlili, usedlini pa dodali 14 ml hranilnega medija in prenesli suspenzijo v gojilne stekleničke. Celice smo nato vzgajali v inkubatorju (37 °C, mešanica 95 % zraka in 5 % CO₂).

Celice smo gojili do prve konfluentnosti, zamenjali medij in jih ponovno dali v inkubator za 6 ur (37 °C, mešanica 95 % zraka in 5 % CO₂). Sledilo je 20-urno stresanje pri 100 obratih/minuto. S postopkom, ki smo ga ponovili trikrat, smo odstranili kontaminirajoče celice (mikroglijo). Celicam smo odlili medij, dodali 10 ml hranilnega medija, ga odlili, nato dodali 4 ml raztopine tripsin-EDTA in jih za 20 minut dali v inkubator (37 °C, mešanica 95 % zraka in 5 % CO₂). Celice smo prenesli v druge stekleničke, dodali 10 ml

hranilnega medija, jih za 24 ur dali v inkubator in zatem zamenjali medij in tako odstranili tripsin. Ko so celice postale ponovno konfluentne, smo odlili medij, dodali 10 ml hranilnega medija, ga odlili in dodali še tripsin-EDTA, ki je omogočil odstop celic od podlage. Nato smo celice za 20 minut dali še v inkubator. Celice, ki niso odstopile od podlage, smo s strgalom postrgali. Dodali smo 32 ml hranilnega medija in s pomočjo pipete suspendirali suspenzijo celic, tripsina in medija do enakomerne porazdelitve celic po mediju.

Suspenzijo smo odpipetirali v petrijevke (8 ml suspenzije na petrijevko) jih dali za 24 ur v inkubator (37 °C, mešanica 95 % zraka in 5 % CO₂) nato zamenjali medij, jih ponovno dali v inkubator in po 7 dneh zamenjali medij. Ko smo dosegli konfluentnost celic, smo jih pobrali v PBS pufri in jih centrifugurali 15 minut pri 12000 obratih/minuto pri sobni temperaturi. Supernatant smo nato zavrgli, usedlino celic smo zamrznili na -70 °C in hranili v zamrzovalniku do poskusa.

3.2.3. DOLOČITEV KONCENTRACIJE PROTEINOV

Za določitev koncentracije proteinov smo uporabili metodo po Bradfordu, pri kateri proteini reagirajo z barvilom Coomassie Brilliant Blue G-250. Nastane obarvan produkt z absorpcijskim maksimumom pri valovni dolžini 595 nm.

Zamrznjene astrocite smo odtajali, jim dodali fosfatni pufer, nato pa nastalo suspenzijo prenesli v teflonski homogenizator, s katerim smo homogenizirali suspenzijo. Uporabili smo naraščajoče količine standara Bio-Rad Protein Assay Standard I, ki smo ga odpipetirali v epruvete (2,5 µl, 5 µl, 8 µl, 10 µl, 20 µl in 30 µl). V dve epruveti smo dali 10 µl in 20 µl vzorca. V vse epruvete smo dodali bidestilirano vodo, da je bil končni volumen vsake epruvete 800 µl. Dodali smo še 200 µl reagenta za barvanje Bio-Rad Protein Assay, ki vsebuje barvilo Coomassie Brilliant Blue G-250. Dobro smo premešali, pustili stati 30 minut in nato spektrofotometrično izmerili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm. Vse meritve smo izvedli v dveh paralelkah.

Na podlagi umeritvene premice smo določili koncentracijo proteinov v posameznem vzorcu astrocitov. Absorbanca obarvane raztopine je premosorazmerna koncentraciji proteinov v vzorcu.

3.2.4. VEZAVA ³H-TIOTIDINA NA RECEPTORJE H₂ V ASTROCITIH

SATURACIJSKA VEZAVA ³H-TIOTIDINA

Določali smo celokupno in nespecifično vezavo radioaktivno označenega antagonista histaminskih receptorjev H₂ (³H-tiotidina) na proteine v astrocitih. Pri določanju nespecifične vezave smo kot hladni antagonist histaminskih receptorjev H₂ uporabili cimetidin.

Celokupna vezava:

100 µl raztopine proteinov v koncentraciji 1 mg/ml smo inkubirali v 125 µl fosfatnega pufra v bidestilirani vodi 3 minute pri 25 °C. Po 3 minutah smo dodali 25 µl raztopine radioliganda ³H-tiotidina v koncentracijskem območju 1–15 nM. Končni inkubacijski volumen je znašal 250 µl. Vezavo smo prekinili po 15 minutah inkubacije z dodatkom mrzlega fosfatnega pufra. Nato smo z vakuumsko filtracijo skozi steklene mikrofiltre GF/C (Whatman) ločili nevezan radioligand ³H-tiotidin od vezanega. S fosfatnim pufrom smo sprali filtre in jih prenesli v Eppendorfove epruvete ter v vsako epruveto dodali 1,5 ml scintilacijske tekočine Aquasol. V tekočinskem scintilacijskem števcu (MicroBeta Trilux, Perkin Elmer, ZDA) smo izmerili radioaktivnost, saj pri merjenju v scintilacijskem števcu izkoriščamo radioaktivni razpad izotopa. Števec nam poda dve vrednosti: število zaznav radioaktivnih razpadov na minuto (*cpm – counts per minute*), in prevorbo teh vrednosti v realno število radioaktivnih razpadov na minuto (*dpm – decay per minute*). Razmerje med cpm in dpm je učinkovitost.

Nespecifična vezava:

Pri določanju nespecifične vezave smo 100 µl raztopine proteinov v koncentraciji 1 mg/ml inkubirali v 100 µl fosfatnega pufra v bidestilirani vodi 3 minute pri 25 °C. Po 3 minutah smo dodali 25 µl 10⁻⁵ M raztopine cimetidina, po naslednjih 3 minutah pa še 25 µl raztopine radioliganda ³H-tiotidina v koncentracijskem območju 1–15 nM. Tudi pri nespecifični vezavi je celoten inkubacijski volumen znašal 250 µl. Vezavo smo tudi tukaj prekinili na isti način kot pri celokupni vezavi in vzorcem izmerili radioaktivnost.

Po istem postopku smo ponovili poskus, vendar smo v inkubacijski medij dodali fosfatni pufer, pripravljen z devterirano vodo namesto z bidestilirano vodo. Volumen fosfatnega pufra in končni inkubacijski volumen sta ostala nespremenjena. Celokupno in nespecifično vezavo smo določali po istem postopku.

Preglednica VII: Časovni prikaz poteka vezavnega poskusa: S = slepi vzorec, ki ne vsebuje astrocitov (dve paralelki); Vz = vzorec z astrociti (tri paralelke).

		ZAČETEK [min]	CIMETIDIN [min]	³ H-TIOTIDIN [min]	KONEC [min]
CELOKUPNA VEZAVA	S ₁	0	/	3	18
	S ₂	3	/	6	21
	Vz ₁	6	/	9	24
	Vz ₂	9	/	12	27
	Vz ₃	12	/	15	30
NESPECIFIČNA VEZAVA	S ₄	6	9	18	33
	S ₅	9	12	21	36
	Vz ₄	12	15	24	39
	Vz ₅	15	18	27	42
	Vz ₆	18	21	30	45

INHIBICIJA SPECIFIČNE VEZAVE ³H-TIOTIDINA

100 µl raztopine proteinov v koncentraciji 1 mg/ml smo inkubirali v 100 µl fosfatnega pufra v bidestilirani vodi pri 25 °C. Po 3 minutah smo dodali 25 µl raztopine ligandov (2-metilhistamin, 4-metilhistamin, histamin in impromidin) v koncentracijskem območju od 10⁻¹⁰–10⁻⁵ M in 25 µl raztopine ³H-tiotidina. Končni inkubacijski volumen je znašal 250 µl. Vezavo smo prekinili po 15 minutah inkubacije na enak način kot pri saturacijskih metodah.

Po istem postopku smo ponovili inhibicijski poskus, vendar smo v inkubacijski medij dodali fosfatni pufer, pripravljen z devterirano vodo namesto z bidestilirano vodo.

3.2.5. RAČUNANJE PARAMETROV VEZAVNIH ŠTUDIJ

DOLOČANJE PARAMETROV SPECIFIČNE VEZAVE ³H-TIOTIDINA

Za posamezno uporabljeno koncentracijo ³H-tiotidina smo izračunali specifično vezavo, razliko med celokupno in nespecifično vezavo, iz podatkov, ki smo jih dobili iz saturacijskih vezavnih poskusov.

Z uporabo računalniškega programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) smo grafično prikazali celokupno, specifično in nespecifično vezavo ³H-tiotidina na histaminski receptor H₂ v odvisnosti od koncentracije radioliganda. Parametre smo grafično prikazali za poskus, kjer smo vzorce inkubirali v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi in v fosfatnem pufru v devterirani vodi. Celokupno, specifično in nespecifično vezavo smo v diagramu prikazali kot vrednosti cpm, ki smo jih neposredno dobili iz meritev scintilacijskega števca.

Na podlagi izračunanih vrednosti smo narisali diagram specifične vezave ³H-tiotidina v odvisnosti od koncentracije radioliganda ³H-tiotidina. Primerjali smo specifično vezavo ³H-tiotidina v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi s specifično vezavo v fosfatnem pufru v devterirani vodi.

Specifično vezavo smo grafično prikazali z modelom nelinearne regresije. Ravnotežno stanje opisuje Langmuirova izoterma:

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

B.....specifična vezava radioliganda

B_{max}.....maksimalno število specifičnih vezavnih mest

K_D.....ravnotežna konstanta disociacije kompleksa receptor – radioligand

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

DOLOČANJE PARAMETROV INHIBICIJE SPECIFIČNE VEZAVE ³H-TIOTIDINA

Najprej smo izračunali specifično vezavo ³H-tiotidina na receptor H₂ kot razliko med celokupno in nespecifično vezavo, nato smo za vsako koncentracijo določenega inhibitorja izračunali odstotek inhibicije specifične vezave. S pomočjo računalniškega programa GraphPad Prism smo narisali inhibicijsko krivuljo.

Inhibicijo specifične vezave radioliganda ³H-tiotidina smo grafično prikazali kot funkcijo logaritma molarne koncentracije uporabljenega inhibitorja z uporabo modela nelinearne regresije. Iz inhibicijske krivulje smo odčitali IC₅₀, ki predstavlja koncentracijo hladnega liganda, ki povzroči 50 % inhibicijo specifične vezave. Z uporabo Cheng-Prusoff-ove enačbe smo izračunali ravnotežno konstanto disociacije kompleksa receptor – inhibitor (K_i) za vsak uporabljen inhibitor:

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

K_i.....ravnotežna konstanta disociacije kompleksa receptor – inhibitor

K_D.....ravnotežna konstanta disociacije kompleksa receptor – radioligand

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

IC₅₀.....molarna koncentracija hladnega liganda, ki povzroči 50 % inhibicijo specifične vezave radioliganda

Parametre smo grafično prikazali za poskus, kjer smo vzorce inkubirali v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi in v fosfatnem pufru v devterirani vodi. Grafično smo prikazali primerjavo med posameznimi inhibitorji (2-metilhistamin, 4-metilhistamin, histamin in

impromidin) in vpliv devteracije na afiniteto izpodrivanja vezanega radioliganda ³H-tiotidina na histaminski receptor H₂ za posamezne inhibitorje.

ANALIZA PODATKOV

Vsak poskus smo ponovili vsaj dvakrat in za vsako koncentracijo radioliganda oziroma inhibitorja pripravili vzorce astrocitov v treh paralelkah. Končni podatki so predstavljeni kot rezultati najmanj šestih meritev. Za posamezen vzorec smo izračunali aritmetično sredino in standardno napako aritmetične sredine. Rezultate smo statistično primerjali z neparnim Studentovim t-testom za neodvisne vzorce. Statistično značilno razliko je predstavljala vrednost $p < 0,05$.

4. REZULTATI

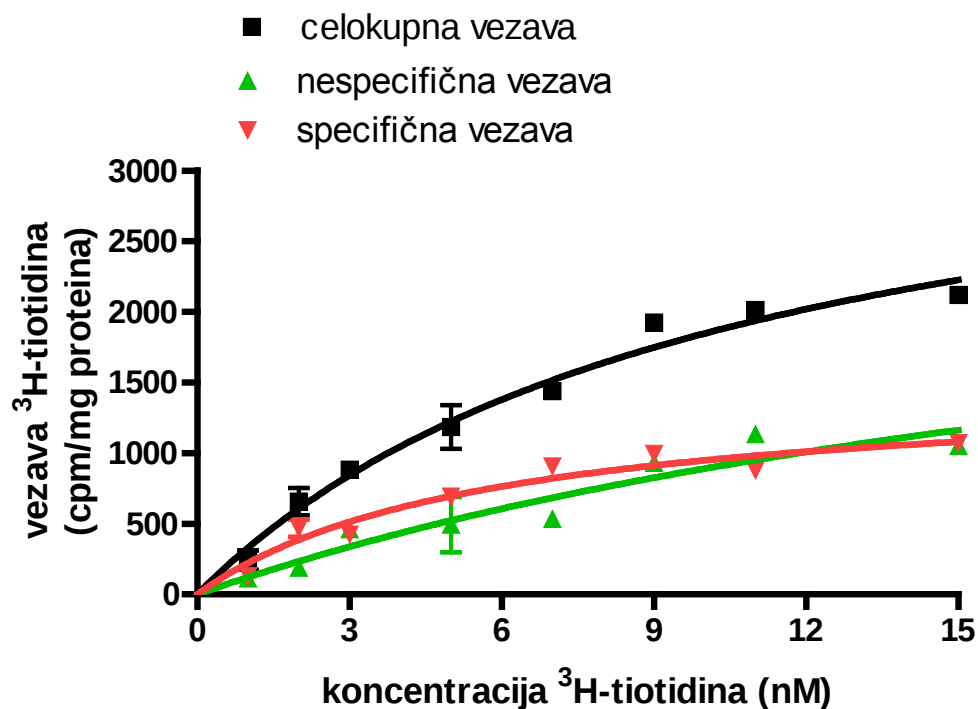
V diplomski nalogi smo najprej določili osnovne vezavne lastnosti histaminskega receptorja H_2 v primarni kulturi astrocitov podgan. Vezavne lastnosti smo določili z uporabo saturacijskih in inhibicijskih vezavnih študij. V drugem delu smo določili iste vezavne parametre, vendar smo astroците inkubirali v pufru, ki je namesto bidestilirane vode vseboval devterirano vodo.

4.1. SATURACIJSKA VEZAVA 3H -TIOTIDINA V FOSFATNEM PUFRU

Astroците neonatalnih podgan smo inkubirali z naraščajočimi koncentracijami 3H -tiodidina (antagonist histaminskega receptorja H_2) v koncentracijskem območju od 1–15 nM v prisotnosti prebitka cimetidina (nespecifična vezava) in brez cimetidina (celokupna vezava), ki je tudi antagonist histaminskega receptorja H_2 . Specifično vezavo, vezavo 3H -tiodidina na receptorska vezavna mesta, smo izračunali kot razliko med celokupno in nespecifično vezavo (slika 11).

S saturacijskimi vezavnimi poskusi smo pokazali prisotnost specifičnih vezavnih mest za 3H -tiodidin na astrocih neonatalnih podgan v primarni kulturi. Kot smo pričakovali, je število receptorskih vezavnih mest na astrocih omejeno, kar nam potrjuje nasitljivost in reverzibilnost specifične vezave 3H -tiodidina v območju od 1–15 nM (slika 11). Celokupna, nespecifična in specifična vezava naraščajo s koncentracijo radioliganda 3H -tiodidina in dosežejo plato. Specifična vezava doseže plato pri približno 9 nM.

Z analizo nelinearne regresije specifične vezave 3H -tiodidina smo izračunali maksimalno gostoto vezavnih mest $B_{\max} = 21,95 \pm 3,2 \text{ fmol/mg proteina}$ in ravnotežno disociacijsko konstanto $K_D = 6,3 \pm 1,9 \text{ nM}$ (slika 13 in preglednica VIII).

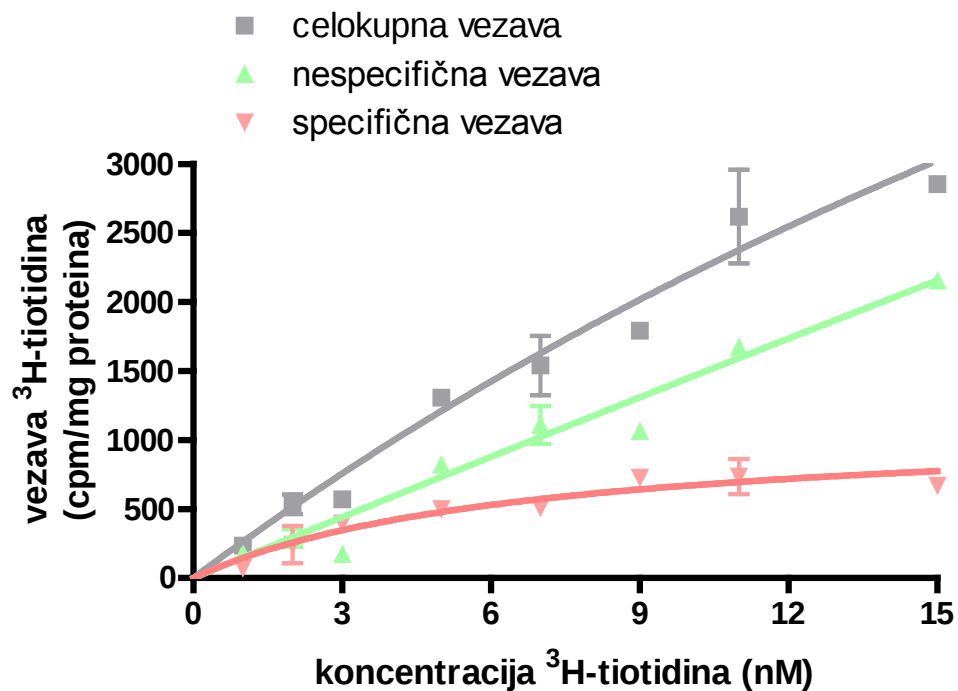


Slika 11: Saturacijska krivulja celokupne, nespecifične in specifične vezave 3H -tiotidina na histaminski receptor H_2 na astrocitih kot funkcija koncentracije radioliganda (0,15 M fosfatni pufer, pH = 7,4). Vrednosti so prikazane kot aritmetična sredina $\pm$ standardna napaka aritmetične sredine najmanj dveh poskusov, opravljenih v triplikatih.

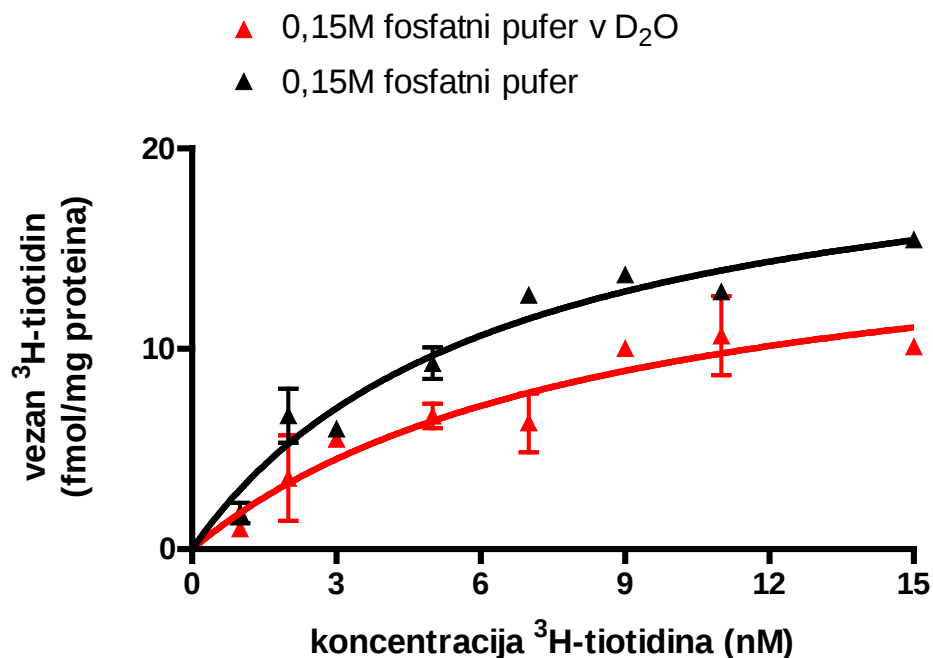
4.2. SATURACIJSKA VEZAVA ³H-TIOTIDINA V DEVTERIRANEM OKOLJU

Pri zamenjavi bidestilirane vode z devterirano vodo v fosfatnem pufru smo dobili sledeče rezultate vezavnih lastnosti ³H-tiotidina na vezavna mesta na astrocitih v primarni kulturi. Spremenile so se oblike krivulj pri celokupni, nespecifični in specifični vezavi. Krivulji celokupne in nespecifične vezave v devteriranem okolju sta bolj strmi, krivulja specifične vezave je pomaknjena navzdol (slika 12).

Vezavne parametre smo izračunali z metodo nelinearne regresije. Maksimalna gostota vezavnih mest histaminskega receptorja H₂ **v devteriranem okolju** je znašala **17,42 ± 5,2 fmol/mg proteina (v kontrolnih razmerah 21,95 ± 3,2 fmol/mg proteina)**. Ravnotežna disociacijska konstanta **K_D ³H-tiotidina v devteriranem okolju** je znašala **8,63 ± 5,0 nM (v kontrolnih razmerah 6,3 ± 1,9 nM)**. Povečal se je raztros vrednosti (slika 13 in preglednica VIII). Razlike niso bile statistično značilne ($p > 0,05$).



Slika 12: Saturacijska krivulja celokupne, nespecifične in specifične vezave ³H-tiotidina na histaminski receptor H₂ na astrocitih kot funkcija koncentracije radioliganda (0,15 M fosfatni pufer v devterirani vodi, pH = 7,4). Vrednosti so prikazane kot aritmetična sredina ± standardna napaka aritmetične sredine najmanj dveh poskusov, opravljenih v triplikatih.



Slika 13: Primerjava specifične vezave ³H-tiotidina na histaminski receptor H₂ na astrocitih kot funkcija koncentracije radioliganda v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H₂O) in v fosfatnem pufru v devterirani vodi (D₂O). Vrednosti so prikazane kot aritmetična sredina ± standardna napaka aritmetične sredine najmanj dveh poskusov, opravljenih v triplikatih. $p > 0,05$ (statistično neznačilna razlika).

Preglednica VIII: Primerjava vrednosti K_D [nmol/L] in B_{max} [fmol/mg proteina] specifične vezave ³H-tiotidina na histaminski receptor H₂ v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H₂O) in v fosfatnem pufru v devterirani vodi (D₂O). Vrednosti so podane kot aritmetična sredina ± standardna napaka aritmetične sredine.

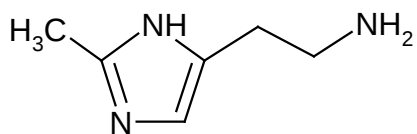
Vrednosti K_D in B_{max}		
	0,15 M fosfatni pufer v H ₂ O	0,15 M fosfatni pufer v D ₂ O
K_D [nmol/L]	$6,37 \pm 1,9$	$8,63 \pm 5,0$
B_{max} [fmol/mg proteina]	$21,95 \pm 3,2$	$17,42 \pm 5,2$

4.3. INHIBICIJA SPECIFIČNE VEZAVE ³H-TIOTIDINA V FOSFATNEM PUFRU

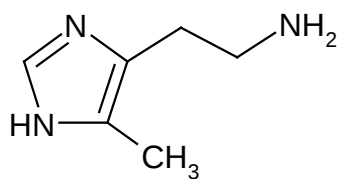
Z inhibicijskimi vezavnimi študijami smo želeli potrditi prisotnost receptorskih vezavnih mest za ³H-tiotidin na histaminskem receptorju H₂ na astrocitih možganske skorje neonatalnih podgan. Uporabili smo različne koncentracije ligandov v koncentracijskem območju od 10⁻¹⁰–10⁻⁵ M, ki so delovali kot inhibitorji specifične vezave in so izpodrivali vezan ³H-tiotidin z njegovih vezavnih mest. Agonisti na histaminskem receptorju H₂ so 4-metilhistamin, histamin, impromidin, medtem ko 2-metilhistamin deluje kot agonist na histaminskem receptorju H₁ (slika 14, slika 15, slika 16 in slika 17). Največjo afiniteto do vezave na histaminski receptor H₂ je imel 2-metilhistamin (**pIC₅₀ = 8,5 ± 0,16**), nato histamin (**pIC₅₀ = 7,6 ± 0,14**), 4-metilhistamin (**pIC₅₀ = 7,4 ± 0,25**) in najmanjšo afiniteto impromidin (**pIC₅₀ = 7,1 ± 0,18**) (slika 18 in preglednica IX).

S pomočjo Cheng-Prusoff-ove enačbe smo izračunali ravnotežno konstanto disociacije kompleksa receptor - inhibitor (K_i) za vsak uporabljen inhibitor, ki prikazuje afiniteto inhibitorja do receptorja. Izračunane vrednosti K_i so: 2-metilhistamin (**K_i = 1,6 nM**), histamin (**K_i = 13,8 nM**), 4-metilhistamin (**K_i = 23,1 nM**) in impromidin (**K_i = 46,4 nM**) (slika 18 in preglednica X).

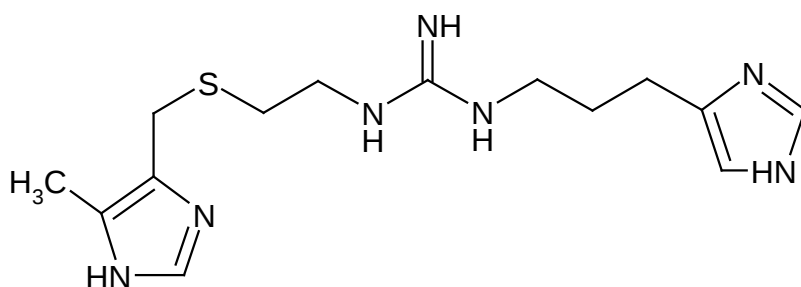
Strukturne formule inhibitorjev specifične vezave:



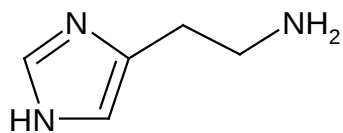
Slika 14: Molekula 2-metilhistamina.



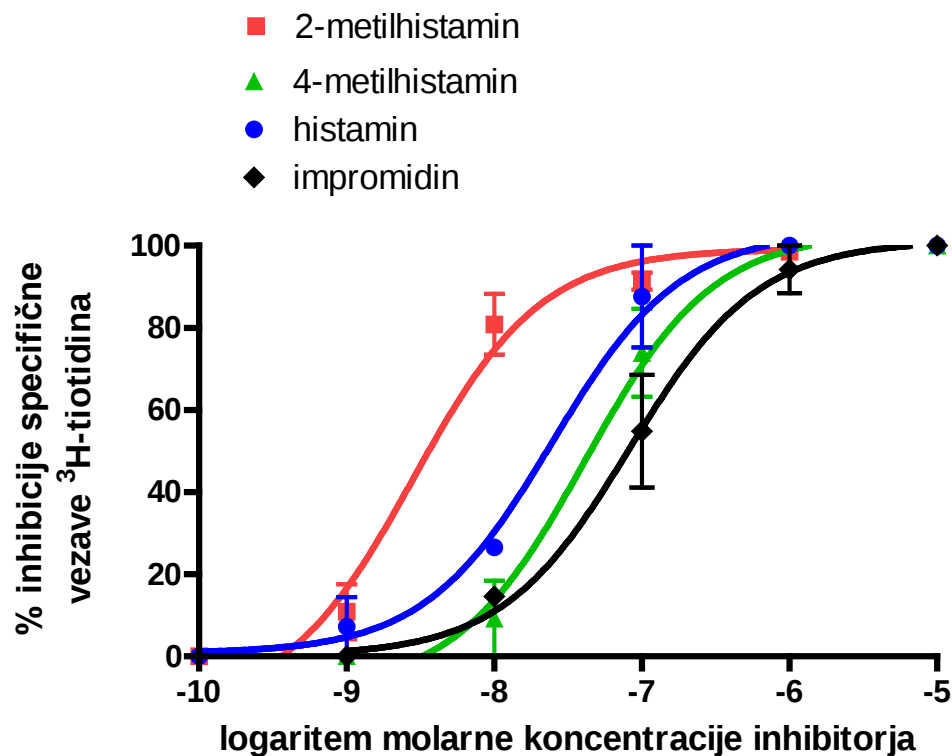
Slika 15: Molekula 4-metilhistamina.



Slika 16: Molekula impromidina.



Slika 17: Molekula histamina.



Slika 18: Krivulja inhibicije specifične vezave 3H -tiotidina na histaminski receptor H_2 v astrocitih kot funkcija različnih ligandov: 2-metilhistamin, 4-metilhistamin, histamin in impromidin (0,15 M fosfatni pufer, pH = 7,4). Vrednosti so prikazane kot aritmetična sredina $\pm$ standardna napaka aritmetične sredine najmanj dveh poskusov, opravljenih v triplikatih.

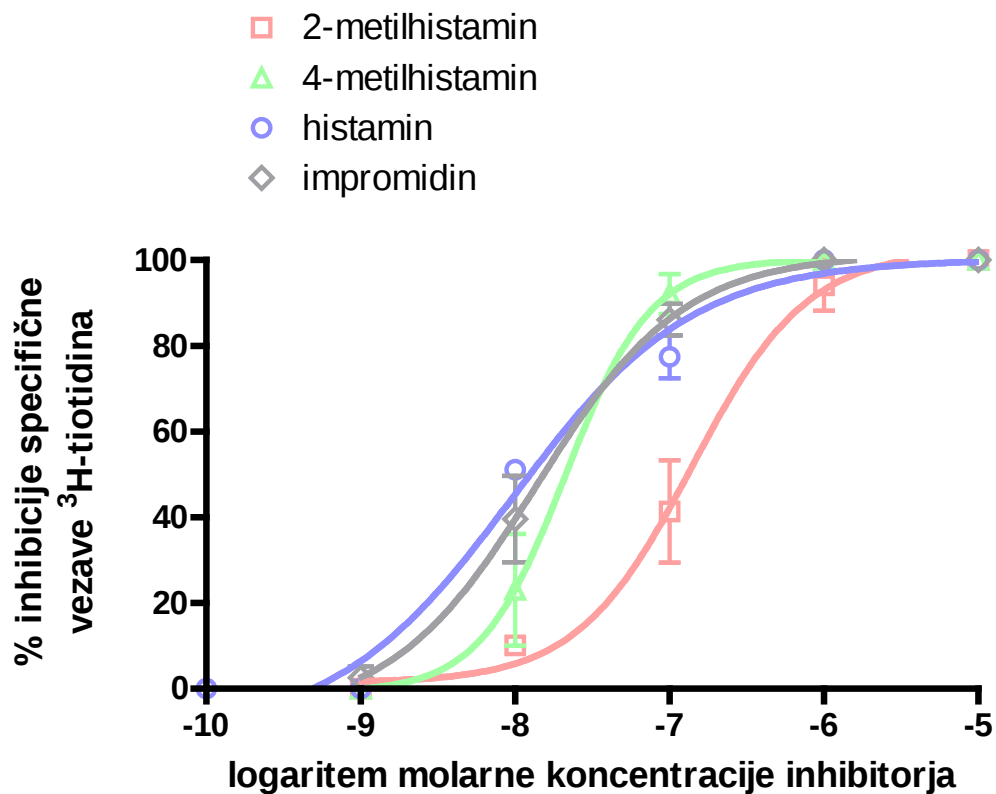
4.4. INHIBICIJA SPECIFIČNE VEZAVE ³H-TIOTIDINA V DEVTERIRANEM OKOLJU

Pri inhibicijskih vezavnih študijah v fosfatnem pufru v devterirani vodi smo dobili naslednje vrednosti K_i in IC₅₀ inhibitorjev.

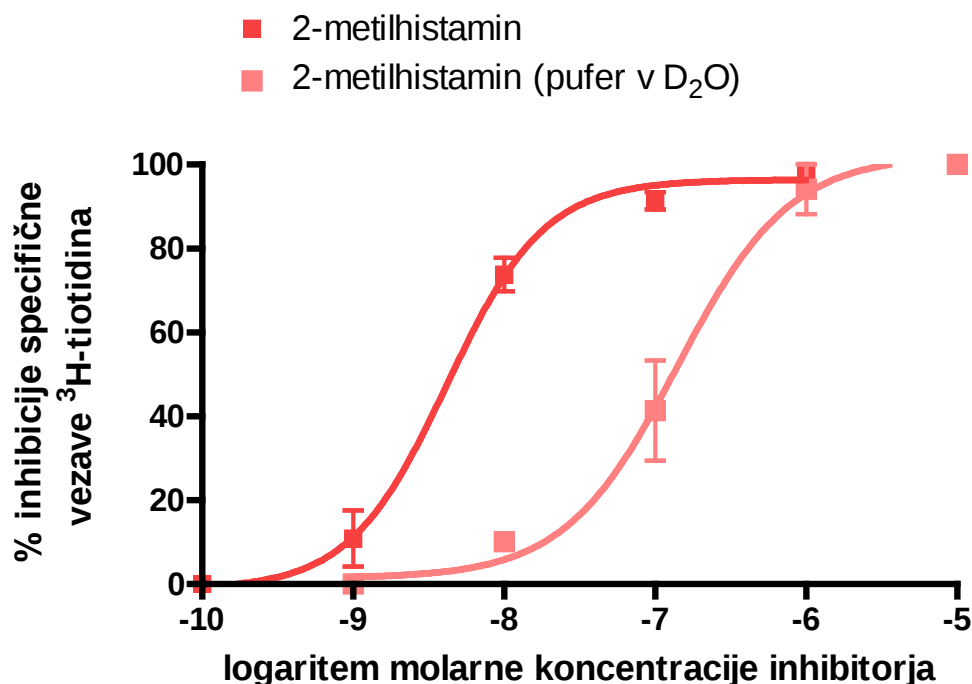
Afiniteta 2-metilhistamina se je spremenila, saj se je **pIC₅₀ zmanjšal iz 8,5 ± 0,16 na 6,8 ± 0,16**, pri 4-metilhistaminu in histaminu se **pIC₅₀ ni bistveno povečal**, in sicer pri 4-metilhistaminu **iz 7,4 ± 0,25 na 7,7 ± 0,13**, pri histaminu pa **iz 7,6 ± 0,14 na 8,0 ± 0,15**. **pIC₅₀ za impromidin se je povečal iz 7,1 ± 0,18 na 7,8 ± 0,14** (slika 19 preglednica IX).

Tudi pri vrednosti K_i je do največje spremembe prišlo pri 2-metilhistaminu, saj se je **K_i povečala iz 1,6 nM na 88,7 nM**, najbolj se je **K_i zmanjšala za impromidin, in sicer iz 46,4 nM na 8,6 nM**. **K_i za histamin se je zmanjšala iz 13,8 nM na 6,2 nM**, za 4-metilhistamin pa **iz 23,1 nM na 13,3 nM** (slika 19 in preglednica X).

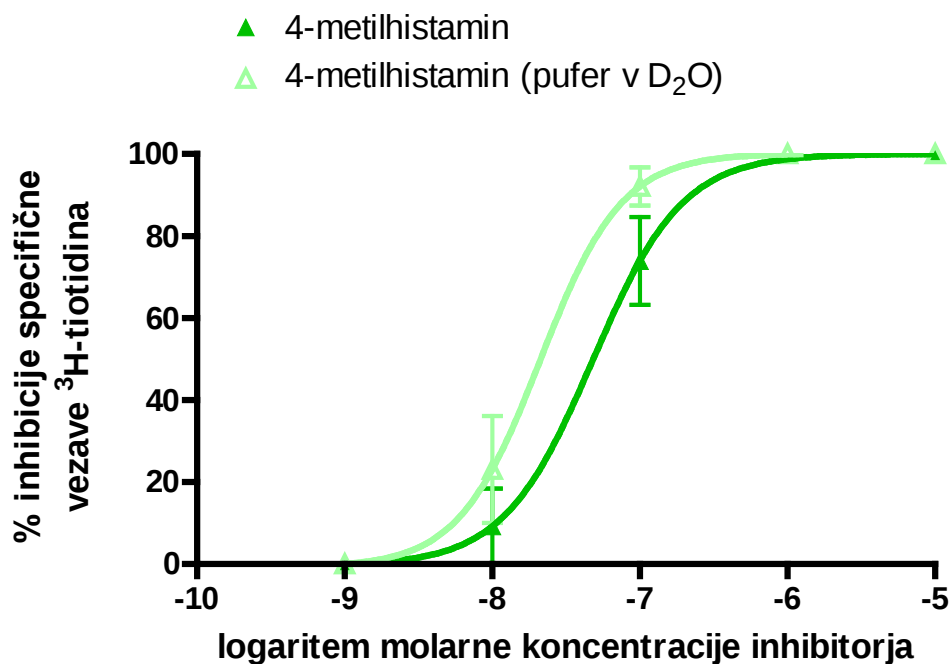
Do statistično značilnih razlik ($p < 0,05$) je prišlo pri **2-metilhistaminu ($p < 0,0001$)** in **impromidinu ($p < 0,0001$)** (slika 20 in slika 23).



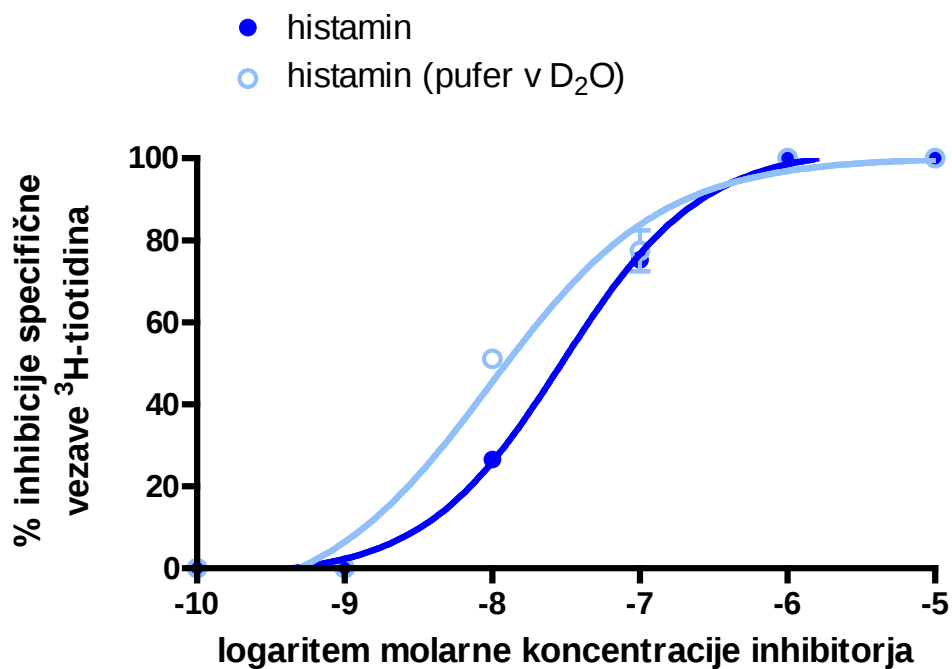
Slika 19: Krivulja inhibicije specifične vezave 3H -tiotidina na histaminski receptor H_2 v astrocitih kot funkcija različnih ligandov: 2-metilhistamin, 4-metilhistamin, histamin in impromidin (0,15 M fosfatni pufer v devterirani vodi, pH = 7,4). Vrednosti so prikazane kot aritmetična sredina $\pm$ standardna napaka aritmetične sredine najmanj dveh poskusov, opravljenih v triplikatih.



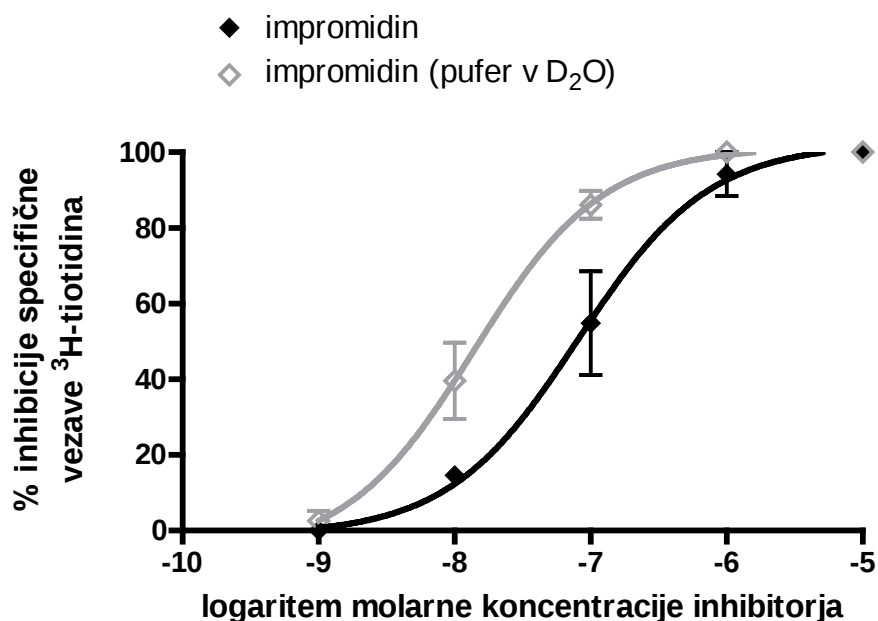
Slika 20: Primerjava inhibicije specifične vezave 3H -tiotidina na histaminski receptor H_2 na astrocitih kot funkcija logaritma različnih koncentracij 2-metilhistamina v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H_2O) in v fosfatnem pufru v devterirani vodi (D_2O). Vrednosti so prikazane kot aritmetična sredina $\pm$ standardna napaka aritmetične sredine najmanj dveh poskusov, opravljenih v triplikatih. Z uporabo Studentovega t-testa za neodvisne vzorce so izračunane p-vrednosti. Primerjali smo inhibicijo specifične vezave 3H -tiotidina v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi in v fosfatnem pufru v devterirani vodi ($p < 0,0001$).



Slika 21: Primerjava inhibicije specifične vezave 3H -tiotidina na histaminski receptor H_2 na astrocitih kot funkcija logaritma različnih koncentracij 4-metilhistamina v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H_2O) in v fosfatnem pufru v devterirani vodi (D_2O). Vrednosti so prikazane kot aritmetična sredina $\pm$ standardna napaka aritmetične sredine najmanj dveh poskusov, opravljenih v triplikatih. Z uporabo Studentovega t-testa za neodvisne vzorce so izračunane p-vrednosti. Primerjali smo inhibicijo specifične vezave 3H -tiotidina v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi in v fosfatnem pufru v devterirani vodi ($p = 0,1039$).



Slika 22: Primerjava inhibicije specifične vezave ^3H -tiotidina na histaminski receptor H_2 na astrocitih kot funkcija logaritma različnih koncentracij histamina v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H_2O) in v fosfatnem pufru v devterirani vodi (D_2O). Vrednosti so prikazane kot aritmetična sredina $\pm$ standardna napaka aritmetične sredine najmanj dveh poskusov, opravljenih v triplikatih. Z uporabo Studentovega t-testa za neodvisne vzorce so izračunane p-vrednosti. Primerjali smo inhibicijo specifične vezave ^3H -tiotidina v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi in v fosfatnem pufru v devterirani vodi ($p = 0,0508$).



Slika 23: Primerjava inhibicije specifične vezave 3H -tiotidina na histaminski receptor H_2 na astrocitih kot funkcija logaritma različnih koncentracij impromidina v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi (H_2O) in v fosfatnem pufru v devterirani vodi (D_2O). Vrednosti so prikazane kot aritmetična sredina $\pm$ standardna napaka aritmetične sredine najmanj dveh poskusov, opravljenih v triplikatih. Z uporabo Studentovega t-testa za neodvisne vzorce so izračunane p-vrednosti. Primerjali smo inhibicijo specifične vezave 3H -tiotidina v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi in v fosfatnem pufru v devterirani vodi ($p < 0,0001$).

Preglednica IX: Primerjava vrednosti pIC₅₀ za inhibitorje specifične vezave ³H-tiotidina na histaminski receptor H₂ v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi in v fosfatnem pufru v devterirani vodi. Vrednosti so podane kot aritmetična sredina ± standardna napaka aritmetične sredine. *** p < 0,0001.

Vrednosti pIC ₅₀		
inhibitor	0,15 M fosfatni pufer v H ₂ O	0,15 M fosfatni pufer v D ₂ O
2-metilhistamin ***	8,5 ± 0,16	6,8 ± 0,16
4-metilhistamin	7,4 ± 0,25	7,7 ± 0,13
histamin	7,6 ± 0,14	8,0 ± 0,15
impromidin ***	7,1 ± 0,18	7,8 ± 0,14

Preglednica X: Primerjava vrednosti K_i [nM] za inhibitorje specifične vezave ³H-tiotidina na histaminski receptor H₂ v fosfatnem pufru v bidestilirani vodi in v fosfatnem pufru v devterirani vodi.

Vrednosti K _i [nM]		
inhibitor	0,15 M fosfatni pufer v H ₂ O	0,15 M fosfatni pufer v D ₂ O
2-metilhistamin	1,6	88,7
4-metilhistamin	23,1	13,3
histamin	13,8	6,2
impromidin	46,4	8,6

5. RAZPRAVA

Astroцити so najštevilčnejše celice glije. Imajo edinstveno lastnost sposobnosti spreminjanja svoje oblike in funkcije med življenjem v skladu s spremembami v neposrednem okolju. Na svoji površini izražajo številne biološko pomembne molekule, med njimi tudi transportne proteine in receptorje (25). Do sedaj so identificirali histaminske receptorje H₁, H₂ in H₃ na površini astroцитов (27, 28).

Histamin je prisoten v večini telesnih tkiv in je zelo pomemben endogeni mediator. Ima pomembno vlogo pri vnetnih procesih in alergičnih reakcijah. Stimulira sekrecijo želodčne kisline, povzroča kontrakcijo gladkih mišic in vpliva na frekvenco ter moč delovanja srca. Neželeni sedativni učinki prve generacije antagonistov histaminskih receptorjev H₁ so usmerili pozornost na učinek in vlogo histamina v možganih. Histamin v osrednjem živčevju deluje kot nevrottransmitter in je udeležen pri številnih procesih. Ima pomembno vlogo pri regulaciji ciklusa spanje-budnost, sodeluje pri regulaciji cirkadianega ritma, termoregulaciji, regulaciji hranjenja in sekreciji hormonov. Histaminergičnemu sistemu v osrednjem živčevju pripisujejo vlogo pri številnih nevroloških boleznih in motnjah. Svoje učinke v osrednjem živčevju posreduje preko aktivacije histaminskih receptorjev: H₁, H₂, H₃ in H₄ (4, 12). Vsi podtipi histaminskih receptorjev spadajo v razred II. farmakoloških receptorjev, to so metabotropni receptorji, ki za prenos informacije v celico potrebujejo sklopitev s proteinom G. Histaminski receptorji H₁ in H₃ so udeleženi pri sproščanju nevrotrofičnih dejavnikov, kot sta živčni rastni dejavnik (NGF) in nevrotrofični dejavnik 3 (NF-3), iz astroцитов, medtem ko učinki, ki jih posreduje aktivacija histaminskega receptorja H₂ na astroцитih, še niso poznani. Histaminski receptor H₂ smo izbrali za modelni sistem, ker ima poznano primarno strukturo, ki je ena najkrajših pri vezavi endogenega liganda in ker ne posreduje učinkov, ki bi motili opazovano reakcijo vezave ligandov na receptor.

Z metodo usmerjene mutageneze so ugotovili stukturne fragmente histaminskega receptorja H₂, ki so pomembni pri vezavi histamina in ligandov na receptor. Histaminski receptor H₂ vsebuje sedem hidrofobnih transmembranskih področjih, zunajcelično končno aminsko verigo, ki vključuje N-glikozilacijsko mesto in znotrajcelično končno karboksilno verigo. Aminokislina Asp⁹⁸ na tretjem transmembranskem področju naj bi predstavljala

primarno vezavno mesto za pozitivno nabiti dušikov atom na alifatski verigi molekule histamina. Asp¹⁸⁶ in Thr¹⁹⁰/Tyr¹⁸² na petem transmembranskem področju naj bi imela ključno vlogo pri tvorbi vodikovih vezi z dušikovimi atomi v imidazolnem obroču histamina (3, 4, 6, 16).

Kemijske vezi imajo pomembno vlogo pri vezavi liganda na farmakološki receptor, saj je od tipa in moči kemijskih vezi odvisna afiniteta med ligandom in receptorjem. Pri interakciji histamina z receptorjem ima pomembno vlogo vodikova vez. Če v inkubacijskem mediju zamenjamo vodikove atome z devterijevimi, ki so dvakrat težji, se z njimi zamenjajo bolj izpostavljeni izmenljivi protoni (-OH, -COOH, -NH₂) v biomolekulah (receptor) in v ligandu, ki se veže na ta receptor. Zaradi tega se spremenijo intermolekularne in intramolekularne razdalje. Posledično se spremeni afiniteta vezave liganda na receptor.

V naši raziskavi smo želeli opredeliti vezavna receptorska mesta na histaminskem receptorju H₂ na astrocitih neonatalnih podgan, vzgojenih v primarni kulturi, ter določiti molekularno-farmakološke lastnosti receptorja. V drugem delu diplomske naloge smo želeli pokazati ključno vlogo, ki jo igra vodikova vez pri vezavi ligandov na histaminski receptor H₂, in kako inkubacija astrocitov in ligandov v devterirani vodi spremeni vezavne lastnosti histaminskega receptorja H₂.

V prvem delu naloge smo z vezavnimi poskusi identificirali histaminski receptor H₂ na astrocitih neonatalnih podgan, vzgojenih v primarni kulturi. Uporabili smo s tricijem označen tiotidin, ki je močan antagonist histaminskih receptorjev H₂ in se selektivno veže na ta podtip receptorjev. Potrdili smo prisotnost homogene populacije vezavnih mest z maksimalno gostoto vezavnih mest $21,95 \pm 3,2$ fmol/mg proteina (slika 13 in preglednica VIII). Specifična vezava ³H-tiotidina je bila nasitljiva in reverzibilna v območju od 1–15 nM, kar dokazuje omejeno število receptorskih vezavnih mest na astrocitih (slika 11). Ravnotežna disociacijska konstanta znaša $6,3 \pm 1,9$ nM in nakazuje na visoko afiniteto ³H-tiotidina do vezavnih mest na histaminskem receptorju H₂ (slika 13 in preglednica VIII). Potrdili smo prvo hipotezo.

Reverzibilnost, nasitljivost in velika afiniteta radioliganda, so kriteriji, ki definirajo vezavo radioliganda na receptorska vezavna mesta, prav tako pa veljajo za vezavo na akceptorska vezavna mesta. Z uporabo inhibicijskih vezavnih študij potrdimo, da vezavna mesta, ki jih

je označil ³H-tiotidin predstavljajo receptorska vezavna mesta. To dosežemo z izpodrivanjem vezanega radioliganda s sorodnimi, vendar kemično različnimi predstavniki iste farmakološke skupine, kot je radioligand, ki se vežejo na ta podtip receptorja (4).

Rezultati inhibicijskih poskusov, kjer smo z inhibitorji specifične vezave izpodrivali specifično vezan ³H-tiotidin z njegovih vezavnih mest, so potrdili prisotnost specifičnih vezavnih mest. Uporabili smo različne koncentracije ligandov (4-metilhistamin, histamin, impromidin in 2-metilhistamin), ki so delovali kot kompetitivni inhibitorji in so v visokih koncentracijah popolnoma izpodrinili ³H-tiotidin z njegovih vezavnih mest. Največjo afiniteto do izpodrivanja ³H-tiotidina je pokazal 2-metilhistamin, nato histamin, 4-metilhistamin in najmanjšo afiniteto impromidin (slika 18), kar je nekoliko presenetljivo, saj je 2-metilhistamin agonist histaminskih receptorjev H₁. Morda se je 2-metilhistamin obnašal kot antagonist histaminskih receptorjev H₂, za katere je značilna večja afiniteta do izpodrivanja vezanega radioliganda kot za agoniste. Potrdili smo drugo hipotezo.

Afiniteta impromidina (pIC₅₀ = 7,2), ki smo jo dobili v naših vezavnih poskusih, je podobna afiniteti za impromidin (pIC₅₀ = 7,1), ki jo navaja podatkovna baza farmakoloških receptorjev IUPHAR (29), medtem, ko je afiniteta histamina do izpodrivanja vezanega ³H-tiotidina z vezavnih mest na astrocitih večja od afinitete (pIC₅₀ = 7,6), ki jo navaja omenjena podatkovna baza (pIC₅₀ = 3,8). Afinitete za agoniste, ki jih dobimo v vezavnih študijah, so drugačne od afinitet, ki se jih dobi v funkcijskih študijah. Pri vezavnih študijah namreč opazujemo udeležbo vseh vezavnih mest, medtem ko je pri funkcijskih študijah včasih zadosti že minimalna zasedenost receptorjev z agonistom, da se sproži maksimalni učinek. Najbolj verodostojne vrednosti afinitet agonistov pri vezavnih študijah opazimo v modelnih sistemih, ki normalno ne izražajo tega podtipa receptorja, in zato v te celice receptorje vnesemo s transfekcijo in nemoteno opazujemo interakcijo agonist - receptor.

V drugem delu naše raziskave smo ponovili poskus, vendar smo za inkubacijski medij uporabili pufer z devterirano vodo. Zanimalo nas je, kako devteracija vpliva na vezavne lastnosti histaminskega receptorja H₂ na astrocitih neonatalnih podgan, vzgojenih v primarni kulturi. Vzorec proteinov in ligande smo inkubirali v pufru z devterirano vodo, saj pri proteinih proces devteracije steče že, če proteine inkubiramo v devterirani vodi. Prišlo je do izmenjave vodikovih atomov, vezanih na elektronegativne atome, z atomi

devterija. S tem se je spremenila jakost intramolekularnih in intermolekularnih vodikovih vezi, zato so se spremenili vezavni parametri ligandov na histaminski receptor H₂.

Rezultati saturacijske vezave ³H-tiotidina v devteriranem sistemu kažejo, da so se spremenile oblike krivulj celokupne, nespecifične in specifične vezave. Krivulji celokupne in nespecifične vezave sta bolj strmi, krivulja specifične vezave se je pomaknila navzdol (slika 12). Maksimalna gostota vezavnih mest v devteriranem okolju je znašala $17,42 \pm 5,2$ fmol/mg proteina v kontrolnih razmerah pa $21,95 \pm 3,2$ fmol/mg proteina, kar sicer ne predstavlja statistično značilne razlike (slika 13 in preglednica VIII). Tendenco do zmanjšanja gostote vezavnih mest si lahko razložimo s tem, da se je zaradi sprememb v strukturi radioliganda in receptorja, kjer so se izmenljivi vodiki/protoni zamenjali z devterijem, manj molekul ³H-tiotidina v istem času vezalo na vezavna mesta. Dodatek devterirane vode je povzročil, da se je zmanjšala afiniteta radioliganda ³H-tiotidina do vezavnih mest na primarni kulturi astrocitov. Ker se je povečala masa radioliganda in so se spremenile razdalje v vezeh, je bilo potrebno več radioliganda, da je zasedel polovico vezavnih mest.

Pri inhibicijskih vezavnih študijah v fosfatnem pufru v devterirani vodi se je spremenila afiniteta inhibitorjev do izpodrivanja specifično vezanega ³H-tiotidina. Najbolj se je spremenila moč izpodrivanja 2-metilhistaminu, histaminu in 4-metilhistaminu se je nekoliko povečala, največ se je pa povečala impromidinu. Vrstni red po moči izpodrivanja specifične vezave ³H-tiotidina se je spremenil iz: 2-metilhistamin > histamin > 4-metilhistamin > impromidin (H₂O) na sledeči vrstni red: histamin > impromidin > 4-metilhistamin > 2-metilhistamin (D₂O) (preglednica IX). Zaradi vpliva devteracije so se spremenile afinitete, vendar je do statistično značilnih razlik prišlo le pri 2-metilhistaminu ($p < 0,0001$) in pri impromidinu ($p < 0,0001$) (slika 20 in slika 23). Tretjo hipotezo smo delno potrdili.

Sprememba afinitet do izpodrivanja vezanega ³H-tiotidina, ki so jo izkazali omenjeni ligandi, dokazuje, da so se spremenile strukturne lastnosti omenjenih ligandov in zaradi tega njihove vezavne lastnosti. Spremembe afinitet niso bile enotne; pri 2-metilhistaminu se je afiniteta zmanjšala, pri 4-metilhistaminu, histaminu in impromidinu pa povečala. Zaključimo lahko, da pri vezavi ³H-tiotidina in agonistov histaminskih receptorjev na vezavna mesta na astrociti sodelujejo vodikove vezi. Če v inkubacijski tekočini

nadomestimo molekule vodika z devterijem, pride do strukturnih sprememb ligandov in vezavnih mest, kar se odraža s spremenjeno afiniteto ligandov do teh vezavnih mest. Spremembe v afinitetah niso enotne, afiniteta nekaterih ligandov se poveča, afiniteta 2-metilhistamina do vezanega ³H-tiotidina se je zmanjšala.

Ta raziskava je eden prvih korakov k razumevanju učinka devteracije na aktivacijo receptorjev. V bodoče bi bilo zanimivo preveriti s funkcijskimi študijami, če se zaradi nuklearnega kvantnega učinka spremenijo funkcionalne lastnosti opazovanih ligandov. Aktivacija receptorjev je kompleksen pojav, katerega razumevanje je še nepopolno. Vsak majhen korak naprej v tej smeri je lahko pomemben za načrtovanje novih zdravil.

6. SKLEP

V naši raziskavi smo najprej želeli potrditi prisotnost histaminskih receptorjev H_2 na astrocitih neonatalnih podgan, vzgojenih v primarni kulturi, in opredeliti vezavne lastnosti histaminskega receptorja H_2 . V drugem delu smo ugotavljali pomen vodikove vezi pri interakciji ligand – receptor in vpliv devteracije na spremembo vezavnih lastnosti histaminskega receptorja H_2 .

Potrdili smo dve in delno potrdili eno od zastavljenih hipotez:

1. Dokazali smo prisotnost histaminskih receptorjev H_2 na astrocitih neonatalnih podgan, vzgojenih v primarni kulturi. Uporabili smo radioligand 3H -tiotidin, katerega vezava je bila nasitljiva in reverzibilna in je potrdila prisotnost homogene populacije vezavnih mest z maksimalno gostoto vezavnih mest $21,95 \pm 3,2$ fmol/mg proteina. Ravnotežna disociacijska konstanta, ki je znašala $6,3 \pm 1,9$ nM, nakazuje na visoko afiniteto 3H -tiotidina do vezavnih mest na histaminskem receptorju H_2 .
2. Z inhibicijskimi vezavnimi poskusi smo potrdili prisotnost receptorskih vezavnih mest. Različni ligandi, ki so delovali kot kompetitivni inhibitorji histaminskega receptorja H_2 , so v visokih koncentracijah popolnoma izpodrinili 3H -tiotidin z njegovih specifičnih vezavnih mest. Iz tega lahko sklepamo, da specifična vezavna mesta, kamor se je vezal 3H -tiotidin, pripadajo histaminskemu receptorju H_2 .
3. V devteriranem sistemu je prišlo do izmenjave vodikovih atomov, vezanih na elektronegativne atome, z atomi devterija, kar je spremenilo moč vodikovih vezi in vezavne parametre ligandov na histaminski receptor H_2 , vendar ni bistveno vplivalo na maksimalno gostoto vezavnih mest. Spremenile so se afinitete inhibitorjev do izpodrivanja specifično vezanega 3H -tiotidina. Spremembe niso bile enotne, 2-metilhistaminu se je afiniteta zmanjšala, histaminu, 4-metilhistaminu in impromidinu pa se je povečala. Do statistično značilnih razlik pa je prišlo samo pri 2-metilhistaminu in impromidinu.

Zaključimo lahko, da vodikove vezi sodelujejo pri vezavi ³H-tiotidina in agonistov na histaminski receptor H₂ na astrocitih neonatalnih podgan. Devterirana voda vpliva na vezavo agonistov na histaminski receptor H₂, saj pri devteraciji pride do spremembe razdalje in jakosti vodikovih vezi. To pa vpliva na afiniteto ligandov do vezavnih mest in na vezavne lastnosti histaminskega receptorja H₂.

7. LITERATURA

- 1) Rang HP, Dale MM, Ritter J M, Flower RJ: Rang & Dale's Pharmacology, 6th Edition, Churchill Livingstone, Oxford, 2007: 8-53, 213-4, 503.
- 2) Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A: International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. Pharmacological Reviews 2003; 55: 597-606.
- 3) Del Valle J, Gantz I: Novel insights into histamine H₂ receptor biology. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology 1997; 273: 987-96.
- 4) Kržan M: Razporeditev, značilnosti, pomen in vloga histaminskih receptorjev H₁ in H₂ v srcu. Doktorska disertacija, Medicinska fakulteta, 1995.
- 5) Williams DA, Lemke TM: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2002: 86-88, 794-8.
- 6) Siegel GJ: Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects, 7th Edition, Elsevier Academic Press, Burlington, 2006: 249-65.
- 7) Perdan-Pirkmajer K, Mavri J, Kržan M: Histamine reuptake by astrocytes: an experimental and computational study. Journal of Molecular Modeling 2010; 743-53.
- 8) Rajtar S: Vpliv amitriptilina in sertralina na kinetiko eksogenega histamina v krvi mačke v in vitro poskusih. Medicinski razgledi 2004; 43: 339-49.
- 9) Benarroch EE: Histamine in the CNS. Multiple functions and potential neurologic implications. Neurology 2010; 57: 1472-79.
- 10) Cooper JR, Bloom FE, Roth RH: The Biochemical Basis of Neuropharmacology, 7th Edition, Oxford University Press, New York, 1996: 392-5.
- 11) Brown RE, Stevens DR, Haas HL: The Physiology of brain Histamine. Progress in Neurobiology 2001; 63: 637-72.

- 12) Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O: Histamine in the Nervous System. *Physiological Reviews* 2008; 88: 1183-241.
- 13) Kenakin T: A Pharmacology Primer: Theory, Application and Methods, 2nd Edition, Elsevier Academic Press, San Diego, 2006: 2-3, 59-67.
- 14) Wess J, Han SJ, Kim SK, Jacobson KA, Li JH: Conformational changes involved in G-protein-coupled-receptor activation. *Trends in Pharmacological Sciences* 2008; 29 (12): 616-25.
- 15) de Esch IJP, Thurmond RL, Jongejan A, Leurs R: The Histamine H₄ receptor as a new therapeutic target for inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences* 2005; 26: 462-9.
- 16) Pestotnik K: Vpliv devteracije na vezavne lastnosti histaminskega receptorja H₂ v astrocitih neonatalnih podgan. Diplomsko naloga, Univerza v Ljubljani fakulteta za farmacijo, 2010.
- 17) Kržan M: Opredelitev farmakoloških receptorjev. Dosegljivo na: <http://www.mf.uni-lj.si/dokumenti/b2986b66a9093242a1df855a18d1e203>. Dostop: 19. 6. 2011.
- 18) Motulsky H: The GraphPad Guide to Analyzing Radioligand Binding Data. Dosegljivo na: <http://www.graphpad.com/www/radiolig/radiolig.pdf>. Dostop: 20. 7. 2011.
- 19) Sheu SY, Schlag EW, Selzle HL, Yang DY: Molecular Dynamics of Hydrogen Bonds in Protein - D₂O: The Solvent Isotope Effect. *Journal of Physical Chemistry A* 2008; 112: 797-802.
- 20) Jasnin M: Atomic-scale dynamics inside living cells explored by neutron scattering. *Journal of the Royal Society Interface* 2009; 6: 611-7.
- 21) Klaholz BP, Moras D: C-H---O Hydrogen Bonds in the Nuclear Receptor RAR γ – a Potential Tool for Drug Selectivity. *Structure* 2002; 10: 1197-204.
- 22) Goodey NM, Benkovic SJ: Allosteric regulation and catalysis emerge via a common route. *Nature Chemical Biology* 2008; 4: 474-82.

- 23) Efimova YM, Haemers S, Wierczinski B, Norde W: Stability of Globular Proteins in H₂O and D₂O. *Biopolymers* 2006; 85: 264-73.
- 24) Stare J: Dinamika in struktura sistemov s kratkimi vodikovimi vezmi. Doktorska disertacija, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2003.
- 25) Kržan M: Funkcija astrocitov. *Zdravniški vestnik* 2001; 70: 553-9.
- 26) Schwartz JP, Wilson DJ: Preparation and characterization of type 1 astrocytes cultured from adult rat cortex, cerebellum and striatum. *Glia* 1992; 5: 75-80.
- 27) Lipnik-Štangelj M, Čarman-Kržan M: The influence of histamine H₁, H₂ and H₃-receptor antagonists on histamine stimulated NGF release from cultured astrocytes. *Inflammation Research* 2001, 50: 84-5.
- 28) Jurič DM, Mele T, Čarman-Kržan M: Involvement of histaminergic receptor mechanisms in the stimulation of NT-synthesis in astrocytes. *Neuropharmacology* 2011; 60 (7-8): 1309-17.
- 29) Chazot P, Fukui H, Ganellin CG, Haas HL, Hill SJ, Hills R, et al: Histamine receptors: H₂. 2010. IUPHAR database (IUPHAR-DB), <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=263>. Dostop: 22. 8. 2011.