

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ROK MARTINČIČ

VPLIV DEKSAMETAZONA NA PRIVZEM HISTAMINA
V ASTROCITE PODGAN PO ODTEGNITVI KISIKA IN
HRANIL

THE EFFECT OF DEXAMETHASONE ON HISTAMINE
UPTAKE INTO RAT ASTROCYTES AFTER OXYGEN
AND GLUCOSE DEPRIVATION

Ljubljana, 2011

Diplomska naloga predstavlja zaključek študija farmacije na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Diplomsko delo je bilo opravljeno na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo na Medicinski fakulteti v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Mojce Kržan.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mojci Kržan za vso vzpodbudo, nasvete, pomoč in potrpežljivost. Zahvala gre tudi tehnični sodelavki Jožici Košir za vso prijaznost in pomoč pri delu.

Zahvaljujem se tudi svoji mami, ki mi že vse življenje nesebično stoji ob strani, ter sestri in puncu, za vso vzpodbudo in prijazne besede.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod vodstvom mentorice prof. dr. Mojce Kržan.

Rok Martinčič

KAZALO

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	V
1. UVOD	1
1.1 CENTRALNI ŽIVČNI SISTEM	1
1.1.1 NEVRONI	1
1.1.2 AKCIJSKI POTENCIAL	1
1.1.3 NEVROGLIJA	2
1.1.4 KOMUNIKACIJA PREKO SINAPS	5
1.2 NEVROTRANSMITERJI	9
1.2.1 LASTNOSTI NEVROTRANSMITERJEV	9
1.2.2 DELITEV NEVROTRANSMITERJEV	10
1.2.3 TRANSPORT NEVROTRANSMITERJEV	11
1.3 HISTAMIN	12
1.3.1 HISTAMIN V CENTRALNEM ŽIVČNEM SISTEMU	13
1.3.2 SINTEZA HISTAMINA V CŽS	13
1.3.3 CENTRALNI HISTAMINERGIČNI SISTEM	14
1.3.4 HISTAMINSKI RECEPTORJI	16
1.3.5 PRIVZEM IN INAKTIVACIJA HISTAMINA	18
1.4 MOŽGANSKA KAP	21
1.4.1 EKSCITOTOKSIČNOST IN ENERGETSKA IZČRPANOST	22
1.4.2 PERI-INFARKTNE DEPOLARIZACIJE	24
1.4.3 VNETJE	24
1.4.4 APOPTOZA/NEKROZA	25
1.4.5 VLOGA ASTROCITOV PRI MOŽGANSKI KAPI	26
1.4.6 VLOGA HISTAMINA PRI MOŽGANSKI KAPI	27
1.4.7 DEKSAMETAZON PRI ZDRAVLJENJU MOŽGANSKE KAPI	28
2. NAMEN DELA IN DELOVNA HIPOTEZA	31
3. MATERIALI IN OPREMA	32
3.1 MATERIALI	32
3.2 OPREMA	33

4. METODE	34
4.1 POSKUSNE ŽIVALI	34
4.2 PRIPRAVA PRIMARNIH KULTUR ASTROCITOV	34
4.3 PRIVZEM HISTAMINA V KULTURE ASTROCITOV	35
4.3.1 PRIPRAVA TESTNIH PLOŠČ	35
4.3.2 POSKUS	36
4.4 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PRIVZETEGA HISTAMINA	36
4.5 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV (METODA PO BRADFORDU)	37
4.6 ANALIZA PODATKOV	37
4.6.1 PRIVZEM HISTAMINA	37
4.6.2 VPLIV DEKSAMETAZONA NA PRIVZEM	38
5. REZULTATI	39
5.1 PRIVZEM HISTAMINA V ODVISNOSTI OD KONCENTRACIJE HISTAMINA	39
5.1.1. CELOKUPNI PRIVZEM	39
5.1.2. SPECIFIČNI PRIVZEM	41
5.2 VPLIV DEKSAMETAZONA NA PRIVZEM HISTAMINA	44
6. RAZPRAVA	46
7. SKLEPI	53
8. LITERATURA	54

POVZETEK

Ena izmed funkcij astrocitov je vzdrževanje homeostaze v možganih. Na svoji membrani izražajo številne transporterje, preko katerih privzemajo v zunajcelični prostor sproščene neurotransmiterje, tudi histamin. Čeprav specifičen transporter za histamin na astrocitih še ni poznan, je znano, da astrociti privzemajo histamin z aktivnim transportom in elektrodifuzijo.

V diplomskem delu smo želeli ugotoviti, kako se spremenijo lastnosti privzema histamina, če kulture astrocitov prehodno izpostavimo hipoksiji ter odstranimo glukozo in serum, ter kako na funkcijo privzema histamina vpliva dodatek deksametazona pred oziroma po hipoksiji.

Poskuse smo izvedli v primarnih kulturah astrocitov. Po 3 tednih v drugi pasaži (ko kulture postanejo konfluentne) smo hranilni medij zamenjali z medijem brez dodane glukoze in seruma ter jih izpostavili hipoksičnim razmeram z 0,2 % O₂ in 5 % CO₂; to je trajalo 1, 3 oz. 6 ur. Nato smo medij znova zamenjali z gojilnim in celice za 21 ur prestavili v inkubator s 95 % zrakom in 5 % CO₂. Značilnosti in spremembe privzema histamina v astrocite po hipoksiji in reperfuziji smo ugotavljali s pomočjo radioaktivno označenega ³H-histamina.

Pomanjkanje kisika in hranil povzroči funkcionalne poškodbe astrocitov, kar vpliva na lastnosti transporta histamina. Pomanjkanje kisika in hranil ni imelo značilnega vpliva na celokupni privzem histamina v primerjavi s kontrolo, pokazale pa so se značilne razlike pri primerjavi parametrov specifičnega privzema; po vseh eksperimentalnih ishemijah je maksimalen specifični privzem zmanjšan vsaj za dvakrat v primerjavi s kontrolo. Značilne so bile tudi razlike pri primerjavi Michaelis-Mentenove konstante specifičnega privzema. Dodatek deksametazona na privzem histamina ni imel vpliva, saj pri primerjavi privzema ni bilo statistično značilnih razlik med kontrolo in kulturami, ki so bile izpostavljene ishemiji. Prav tako se ni izkazala nobena razlika, če smo deksametazon dodali pred eksperimentalno ishemijo ali po njej.

Zaključimo lahko, da izpostavitve astrocitov pomanjkanju kisika in hranil vpliva na kinetične lastnosti, ne pa na količino celokupno privzetega histamina in delovanje deksametazona.

ABSTRACT

One of the many astrocyte functions is the maintenance of homeostasis in the brain. Astrocytes express many different transporters on their membranes, through which the uptake of released neurotransmitters, including histamine, takes place. Histamine is taken up into astrocytes by passive electrodiffusion and by active transport, although the specific histamine transporter hasn't been yet determined.

Our goal was to determine, how the characteristic of histamine uptake into astrocytes change, if the astrocyte cultures are previously exposed to oxygen and glucose deprivation (OGD). We were also interested in the effect of dexamethasone on histamine uptake, added prior to or after the OGD.

The experiments were performed on primary cultures of astrocytes prepared from neonatal rats. Confluent astrocyte cultures after three weeks in the second passage were incubated in glucose and serum deprived medium under hypoxic conditions, 0,2 % O₂ in 5 % CO₂ for 1, 3 or 6 hours. Thereafter the medium was replaced with a normal one and cultures were incubated in 95 % air and 5 % CO₂ for additional 21 hours (reperfusion). Histamine uptake was initiated by exposing astrocytes to tritium marked histamine.

Glucose and oxygen deprivation causes functional damage of astrocytes, which affect the characteristics of histamine uptake. The effect on total histamine uptake wasn't significant, but the parameters of specific histamine uptake were significantly different from the control values; in each case, OGD caused at least a double reduction in the maximal specific uptake value, comparing to the control. The differences in Michaelis-Menten constant were also significant. Addition of dexamethasone to the astrocyte culture didn't have an effect on total histamine uptake after OGD. Also, there were no significant differences in the uptake, if dexamethasone was added prior to or after the oxygen and glucose deprivation.

We can conclude, that the exposure of astrocyte cultures to OGD affects the kinetic properties of histamine uptake, but not the total histamine uptake or the impact of dexamethasone.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABC - prenašalec z ATP-vezavno domeno - ATP binding cassette

AP - akcijski potencial

ATP - adenzin trifosfat

cAMP - ciklični adenzin monofosfat

CŽS - centralni živčni sistem

DMEM - po Dulbeccu spremenjen Eaglov medij - Dulbecco's modified Eagle medium

GABA - γ -amino butirna kislina

GFAP - glialni fibrilarni acidni protein

GPCR - z G-proteinom sklopljeni receptorji - G-protein coupled receptors

GSH - glutation

HDC - histidin dekarboksilaza

HNMT - histamin N-metiltransferaza

KMB - krvno možganska bariera

MATE - transportni protein za razna zdravila in toksine - multidrug and toxin antiporters

NMDA - N-metil D-aspartatni receptor

OCT - transporter za organske katione - organic cation transporter

OGD - odtegnitev kisika in glukoze - oxygen-glucose deprivation

PARP - poli(ADPriboza)polimeraza

PMAT - membranski transporter za monoamine - plasma membrane monoamine transporter

REM - hitro očesno gibanje (faza spanja) - rapid-eye-movement

ROS - reaktivne kisikove spojine - reactive oxygen species

SLC - družina membranskih transportnih proteinov - solute carrier transporters

tMH - tele-metilhistamin

1. UVOD

1.1 CENTRALNI ŽIVČNI SISTEM

1.1.1 NEVRONI

Živčni sistem je zgrajen iz živčnih celic, oz. nevronov in njihovih podpornih celic, oz. glije. Človeško telo ima približno 10 milijard nevronov, celic glije pa je še približno 10 do 50-krat več (1, 2, 3).

Nevron je sestavljen iz celičnega telesa in izrastkov. Telo nevrona je relativno majhno, vendar predstavlja metabolni center celice, zato poleg jedra z genskim materialom vsebuje tudi obilico mitohondrijev in endoplazmatski retikulum, kjer se sintetizirajo celični proteini. Iz telesa nevrona rasteta dve vrsti izrastkov; več kratkih dendritov in en dolg, tubularni akson. Dendriti so razvejani, njihova naloga pa je sprejemanje in procesiranje signalov iz drugih nevronov. Nasprotno so aksoni namenjeni prenašanju signalov k drugim nevronom; pri internevrnih aksoni ostajajo v izvorni regiji CŽS in so dolgi od par milimetrov do par centimetrov, v primeru projekcijskih nevronov, ki pošiljajo aksone na periferijo, pa so lahko dolgi tudi do 3 metrov (1, 2).

Nevroni se stikajo z drugimi nevroni, mišičnimi in drugimi tarčnimi celicami, raznimi čutilnimi senzorji, itd. Osnova delovanja CŽS je prevajanje elektro-kemičnih impulzov, imenovanih tudi akcijski potenciali. Glede na smer prevajanja signala lahko nevrone delimo na aferentne, ki prevajajo v smeri proti osrednjemu živčevju, eferentne, ki prevajajo v smeri od osrednjega živčevja ter internevrone, ki povezujejo aferentne in eferentne nevrone ter omogočajo modulacijo prenosa s pomočjo ekscitatornih in inhibitornih potencialov (4).

1.1.2 AKCIJSKI POTENCIAL

Akcijski potencial je kratkotrajen prehodni preobrat membranskega potenciala celice; sproženje akcijskih potencialov so zmožne le vzdražne celice, to so živčne in mišične celice. Vzrok za pojav AP je sprememba prepustnosti membrane za posamezne ione, kar povzroči depolarizacijo celice. Da se AP sproži, se mora membrana depolarizirati do

določene prazne vrednosti; ko je ta vrednost dosežena, se sproži akcijski potencial. Ta je vedno enak, ne glede na jakost in trajanje dražljaja, zato pravimo, da gre za odgovor 'vse ali nič' (5).

Akcijski potenciali so zelo hitri in prehodnega značaja; njihova amplituda je 100 mV, trajajo pa približno 1 ms. Sprožijo se na posebni sprožilni regiji aksona, natančneje na prehodu soma v akson (t.i. aksonski stožec). Od tam se prevajajo vzdolž aksona s hitrostjo 1 do 100 m/s. Pri tem potencial ostaja nespremenjen, saj se ponovno regenerira vzdolž aksona; nastanek AP na enem mestu membrane povzroči kritično spremembo napetosti v sosesčini, zato se membrana depolarizira tudi tam. Proženja AP so sposobni tudi dendriti, da lahko prenašajo informacijo do telesa celice (1, 6, 7).

1.1.3 NEVROGLIJA

Nevroglia je bila najprej smatrana kot možgansko lepilo, ki ne prispeva k višjim možganskim funkcijam, vendar je uporaba histoloških tehnik s pomočjo kovinskih barvil omogočila opredelitev glije kot samostojnih celic v osrednjem živčevju. Ugotovljeno je bilo, da celice glije igrajo pomembno podporno vlogo pri komunikaciji v živčni mreži. So ektodermalnega izvora, prav tako kot nevroni, vendar niso vzdražne. Velik pomen imajo pri razvoju možganov, saj vodijo migracijo rastočih nevronov med odraščanjem; pomembne so tudi za nadaljnjo funkcijo zrelih nevronov. Prilagodljivost glije na spremembe v celičnem in ekstracelularnem okolju je ključnega pomena za normalno funkcijo živčnega sistema (6, 8, 9).

Tudi celice nevroglije so sposobne komunikacije preko glialne mreže, ki podpira prenos informacij preko nevronov; npr. astrociti tvorijo številne presledkovne stike, ki omogočajo medcelično komunikacijo z drugimi astrociti in tudi nevroni predvsem z uporabo kalcijevih tokov. Številna spoznanja o specializaciji nevronov in glialnih celic ter njihovih številnih interakcijah odpirajo nove poglede v razumevanju patoloških procesov v osrednjem živčevju (8, 9).

Med evolucijo je delež celic glije v možganih naraščal; pri vinski mušici predstavlja glija 25 %, pri glodalcih 65 %, pri ljudeh pa kar 90 % vseh možganskih celic. To nakazuje na velik pomen glije pri zapletenih procesih v osrednjem živčevju (9).

Glijo delimo na 2 glavna tipa, mikroglijo in makroglijo, makroglijo pa še podrobneje na astrocite, oligodendrocite in Schwannove celice (1).

Z imenom mikroglija označujemo fagocite v živčnem sistemu, ki se aktivirajo ob poškodbi, okužbi ali bolezni; skupaj z limfociti in makrofagi, ki prihajajo v CZS iz periferije, tvori možganski imunski sistem. Druge vloge mikroglije so manj poznane (1, 6).

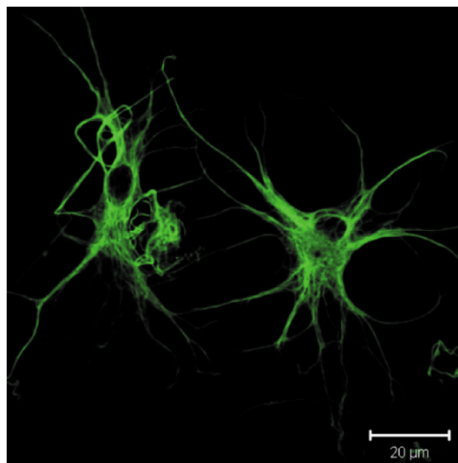
Oligodendrociti in Schwannove celice so majhne celice z relativno malo procesi. Njihova glavna funkcija je tvorba mielinske ovojnice, ki obdaja aksone; oligodendrociti opravljajo to vlogo v osrednjem živčevju, Schwannove celice pa v periferinem. Mielinska ovojnica je bogata z lipidi ter vsebuje malo vode, zato ima vlogo električnega izolatorja, ki omogoča hitrejšo prevajanje akcijskega potenciala in manjšo porabo ATP pri tem procesu (1, 7, 9).

Astrociti

Astrociti so najbolj številne celice glije; predstavljajo 25-50 % celičnega volumna večine regij človeških možganov. Imenujejo se po njihovi nepravilni, zvezdasti obliki s številnimi dolgimi izrastki. Nekateri izrastki imajo na koncu zadebelitve, ki tvorijo stike s površino nevronov, zato se domneva, da sodelujejo v dostavi hranil živčnim celicam. Astrociti so lahko tudi povezani s površino možganskih krvnih žil ali pa omogočajo endotelijskim celicam tvorbo tesnih stikov, s čimer sodelujejo pri krvno-možganski barieri (1, 4, 6, 8, 10).

V odraslih sesalskih možganih so astrociti prisotni v dveh glavnih oblikah, vlaknasti (fibrilarni), ki prevladujejo v beli možganovini in protoplazmatski, ki obstajajo v glavnem v sivi možganovini. V glavnem se jih identificira histološko, saj večina teh celic izraža glialni fibrilarni acidni protein (GFAP), ki ga najdemo le na teh tipih celic (10).

Njihova zvezdasta oblika z mnogimi izrastki jim omogoča, da obdajajo nevrnske sinapse. Perisinaptični astrociti ne zapolnjujejo samo prostora, ampak so enakovredni člani tako imenovane tridelne sinapse, ki sestoji iz pre- in postsinaptične nevrnske celice ter perisinaptičnih astrocitov (10).



Slika 1: Astrocita, vzgojena iz korteksa neonatalnih podgan v primarni kulturi, označena s protitelesi proti GFAP (za astrocite značilen protein). Slika je bila posneta v Referenčnem centru za konfokalno mikroskopijo Carl-Zeiss Laboratorija za neuroendokrinologijo in celično fiziologijo, Inštitut za PAFI.

Funkcije astrocitov

Odkrili so, da astrociti po stimulaciji z neurotransmiterji in drugimi signalnimi molekulami sproščajo razne prenašalce, citokine, rastne faktorje in molekule zunajceličnega matriksa, s čimer aktivno in neposredno sodelujejo pri procesih v osrednjem živčevju (8).

Astrociti izkoriščajo glukozo značilno bolje kot nevroni. Predstavljajo glavno skladišče glikogena v CŽS in tako zalagajo nevrone z glukozo. Kljub dejstvu, da so zaloge glikogena v astrocih relativno majhne (10x manjše kot v skeletni mišici, 100x manjše kot v jetrih), vseeno predstavljajo edino energijsko rezervo znotraj CŽS (10).

Na membranah astrocitov so izraženi številni ionski kanali, kot npr. za K^+ , Na^+ , Cl^- , HCO_3^- in Ca^{2+} . Astrociti so pomembni pri ohranjanju prave koncentracije K^+ ionov v ekstracelularnem prostoru med nevroni, saj so sposobni privzema presežnega K^+ preko astrocitnih presledkovnih stikov s procesom, imenovanim prostorsko uravnavanje (ang. spatial buffering), s čimer ščitijo nevrone pred stalno depolarizacijo (6, 10, 11).

Morda so povezani tudi z uravnavanjem krvnega pretoka v CŽS. Po intenzivni nevronske aktivnosti presežni glutamat aktivira sosednje astrocite preko vezave na metabotropne glutamatne receptorje, s čimer se sproži sproščanje raznih mediatorjev (npr. prostaglandinov), ki razširijo lokalne arteriole in povečajo krvni pretok ter zalogo kisika v aktivnih predelih možganov. Aktivirajo se tudi od Ca^{2+} odvisni K^+ kanali; pri tem iz

astrocitov izhaja K^+ , kar naj bi prav tako vplivalo na žilni tonus preko hiperpolarizacije in relaksacije gladkega mišičja (10).

Med nevrottransmisijo se v sinaptično špranjo sprostijo visoke koncentracije nevrottransmitterjev in ionov. Da se prepreči predolga sinaptična aktivnost, ki lahko povzroči epileptično aktivnost ali ekscitotoksične živčne poškodbe, se mora presežek nevrottransmitterjev hitro odstraniti. Pri tem procesu sodelujejo tudi perisinaptični astrociti, saj so sposobni privzema nevrottransmitterjev iz sinaptične špranje; preko tega mehanizma uravnavajo sinaptično aktivnost (10).

Dolgo je že znano, da na astrocitih obstajajo zelo močni sistemi za privzem številnih aminokislinskih transmitterjev, še posebej ekscitatornih aminokislin glutamata in aspartata. Predlagano je bilo, da se glutamat po sprostitvi iz živčnih končičev privzema v astrocite, kjer se metabolizira do glutamina z encimom glutamin-sintetazo, ki je specifičen za astrocite. To je bil prvi primer delitve dela pri metabolizmu med nevroni in glijo. Astrociti in živčne celice tvorijo skupaj metabolno enoto, saj del presnove glutamata poteka le v astrocitih. Omenjeno hipotezo je dodatno podprlo odkritje še več pomembnih encimov, specifičnih za astrocite, kot so piruvat-karboksilaza, določene izoforme laktat-dehidrogenaze in malat-dehidrogenaza. Delitev dela pri metabolizmu nekaterih nevrottransmitterjev je zelo pomembna za nevrokemijo (12).

1.1.4 KOMUNIKACIJA PREKO SINAPS

Do konca 19. stoletja so bili mnogi fiziologi mnenja, da med živci obstajajo neposredne fizične povezave, preko katerih lahko komunicirajo, vendar so študije Golgija in drugih prepričale mnoge histologe, da so živci sicer lahko zelo blizu, vendar so vmes prekinjeni prostori, ki so bili imenovani sinapse (13).

Sinapsa

Sinapsa je posebna struktura, udeležena v prenosu informacij z enega nevrona na drugega; tipično je sestavljena iz presinaptičnega elementa (zadebeljen zaključni del aksona) in postsinaptičnega elementa, ki je najpogosteje dendrit. Večina aksonov tvori sinapse z dendriti postsinaptičnih nevronov, v manjši meri pa tudi z njihovimi telesi ali aksoni. Med celicama večinoma ni fizične povezave, ampak sta presinaptična in postsinaptična celica ločeni z majhnim prostorom, imenovanim sinaptična špranja; vendar je ne smemo smatrati

kot prazen prostor med dvema strukturama, saj sta pre- in postsinaptični del sinapse tesno vezana tako en na drugega kot na ekstracelularni matriks s številnimi proteini, pa tudi preko perisinaptičnih astrocitov (1, 6).

Vsak nevron tvori v povprečju 1000 sinaps s sosednjimi nevroni; ekstremen primer so npr. Purkinijeve celice, ki jih lahko tvorijo več kot 100.000. V povprečju bi naj bilo v človeških možganih več kot 1×10^{14} sinaps (3, 6).

Vrste sinaps

Glede na razdaljo med pre- in postsinaptičnim elementom delimo sinapse na električne in kemične:

- Pri električni sinapsi presinaptični akson in postsinaptična celica nista popolnoma ločeni, zato lahko tok, ki nastane pri AP, potuje neposredno v postsinaptično celico preko presledkovnih stikov, ki fizično povezujejo citoplazmo presinaptične in postsinaptične celice.

Prenos preko električnih sinaps je hiter, vendar preprost; v glavnem prenašajo preproste depolarizirajoče signale, odsotna pa je inhibitorna aktivnost ali povzročanje trajnejših sprememb v električnih lastnostih postsinaptične celice.

Električnih sinaps je malo, najdemo jih predvsem v specializiranih regijah, kjer je za normalno funkcijo potrebna visoka sinhroniziranost sosednjih nevronov (1).

- Pri kemični sinapsi je med obema celicama špranja, zato neposreden prenos signala ni mogoč. Sprememba v membranskem potencialu presinaptične celice vodi v sproščanje kemičnih transmiterjev iz terminalnega dela celice. Transmiterji difundirajo preko sinaptične špranje in se vežejo na receptorje na postsinaptični membrani.

Kemične sinapse so sposobne večje raznolikosti signaliranja in s tem tudi bolj kompleksnih učinkov na postsinaptično celico. Zmožne so ekscitatorne ali inhibitorne modulacije učinka na postsinaptične celice in lahko v njih povzročajo električne spremembe, ki trajajo tudi do več minut (1).

Kemijska nevrottransmisija

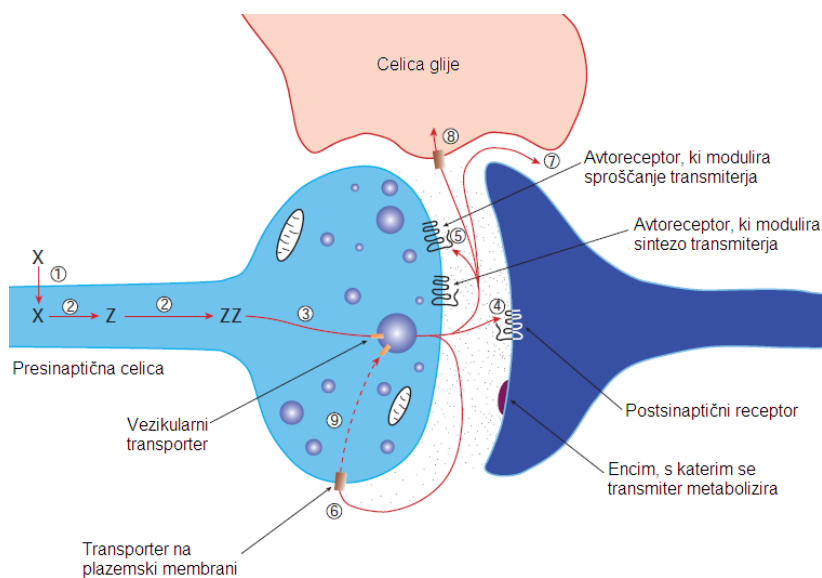
Kemijska transmisija je glavni način komunikacije med nevroni v živčnem sistemu. Pre- in postsinaptični dogodki so močno regulirani in se lahko spreminjajo v odvisnosti od uporabe, kar je osnova za plastičnost in učenje v CZS (13).

Koraki nevrottransmisije:

1. **Sinteza nevrottransmitterja v presinaptičnem nevronu:** Za sintezo je potrebna prisotnost ustreznih prekurzorjev v nevronu. Encimi, ki so udeleženi v pretvorbi prekurzorja v nevrottransmitter, morajo biti prisotni v aktivni obliki in lokalizirani na ustreznem delu nevrona; prav tako tudi vsi kofaktorji, potrebni za encimsko aktivnost (14).
2. **Shranjevanje nevrottransmitterja in/ali prekurzorja v terminalnem delu presinaptičnega nevrona:** Nevrottransmitterji se po sintezi prenesejo v vezikle s pomočjo vezikularnih transportnih proteinov; tam so zaščiteni pred encimsko razgradnjo in pripravljani na sproščanje. Pri klasičnih nevrottransmitterjih so sinaptični vezikli majhni (< 50 nm), neuropeptidni transmitterji pa so shranjeni v večjih veziklih (< 100 nm). Vezikli se nahajajo blizu presinaptične membrane, kjer čakajo na dražljaj za sproščanje (14).
3. **Sproščanje nevrottransmitterja v sinaptično špranjo:** Depolarizacija presinaptične celice povzroči vdor Ca^{2+} skozi napetostno odvisne kalcijeve kanale v aktivno zono nevrona, porast v intracelularni koncentraciji Ca^{2+} pa povzroči zlivanje sinaptičnih veziklov z membrano in sproščanje nevrottransmitterja v sinaptično špranjo; proces se imenuje eksocitoza (1).
Večina nevrottransmitterjev se sprošča pod vplivom ekstracelularnih signalov, nekateri pa se sproščajo konstitutivno, ves čas v isti meri, brez zunanega dražljaja (14).
4. **Vezava in prepoznavanje med nevrottransmitterji in tarčnimi receptorji:** Sproščeni nevrottransmitterji interagirajo z receptorji, ki se nahajajo na postsinaptični celici, s čimer sprožijo določen odgovor. Receptorje najdemo tudi na presinaptičnih živčnih celicah; to so t.i. presinaptični receptorji. Če jih aktivira nevrottransmitter, ki se sprošča iz istega nevrona, govorimo o avtoreceptorjih, če pa

jih aktivirajo drugi nevrottransmiterji pa o heteroreceptorjih. Aktivacija le-teh uravnava sintezo in sproščanje nevrottransmiterjev, zato predstavljajo pomembno stopnjo pri homeostazi (14).

5. **Prekinitev delovanja sproščenega transmitterja:** Med nevrottransmisijo se v sinaptično špranjo sprostijo visoke koncentracije nevrottransmiterjev in ionov. Da bi se preprečila predolga sinaptična aktivnost, ki lahko povzroči epileptično aktivnost ali ekscitotoksične živčne poškodbe, se mora presežek nevrottransmiterjev in K^+ hitro odstraniti iz špranje. Koncentracija transmitterja nenadoma pade zaradi difuzije v ekstracelularno tekočino, encimske razgradnje, ponovnega privzema v presinaptične nerone ali transporta v perisinaptične astrocite, v katerih prav tako pride do encimske razgradnje privzetih nevrottransmiterjev. Večinoma v prekinitvi delovanja nevrottransmitterja sodelujejo vsi štirje procesi (10, 14).



Slika 2: Življenjski krog klasičnega nevrottransmitterja. Po akumulaciji prekurzorske aminokislina v nevronu (1) se le-ta postopno metabolizira (2) do zrelega transmitterja. Ta se akumulira v veziklih s pomočjo vezikularnih transporterjev (3); tam je pripravljen na sproščanje in zaščiten pred razgradnjo. Ko se transmitter sprosti, lahko interagira s postsinaptičnimi receptorji (4) ali pa avtoreceptorji (5), ki regulirajo sproščanje in sintezo transmitterja. Delovanje transmitterja prekinijo visoko afinitetni membranski transporterji (6), ki ležijo ponavadi na membrani nevrone, ki sprošča transmitter. Delovanje se lahko prekine tudi z difuzijo iz aktivnega mesta (7) ali s privzemom v okoliško glijo (8). Privzet transmitter je nato podvržen metabolični inaktivaciji (9).

Receptorji

Receptorje na pre- in postsinaptični celici lahko razdelimo v 2 glavni skupini, glede na njihov vpliv na ionske kanale. Prvi tip je ionotropni receptor; to so ionski kanali, ki se jim ob vezavi nevrottransmitterja spremeni konfiguracija. Drugi tip je metabolni receptor, ki posredno deluje na ionski kanal preko aktivacije sekundarnega sporočilnega sistema znotraj celice (1).

Aktivacija obeh tipov receptorjev ima lahko za rezultat odpiranje ali zapiranje ionskih kanalov. Vrsta učinka je odvisna od lastnosti receptorja, ne od lastnosti nevrottransmitterja – isti živčni prenašalec lahko na različnih receptorjih sproža različne učinke. Ker v živčnem sistemu obstajajo številni različni receptorji, lahko že relativno malo število nevrottransmitterjev producira široko paleto učinkov (1).

1.2 NEVROTRANSMITERJI

Med nevroni poteka prenos informacij s pomočjo nevrottransmitterjev oz. živčnih prenašalcev. Nevrottransmitterji so endogene substance; so signalne molekule, ki se sintetizirajo v presinaptičnih nevronih, pakirajo v sinaptične vezikle, po depolarizaciji pa se sproščajo v sinaptično špranjo. Sproščeni nevrottransmitterji komunicirajo s postsinaptičnimi nevroni in drugimi tarčnimi celicami preko vezave na specifične površinske celične receptorje.

1.2.1 LASTNOSTI NEVROTRANSMITERJEV

Strokovnjaki so določili, katere pogoje, mora izpolnjevati spojina, da jo lahko opredelimo kot nevrottransmitter (14).

- Nevrottransmitter se mora sintetizirati v nevronu in se iz njega sprostiti; nevron mora vsebovati tudi encime, potrebne za sintezo transmitterja. Mesto sinteze v nevroni ni natančno opredeljeno; klasični nevrottransmitterji nastajajo v aksonu, peptidni transmitterji se sintetizirajo v telesu nevrona.
- Substanca, ki se sprošča, mora imeti kemično in farmakološko določljive lastnosti.

- Po stimulaciji presinaptičnega nevrona mora neurotransmitter povzročiti specifičen učinek na postsinaptični celici.
- Učinki neurotransmitterja se morajo sorazmerno zmanjšati po dodatku njegovega kompetitivnega antagonista. Prav tako mora dodatek inhibitorja encima, ki sodeluje pri sintezi neurotransmitterja, zmanjšati učinke po stimulaciji presinaptičnega nevrona.
- Obstajati morajo aktivni mehanizmi, ki prekinejo delovanje neurotransmitterja (14).
- Neurotransmitter ne sme prehajati krvno-možganske bariere (1).

1.2.2 DELITEV NEVROTRANSMITERJEV

Spojine, ki jih opredeljujemo kot neurotransmitterje, lahko glede na njihovo kemijsko sestavo razdelimo v naslednje skupine:

- derivati holina (acetilholin),
- biogeni amini – derivati aminokislin (kateholamini, serotonin, histamin),
- aminokislone (glutamat, aspartat, GABA, glicin),
- neuropeptidi – kratke verige aminokislin (endogeni opioidi, substanca P),
- lipidotopni neurotransmitterji (anandamid, prostaglandini),
- drugi transmitterji (NO, CO, ATP, adenozin...) (15).

Glede na mesto sinteze neurotransmitterja jih delimo na klasične in neklasične; večinoma so klasični, kar pomeni, da se sintetizirajo v aksonih, nekaj pa je tudi neklasičnih, npr. neuropeptidi, ki se sintetizirajo v telesu nevrona. Klasični neurotransmitterji so majhne molekule kot acetilholin, biogeni amini (noradrenalin, dopamin, serotonin, histamin), glutamin ali GABA. Med neklasične neurotransmitterje uvrščamo neuropeptide, kot so enkefalini, endorfini, nevrotenzini, substanca P, prav tako tudi pline, kot sta NO in CO (1,10, 16).

1.2.3 TRANSPORT NEVROTRANSMITERJEV

Transporterji na splošno

Transporterji so membranski proteini, njihova glavna funkcija pa je omogočanje toka molekul v celice in iz njih. Primarna naloga transporterjev je prenos hranil in endogenih substanc (kot so sladkorji, aminokisliline, nukleotidi, vitamini) preko celičnih membran in raznih telesnih barier. Vendar transporterji ne prenašajo samo fizioloških molekul, ampak lahko tudi privzemajo eksogene substance, ki so strukturno podobne endogenim, npr. različna zdravila in nevrotoksine (10).

Transporterji lahko delujejo preko olajšanega prenosa ali pa aktivnega energijsko odvisnega transporta. Olajšan prenos omogoča npr. električno nabitim molekulam pasiven prehod preko membrane vzdolž elektrokemijskega gradienta, zato ta proces ne potrebuje dodatne kemične energije. Nasprotno pa aktivni transporterji prenašajo molekule preko membrane proti njihovem gradientu, zato potrebujejo hidrolizo ATP kot vir energije (10).

Glede na to, kakšno obliko energije uporabljajo aktivni transporterji, jih delimo na primarne in sekundarne. Primarni aktivni transporterji vključujejo družino prenašalcev ABC (ATP-binding cassette) in ionske črpalke (ATPaze). Sesalski ABC transporterji preko vezave ali hidrolize ATP spreminjajo svojo konformacijo in tako nadzirajo transport raznih substanc, ionske črpalke pa preko hidrolize ATP omogočajo prenos ionov iz celic ali v organele; tako ustvarjajo in vzdržujejo elektrokemijski ionski gradient preko membran. Energijo teh ionskih gradientov nato uporabljajo sekundarni aktivni transporterji za prenos topljencev proti njihovem gradientu; primer sekundarnih transporterjev so SLC (solute carrier) transmembranski proteini (17).

Transporterji za nevrotransmitterje

Transmembranski transport nevrotransmitterjev je ključnega pomena za pravilno komunikacijo med nevroni. Promet omogočajo transportni proteini, ki so specifični za posamezne nevrotransmitterje. Pripadajo posebni družini membranskih proteinov, sestavljenih iz 12 transmembranskih domen. Razdelimo jih lahko na intracelularne vezikularne transporterje, ki so odgovorni za koncentriranje in skladiščenje transmitterjev v sinaptičnih veziklih (vezikularni transporterji) in plazemske membranske transporterje, ki so odgovorni za črpanje nevrotransmitterjev predvsem iz ekstracelularnega prostora. Poznamo tri podrazrede intracelularnih transporterjev (SLC17, SLC18 in SLC32 družina),

na celičnih membranah pa prevladujeta dva podrazreda plazemskih membranskih transporterjev: visoko afinitetni glutamatni transporterji (SLC1 genska družina) in z Na^+ ter Cl^- sklopljeni transporterji (SLC6 genska družina). Slednjih je največ; mednje spadajo transporterji za dopamin, serotonin, noradrenalin, glicin in GABA. Biogeni amini se lahko prenašajo v nevrone in astrocite tudi s pomočjo treh članov družine SLC22, imenovanih organski kationski transporterji (OCT) (10, 18, 19).

Hiter ponovni privzem je nujen, saj se s tem omeji tako trajanje sinaptične komunikacije, kot tudi difuzija do ostalih sinaps. Omogoči se tudi ponovna uporaba nemetaboliziranih transmitterjev, s čimer se zmanjša potreba po *de novo* sintezi nevrotansmitterjev. Nevronski transporterji, ki se nahajajo v bližini sinapse, so ključnega pomena za hiter zaključek signala, medtem ko so ne-nevronski transporterji in transporterji na aksonih bolj pomembni za omejitev širine signala in odstranjevanje nevrotansmitterjev iz krvnega obtoka ter ekstracelularnega prostora. Aktivnost transporterjev za biogene amine ni konstantna, ampak je odvisna od številnih faktorjev; npr. aktivacija protein kinaze C in fosforilacija transporterskih proteinov zmanjšata kapaciteto transporterjev za biogene amine na celični membrani. Aktivnost transporterjev niha tudi v odvisnosti od koncentracije nevrotansmitterja v špranji, koncentracije sekundarnih prenašalcev in aktivnosti presinaptičnih receptorjev. Zato pomen transporterjev ni samo v odstranjevanju nevrotansmitterjev, ampak tudi v aktivnem sodelovanju pri sinaptični komunikaciji (10).

1.3 HISTAMIN

Že od začetka 20. stoletja, ko je Henry Dale dokazal, da je histamin endogena substanca in močan stimulator različnih celic, je histamin poznan kot transmitter in nevromodulator (11).

Dolgo je bil pojmovan kot lokalni hormon, ki se aktivira ob sprostitvi iz mastocitov v vnetnih reakcijah, deluje pa tudi v kontroli ožilja, gladkega mišičja in eksokrinih žlez. Ker je mastocitov v zdravem možganskem tkivu malo in ker histamin ni sposoben prehoda krvno-možganske bariere, so že kmalu predvidevali, da se histamin lahko sintetizira tudi *in situ* v nevronih, kar je en izmed kriterijev za nevrotansmitter (1, 11, 13).

1.3.1 HISTAMIN V CENTRALNEM ŽIVČNEM SISTEMU

Glavne ovire pri ugotavljanju funkcij histamina v možganih so bile pomanjkanje občutljivih in specifičnih metod za prikaz domnevnih histaminergičnih nevronov *in situ*, pomanjkanje primernih metod za merjenje histamina in njegovih metabolitov in težave pri karakterizaciji histaminskih receptorjev v živčnem sistemu. Vendar se je z napredkom tehnologije pridobilo dovolj dokazov, ki podpirajo hipotezo, da ima histamin v možganih funkcijo nevrottransmitterja in nevromodulatorja (11).

Intracerebralni histamin je znan tudi kot regulator možganskega krvnega pretoka in permeabilnosti endotelija. V možganih morskega prašička so ugotovili, da mikrožilice vsebujejo relativno veliko histamina, vendar imajo majhno aktivnost encimov, udeleženih v sintezo in metabolizem histamina. Histamin je prisoten tudi v krvnih žilah, izoliranih iz govejih možganov. Študije nakazujejo, da se histamin lahko sintetizira tudi lokalno v možganskih mikrožilah, vendar je njegov metabolizem počasen (20).

1.3.2 SINTEZA HISTAMINA V CŽS

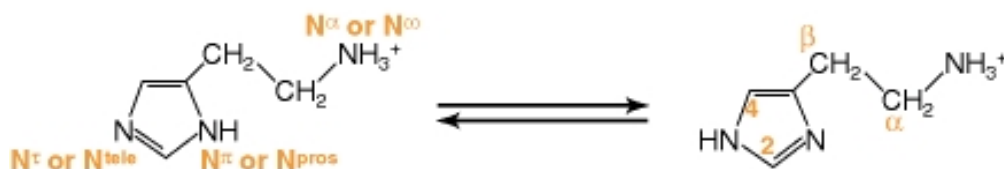
Ker histamin slabo prehaja hematoencefalno bariero, nastaja v centralnem živčnem sistemu *in situ* iz esencialne aminokisliline histidina s pomočjo encima histidin dekarboksilaza (HDC). Dokazan je bil energijsko odvisen transport histidina v možgane, kar je morda en izmed dejavnikov nadzora sinteze histamina v možganih, saj je količina nastalega histamina sorazmerna s količino privzetega histidina. Inhibicijo sinteze histamina lahko dosežemo z aplikacijo α -fluorometilhistidina, ireverzibilnega inhibitorja HDC, kar vodi v značilno zmanjšano koncentracijo histamina v CŽS (13, 21).



Slika 3: Dekarboksilacija histidina v histamin. Reakcijo katalizira histidin-dekarboksilaza; pri reakciji kot stranski produkt dekarboksilacije nastaja CO₂.

Kemijsko gledano je histamin 2-(4-imidazolil)etilamin. Etilaminska 'hrbtenica' je skupna mnogim aaminskim nevrottransmitterjem (npr. dopamin, noradrenalin, serotonin), vendar ima

histamin zaradi imidazolskega jedra nekatere posebne kemijske lastnosti. Ena izmed njih je tautomerizem, ki omogoča obstoj v dveh različnih kemijskih oblikah. Tautomerne lastnosti histamina bi naj bile ključne pri aktivaciji nekaterih histaminskih receptorjev. Čeprav ima histamin več kot en bazični center, sta oba tautomera pri fiziološkem pH v obliki monokationa (13).



Slika 4: Tautomerija histamina. Histamin obstaja v dveh tautomernih oblikah, N(3)-H in N(1)-H. Delež določene tautomerne oblike je odvisen od številnih dejavnikov, v telesu predvsem od temperature in pH.

1.3.3 CENTRALNI HISTAMINERGIČNI SISTEM

V centralnem živčnem sistemu je histamin neurotransmiter, tako pri vretenčarjih kot pri nevretenčarjih. Koncentriran je v hipotalamusu, enem izmed centrov za regulacijo sekrecije hormonov (1).

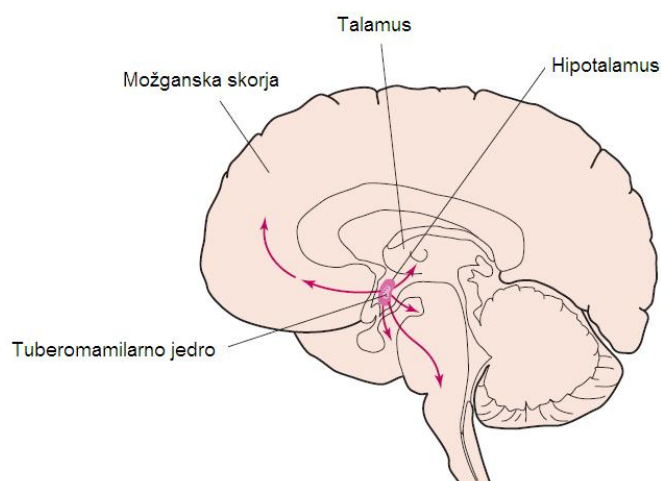
Histamin je v možganih prisoten v dveh vrstah celic, nevronih in mastocitih. Mastocitov je v primerjavi z drugimi tkivi relativno malo, njihova vloga v osrednjem živčevju pa je zaenkrat nepoznana. Obstajajo značilne razlike v gostoti mastocitov med različnimi vrstami, med spoloma pri različnih fizioloških stanjih. Precej mastocitov se nahaja v talamusu in hipofizi, za histaminsko delovanje v drugih predelih možgan pa je odgovoren predvsem histamin, sproščen iz nevronov (21).

Histaminergični nevroni

V možganih histamin sintetizirajo izključno nevroni, ki imajo celična telesa v tuberomamilarnem jedru, ki leži v posteriornem hipotalamusu; ležijo v več manjših razdruženih skupkih (E₁-E₅), ker pa zaenkrat ni nobenih dokazov, da ti skupki opravljajo različne vloge, jih lahko obravnavamo kot funkcionalno celoto. Človek ima prb. 64.000 histaminergičnih nevronov v vsaki možganski polobli. Ti nevroni imajo projekcije povsod po možganih in hrbtenjači. Področja, kjer so projekcije še posebej goste, so cerebralna skorja, hipokampus, neostriatum, nucleus accumbens, amigdala in hipotalamus. V tuberomamilarnem jedru imajo projekcije tudi nevroni drugih vrst, npr. monoaminergični

in oreksinergični, medtem ko histaminergični nevroni projecirajo na monoaminske in holinergične neurone, udeležene v vzburjenju, pozornost, učenje in spomin. Intrinzične elektrofiziološke lastnosti tuberomamilarnih nevronov so zelo podobne drugim aminergičnim nevronom (počasno spontano proženje, širok akcijski potencial, globoka hiperpolarizacija, itd.) (1, 6, 21).

Histaminergični nevroni so v glavnem dokaj velike celice, premera približno 25 do 30 μm . Poleg histamina vsebujejo še številne druge neuroaktivne snovi, kot so GABA, adenzin, met-enkefalin, galanin in substanco P. Ležijo na ventralni strani možganov in izraščajo številne primarne dendrite, ki se še nadalje razdelijo v dolge, sekundarne dendrite. Dendriti posameznega nevrona se pogosto prekrivajo z dendriti drugih histaminergičnih nevronov. Zanimivo je, da nekateri dendriti projecirajo v mamilarno telo, kjer prihajajo v stik s cerebrospinalno tekočino. Neznačilna lastnost histaminergičnih nevronov je tudi, da aksoni izraščajo iz primarnih dendritov in ne iz telesa celice (povzeto po 21).



Slika 5: Histaminergični nevroni v možganih.

Sinteza in sproščanje histamina je pod nadzorom inhibitornih histaminskih avtoreceptorjev podtipa H_3 , ki se nahajajo predvsem presinaptično na histaminskih nevronih. V določenih regijah je sproščanje histamina tudi pod nadzorom inhibitornih muskarinskih M_1 , adrenergičnih α_2 , opioidnih κ in galaninskih receptorjev ter facilitatornih opioidnih receptorjev μ . Eksperimenti v razmerah *in vivo* so pokazali, da tudi plinast prenašalec NO inhibira sproščanje histamina v hipotalamusu (21).

Funkcije centralnega histaminergičnega sistema

Najbolj okarakterizirana funkcija histaminskega sistema v možganih je regulacija spanja in budnosti; uničenje histaminergičnih nevronov v posteriornem hipotalamusu podaljša spanje. Podoben učinek ima tudi blokada histaminergičnih signalov z antihistaminiki. Sproščanje histamina ima značilno ritmičnost, saj je sorazmerno s proženjem AP na histaminskih nevronih, ki sledi cirkadialnemu ciklu budnost-spanje; AP se najhitreje prožijo med budnostjo, najpočasneje pa med REM fazo spanja (1, 6, 21).

Histamin je udeležen v procesih učenja in pomnjenja preko svojih neposrednih učinkov na možgansko skorjo, hipokampus in amigdalo in posrednih učinkov na holinergične in monoaminske nevrone. Zdi se, da je histamin udeležen tudi v regulacijo hranjenja in energijske bilance (6).

Centralni histaminergični sistem bi naj bil vključen še v mnoge druge centralno-živčne funkcije: vzburljenje, tesnobo, aktivacijo simpatičnega živčevja, s stresom povezano sproščanje neurotransmiterjev in hormonov iz ščitnice, antinocicepcijo, zadrževanje vode in zaviranje teka. Sproščanje histamina se poveča pod ekstremnimi pogoji, kot so dehidracija, hipoglikemija ali razni drugi stresorji. Zato se domneva, da je glavna vloga histaminskega sistema v osrednjem živčevju odziv na nevarnost (21).

1.3.4 HISTAMINSKI RECEPTORJI

Do zdaj so bili indentificirani štiri podtipi histaminskih receptorjev (H_1 do H_4); vsi so člani superdružine GPCR (G-protein coupled receptors), ki vključuje transmembranske receptorje s 7 transmembranskimi domenami. H_1 receptorji so sklopljeni z G_q , H_2 receptorji z G_s , H_3 receptorji pa naj bi bili sklopljeni z G_i proteinom (6).

H₁ receptorji

H_1 receptorji so locirani predvsem postsinaptično in so pozitivno sklopljeni s fosfolipazo C. Velika gostota receptorjev je predvsem v hipotalamusu in drugih limbičnih regijah. Aktivacija teh receptorjev povzroči velike depolarizacije preko zavore iztoka kalijevih ionov, aktivacije nespecifičnih kationskih kanalov ali aktivacije Na^+/Ca^{2+} izmenjevalca. Vključeni so v mnogo različnih funkcij, kot so kontrakcija gladkih mišic, vazodilatacija s povečano kapilarno prepustnostjo, sproščanje hormonov in možganska glikogenoliza (11, 21).

H₂ receptorji

H₂ receptorji se prav tako nahajajo v glavnem postsinaptično; sklopljeni so pozitivno z adenilil ciklazo preko G_s proteina in opravljajo večino svojih učinkov preko sprememb v znotrajcelični koncentraciji cAMP. Veliko jih najdemo v hipokampusu, amigdali in bazalnih ganglijih. Aktivacija teh receptorjev vodi do mnogih ekscitatornih učinkov preko blokade od kalcija odvisnih kalijevih kanalov in modulacije kationskih kanalov, ki se aktivirajo ob hiperpolarizaciji. Funkcije, ki jih opravljajo H₂ receptorji, so relaksacija gladkih mišic, izločanje želodčne kisline, pozitivni kronotropni in inotropni efekt na srčno mišico in inhibitorni učinek na imunski sistem (11, 21).

H₃ receptorji

H₃ receptorji se nahajajo skoraj izključno presinaptično in so negativno sklopljeni z adenilil-ciklazo. Domneva se, da ima H₃ receptor funkcijo avtoreceptorja, sklopljenega z G_i proteinom, podobno kot dopaminski D₂, adrenergični α_2 in serotoninergični 5HT_{1a} avtoreceptorji; je glavni regulatorni mehanizem v kontroli histaminergične aktivnosti pod fiziološkimi pogoji (6).

Največ H₃ receptorjev najdemo v bazalnih ganglijih, striatumu, nucleus accumbensu in možganski skorji (6).

Ti receptorji uravnavajo presinaptično inhibicijo sproščanja histamina in drugih neurotransmiterjev, vendar v nasprotju z drugimi aminergičnimi nevroni histaminski avtoreceptorji ne aktivirajo kalijevih kanalov, ampak nadzirajo proženje potenciala preko inhibicije napetostno odvisnih kalcijevih kanalov. In vivo študije so pokazale, da administracija selektivnega H₃ agonista zmanjša sproščanje in metabolizem histamina, administracija selektivnega antagonist pa sproščanje histamina poveča; to nakazuje, da so H₃ avtoreceptorji tonično stimulirani z endogenim histaminom in uravnavajo njegovo koncentracijo v CŽS (11, 21).

H₃ receptorji imajo morda tudi funkcijo heteroreceptorjev, ki regulirajo sproščanje drugih neurotransmiterjev iz ustreznih nevronov; sodelujejo pri modulaciji sproščanja neurotransmiterjev iz noradrenergičnih, serotoninskih, dopaminskih, holinergičnih in peptidergičnih nevronov. Nenazadnje, histamin modulira tudi glutamatni NMDA receptor preko vezavnega mesta za poliamine (11, 21).

H₄ receptorji

Odkrit je bil še en podtip histaminskega receptorja, H₄. Je zelo podoben H₃ receptorju, saj sta v transmembranski regiji v 58 % enaka. Ta vrsta receptorja se v CZS ne pojavlja, najdemo pa ga v vranici, timusu, črevesju in imunološko aktivnih celicah (kot so nevtrofilci, eozinofilci in T celice), kar nakazuje na njegovo vlogo v regulaciji imunskega odziva. Ti receptorji so potencialna tarča zdravil pri alergijskih in vnetnih boleznih (11, 22).

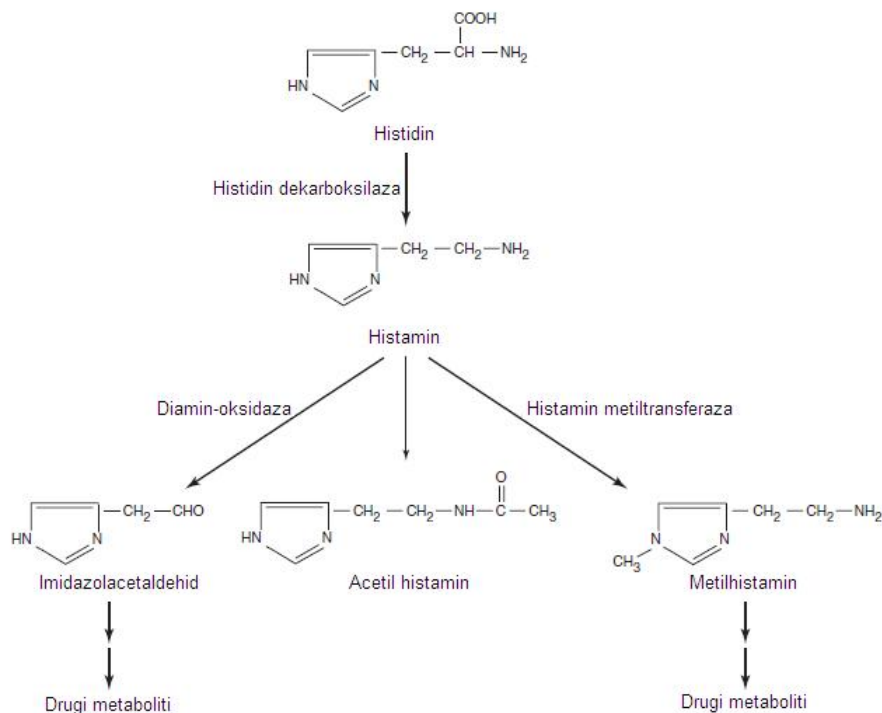
1.3.5 PRIVZEM IN INAKTIVACIJA HISTAMINA

Po sprostitvi histamina in njegovi vezavi na receptorje se mora histamin iz sinaptične špranje inaktivirati, da ne pride do prekomerne stimulacije histaminskih receptorjev. Nevrotransmisija biogenih aminov, kot sta dopamin in noradrenalin, se prekine s pomočjo specifičnih transporterjev, ki omogočajo ponovni privzem teh transmitterjev v živčne končiče. Dokazan je bil privzem histamina v astrocite embrijev piščanca, cerebralne endotelijske celice podgane, pa tudi v celice kostnega mozga; ni še bil odkrit nevronski transporter za histamin, vendar se predvideva njegov obstoj, saj obseg privzema v druge vrste celic ni zadosten za hitro in učinkovito inaktivacijo histamina (23).

Histamin se pri sesalcih metabolizira z dvema ločenima encimskima sistemoma; lahko se s pomočjo diamin-oksidge oksidira do imidazolacetaldehida in nato še do imidazolocetne kisline, ali pa se s pomočjo histamin-metiltransferaze metilira do telemetilhistamina. Ker imajo možgani majhno sposobnost oksidacije histamina, se tu histamin praktično v celoti metilira (11).

Metilacija histamina poteka s pomočjo encima histamin-N-metiltransferaza (HNMT), ki je topen encim. V centralnem živčevju se nahaja v citosolu nevronov in endotelijskih celic, izven živčevja pa ga najdemo tudi v bronhijih in ledvicah. HNMT olajša prenos metilne skupine iz S-adenozin-L-metionina na histamin, pri čemer se tvori tele-metilhistamin (tMH) (23, 24).

Metilhistamin je podvržen oksidativni deaminaciji z diamin ali monoamin-oksidge; afiniteta je sicer višja za diamin-oksidge, ki pa jo v možganih najdemo v majhni meri. Večina telemetilhistamina se zato oksidira s pomočjo monoamin-oksidge tipa B, ki se nahaja predvsem v tuberomamilarnih nevronih (11, 21).



Slika 6: Metabolizem histamina. V možganih prevladuje metabolizem s HNMT; diamin-oksidaza je bolj aktivna na periferiji.

Večkrat je že bilo dokazano, da so koncentracije tMH tesno povezane s prometom histamina; prav tako inhibicija HNMT vodi v povečane koncentracije histamina v živčevju, zato se domneva, da igra ta encim ključno vlogo v inaktivaciji histamina živčnega izvora (23).

Ker se HNMT nahaja v citoplazmi celic, histamin pa zaradi pozitivnega naboja le težko prehaja v intracelularni prostor, sta se oblikovali dve možni hipotezi: prva je transporterska hipoteza, ki pravi, da se histamin v celice prenaša s transporterjem, druga pa je membranska hipoteza, ki pravi, da se HNMT lahko iz citoplazme translocira na plazemsko membrano ter pod vplivom rastnih faktorjev funkcioniira na celični površini (24).

Dokazano je bilo, da se HNMT iz citoplazme po stimulaciji z rastnimi faktorji ali izoprotenerolom translocira na plazemsko membrano. Proizvedli so tudi celice, ki so imele na celično membrano vezan HNMT, vendar se je izkazalo, da so te celice razgrajevale histamin v manjši meri. Zato se zdi transporterska hipoteza inaktivacije histamina bolj verjetna od membranske (24).

Poročila iz laboratorija Zsuzsanne Huszti opisujejo privzem histamina v glialne celice piščančjih embrijev in neonatalnih podgan. V laboratoriju Mojce Kržan so dokazali privzem tudi v astrocite odraslih podgan. Transport je dvosmeren, odvisen od Na^+ in neodvisen od Cl^- . Ugotovili so, da so celice glije udeležene v neprekinjeno odstranjevanje histamina iz sinaptične špranje tudi v pogojih *in vivo*. Stuart s sodelavci je opisal od Na^+ odvisen privzem histamina v fotoreceptorje členonožcev, kot tudi v okoliško glijo; zanimivo je, da se je histamin privzemal v fotoreceptorje predvsem, kadar so bili ti izpostavljeni svetlobi (torej depolarizirani), medtem ko je v temi prevladoval privzem v glijo. Nedavno je Yanai s skupino poročal o visoko in nizko afinitetnem, od Na^+ , Cl^- in HCO_3^- odvisnem transportu histamina v podganje sinaptosome. Kljub vsem objavam obstoj specifičnega histaminskega transporterja v CZS še ni potrjen (povzeto po 10).

V kulturah kortikalnih astrocitov neonatalnih podgan vrste Sprague-Dawley so odkrili obstoj transporterjev OCT_1 , OCT_2 in OCT_3 . Histamin je dober substrat za OCT_{2r} in OCT_{3h} , slabo pa se prenaša prek OCT_{1r} . K_m za privzem histamina z različnimi OCT je nizka (10–900 μM), zato se domneva, da transporter učinkuje predvsem na tiste molekule neurotransmiterjev, ki so se izognile svojim primarnim visoko afinitetnim sistemom privzema (25, 26).

Čeprav je dokazano, da so OCT sposobni transporta histamina, pa še ni bilo potrjeno, da je to dejansko pomembna transportna pot histamina v možganih. Še več, v raziskavah se ob dodatku inhibitorjev OCT v kulturo astrocitov privzem histamina ni zmanjšal, kar nakazuje, da se histamin v kultivirane astrocite privzema z neznanim prenašalcem, ki ni transporter za organske katione (6, 27).

Ker za razliko od drugih nevronov histaminergični nevroni ne izkazujejo visoko afinitetnega sistema privzema za histamin se domneva, da so nosilci transportnega sistema za histamin astrociti. Domneva se, da lahko histamin vstopa v astrocite z elektrodifuzijo preko membrane in z aktivnim transportom. Kljub vsemu pa obstaja trenutno zelo malo dokazov, da je nevronske ali ne-nevronske privzeme histamina dejansko del mehanizma za odstranjevanje histamina iz sinaptične špranje (13, 25).

1.4 MOŽGANSKA KAP

Možganska kap je skupek nevroloških izpadov, ki trajajo več kot 24 ur in so posledica prehodnega ali trajnega zmanjšanja v pretoku krvi skozi eno izmed glavnih možganskih arterij; vzrok je večinoma zamašitev žile zaradi tromboze ali embolije (ishemična kap, ki predstavlja 85 % infarktov), lahko pa tudi krvavitev (hemoragična kap). V prvem primeru po okluziji žile pride do ishemičnega infarkta; ta ima incidenco prb. 250-400/100.000 ljudi in smrtnost prb. 30 %, zaradi česar je tretji najpogostejši vzrok smrti v razvitem svetu. V ZDA je možganska kap glavni vzrok kronične funkcionalne nesposobnosti (1, 28, 29).

Zaradi nezadostne oskrbe s krvjo pride v tkivu do ishemije (pomanjkanja kisika in glukoze). Poleg tega je preprečeno odstranjevanje potencialno toksičnih metabolitov iz živčnih celic, na primer mlečne kisline (1).

Za vzdrževanje fiziološke funkcije nevronske mreže potrebujejo možgani veliko energije. Čeprav predstavljajo le približno 2 % celotne telesne teže, je pretok krvi skozi možgane 50 mL/100 g/min, kar je približno 12 do 15 % celotnega srčnega iztisa. Poraba kisika je približno 3,5 mL/100 g/min, kar je 20 % celotne telesne potrebe po kisiku. Ker pa nimajo možgani praktično nobene zaloge kisika in zelo majhne zaloge glukoze, so zelo občutljivi na ishemične poškodbe (3).

Če je ishemija prehodna, lahko znaki in simptomi izginejo brez patoloških posledic. Kadar pa je ishemija izrazita in dolgotrajna, lahko nevroni in drugi celični elementi odmrejo. Temu stanju pravimo infarkt. Četudi pride do uspešne reperfuzije cerebralnega krvnega pretoka, še ni poznana terapija, ki bi lahko ozdravila degenerirane nevrone. V možganih so za ishemijo najbolj občutljivi hipokampus, striatum ter skorji velikih in malih možganov (1, 3, 29).

Tudi če se ponovni pretok vzpostavi v roku nekaj minut, se sčasoma pojavijo morfološke in funkcionalne poškodbe nevronov, kar imenujemo zakasnjena nevronska smrt. Čeprav so nedavne študije pokazale biokemične mehanizme zakasnjene nevronske smrti, je njeno preprečevanje še vedno zahtevna naloga, saj je za zdravljenje primerno samo kratko obdobje med zgodnjo fazo reperfuzije (3).

Hemodinamske, metabolne in ionske spremembe ne vplivajo na celotno ishemično področje enako. V jedru poškodbe je krvni pretok zmanjšan za 20 %. Trajna in anoksična

depolarizacija se razvije v prvih minutah (prb. 4 minute) po nastopu ishemije. Celice pospešeno propadajo zaradi lipolize, proteolize, disagregacije mikrotubulov in propada homeostaze ionov. Med smrtno poškodovanim jedrom in zdravim možganskim tkivom leži območje penumbre, v katerem je pretok krvi zmanjšan, delno pa še je ohranjen energijski metabolizem. Čez čas se tudi v penumbri ojačajo procesi ekscitotoksičnosti, depolarizacije, vnetja in apoptoze, zato je glavni cilj nevroprotektivnega zdravljenja pri ishemični kapi rešitev celic v ishemični penumbri (28).

Ishemična možganska poškodba je posledica kompleksnega zaporedja patofizioloških dogodkov, ki se odvijajo skozi čas in prostor. Glavni patogenetski mehanizmi te kaskade vključujejo ekscitotoksičnost, periinfarktne depolarizacije, vnetje in celično smrt (28).

1.4.1 EKSCITOTOKSIČNOST IN ENERGETSKA IZČRANOST

Med prve dogodke po začetni fazi pomanjkanja energije sodi depolarizacija nevronske membrane in motnje v sinaptični funkciji. Ekscitotoksičnost je splošno uveljavljena kot pomemben sprožilec in izvršilec tkivne poškodbe pri cerebralni ishemiji, zato je glavna tarča v terapiji kapi. Pomembna vloga nevronske ekscitatorne aktivnosti po ishemiji se vidi v relativno selektivnem napadu na ekscitatorne sinapse in ekscitatorne nevronske mreže. Motnje pre- in postsinaptičnih komponent sinaps in vztrajno ter okrepljeno proženje v teh nevronske mrežah najbrž prispeva k selektivnim vzorcem možganske poškodbe (28, 30).

Porast ekscitatornih prenašalcev

Nezadosten pretok krvi skozi možgane omeji dostavo substratov, še posebej kisika in glukoze, kar zmanjša količino energije, ki je na voljo za vzdrževanje ionskih gradientov. Ko se energija izčrpa, izgine tudi membranski potencial, kar povzroči depolarizacijo nevronov in glije. Posledično se odprejo napetostno odvisni Ca^{2+} kanali, kar povzroči vdor Ca^{2+} v celice, to pa sproščanje ekscitatornih aminokislin (predvsem glutamata) v ekstracelularni prostor. Istočasno so ovirani tudi drugi energijsko odvisni procesi, kot je na primer ponovni privzem ekscitatornih prenašalcev, kar še dodatno poveča kopičenje glutamata v ekstracelularnem prostoru. Aktivacija NMDA receptorjev in metabotropnih glutamatnih receptorjev dodatno prispeva k preobremenitvi s Ca^{2+} (28).

Glutamat in Ca^{2+} sta najbolj razširjena kemična mediatorja pri možganskih funkcijah, tako ekstra kot intracelularno; prav zato motnje v njuni regulaciji povzročajo takšno citotoksično opustošenje (19).

Porast univerzalnega sekundarnega prenašalca Ca^{2+} bi naj sprožil vrsto citoplazemskih in jedrnih dogodkov, ki globoko vplivajo na razvoj tkivne poškodbe, kot je npr. aktivacija proteolitičnih encimov, ki razgrajujejo citoskeletne proteine (aktin, pektin) in ekstracelularne proteine matriksa (laminin) (28).

Edem

Zaradi porasta glutamata v zunajceličnem prostoru in aktivacije receptorjev za glutamat se odprejo kanali za monovalentne ione, kot sta Na^+ in Cl^- , ki lahko prosto vstopajo v celico; poleg njih pasivno vstopa tudi voda, saj je vnos Na^+ in Cl^- mnogo večji kot pa izstop K^+ . Posledica je edem, ki poslabša perfuzijo s krvjo v območju okoli izvorne poškodbe, lahko pa tudi poviša intrakranialni tlak, stisne okoliške žile in povzroči herniacijo. Možganski edem je eden izmed glavnih dejavnikov pri napovedovanju preživetja v prvih urah po kapi (28).

Nastajanje prostih radikalov

Med reperfuzijo se poškodba še poveča, saj se po ponovni oksigenaciji prične nastajanje in sproščanje reaktivnih kisikovih spojin. Nastajati začeno po poškodbah v mitohondrijskih verigah prenašanja elektronov, ki jih povzroči kopičenje kalcija v mitohondrijih in nezadostna zasičenost citokrom oksidaze s kisikom. Mitohondrijska membrana postane prepustna, kar povzroči njihovo otekanje, zastoj v proizvodnji ATP in izbruh kisikovih prostih radikalov. Na nastajanje kisikovih radikalov vpliva tudi povečana sinteza prostaglandinov in pretvorba hipoksantina v ksantin in urično kislino. Kisikovi prosti radikali povzročajo neposredno škodo, delujejo pa tudi kot pomembne signalne molekule, ki sprožijo vnetje in apoptozo. Povečana koncentracija prostega Ca^{2+} aktivira tudi nevronske NO sintazo, ki generira NO; ta v nizkih koncentracijah deluje nevroprotektivno, v visokih koncentracijah pa se ob prisotnosti reaktivnih kisikovih spojin tvorijo močno reaktivni peroksinitriti in hidroksilni radikali (19, 28, 30).

NO dodatno škoduje energetskega metabolizmu, saj lahko okvari proces glikolize, cikel trikarboksilnih kislin in mitohondrijsko elektronsko transportno verigo. Kisikovi prosti radikali ali njihove kombinacije z dušikovim oksidom lahko napadejo lipidne membrane.

Prav tako okvarijo DNA, kar sproži popravljalni encim poli(ADPriboza)polimerazo (PARP); njena aktivacija povzroči še večjo porabo nikotinamid adenin dinukleotida (NAD^+), ki je intermediat v mitohondrijski produkciji ATP, kar še dodatno oteži funkcije mitohondrijev. Aktivacija PARP je povezana z povečano stimulacijo NMDA, ne pa tudi ne-NMDA glutamatnih receptorjev. Fragmentacija DNA, ki jo povzročijo cisteinske proteaze, še dodatno prispeva k aktivaciji PARP. Vsi ti dogodki igrajo pomembno vlogo pri energetski izčrpanosti po hipoksični ishemiji (30).

1.4.2 PERI-INFARKTNE DEPOLARIZACIJE

Ishemični nevroni se zaradi primanjkljaja energije in sprostitve K^+ ter glutamata iz celic depolarizirajo. V centru poškodbe so lahko celice podvržene anoksični depolarizaciji in se nikoli več ne repolarizirajo. V penumbri se celice še lahko repolarizirajo, vendar na račun še večje porabe energije, saj se lahko zgodi, da se iste celice ponovno depolarizirajo kot odziv na povišan K^+ in glutamat v ekstracelularni tekočini. Tem ponavljajočim se depolarizacijam pravimo peri-infarktne depolarizacije, ki so bile dokazane pri mišjih, podganjih in mačjih modelih kapi. Pojavljajo se z frekvenco več dogodkov na uro, trajajo pa lahko od 6 do 8 ur. Večje kot je število depolarizacij, večja je poškodba; zdravila, ki lahko zmanjšajo število depolarizacij, zmanjšajo tudi obseg poškodbe. Težava je, da zaenkrat še ni ustreznih metod za detekcijo peri-infarktne depolarizacij pri ljudeh, zato tudi njihov pomen pri patofiziologiji kapi še ni povsem znan (28).

1.4.3 VNETJE

S Ca^{2+} povezana aktivacija intracelularnih sekundarnih prenašalskih sistemov, povečana koncentracija kisikovih prostih radikalov, pa tudi hipoksija sama po sebi, sprožijo ekspresijo številnih provnetnih genov. Poškodovane možganske celice začno proizvajati mediatorje vnetja, kot so trombocite aktivirajoči dejavnik (PAF), tumorje nekrotizirajoči faktor α ($\text{TNF}\alpha$) in interlevkin 1β ($\text{IL-1}\beta$). Posledično se sproži ekspresija adhezijskih molekul na površini endotelijskih celic; te nato interagirajo s komplementarnimi površinskimi receptorji na nevtrofilcih. Nevtrofilci se povežejo z endotelijem, preidejo žilno steno in vstopijo v možganski parenhim; sledijo jim tudi makrofagi in monociti. Poškodovane celice izločajo kemokine (npr. interlevkin 8), ki vodijo migracijo vnetnih celic proti ishemičnemu področju. Tudi druge celice v možganih sodelujejo v vnetnem

odgovoru; 4 do 6 ur po ishemiji astrociti hipertrofirajo, medtem ko celice mikroglije skrčijo svoje izrastke in preidejo v ameboidno obliko, ki je značilna za aktivirano mikroglijo (28).

Post-ishemično vnetje prispeva k ishemični poškodbi preko mnogih mehanizmov. Nevtrofilci lahko povzročijo mikrovaskularno obstrukcijo, kar še dodatno prispeva k ishemiji, pomembne posledice pa ima tudi proizvodnja toksičnih mediatorjev, ki jih izločajo aktivirane vnetne celice in poškodovani nevroni. Poškodba se zmanjša, kadar se prepreči infiltracija nevtrofilcev (z indukcijo sistemske nevtropenije), nevtralizira adhezijske molekule s protitelesi ali pa zavre delovanje vnetnih mediatorjev, npr IL-1 β . Vnetna reakcija je najbrž povezana tudi z apoptozo, saj protitelesa proti adhezijskim molekulam zmanjšajo post-ishemično vnetje in zmanjšajo apoptotično smrt v ishemičnih možganih (28).

1.4.4 APOPTOZA/NEKROZA

Nekroza je najpogostejši način umiranja celic po akutni, trajni okluziji žile v sredici poškodbe; gre za eksplozivno uničenje celične membrane. Apoptoza je oblika celične smrti, ki prevlada po blažji ishemični poškodbi in je značilna za območje penumbre; je genetsko programiran proces, pri katerem pride do kondenzacije jedra in krčenja citoplazme, membrane pa ostanejo nedotaknjene do fagocitoze. Katera celična smrt bo prevladala, je odvisno od narave in intenzivnosti dražljaja, od tipa celice, njene razvojne stopnje ali stanja v celičnem ciklusu (28, 29, 30).

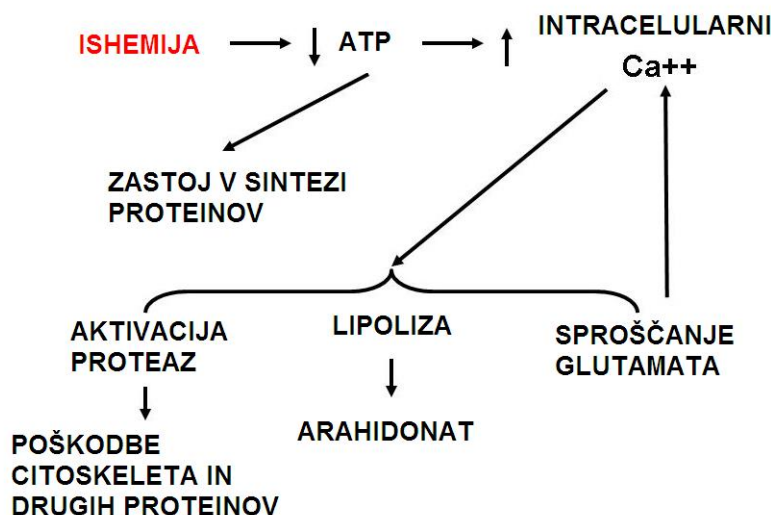
Ankarcrona s sodelavci je v kultiviranih nevronih odkril, da je nekroza povezana z bolj intenzivnimi ekscitotoksičnimi inzulti; manj obsežni inzulti stimulirajo mitohondrije, da sprostijo citokrom C in druge proteine, ki aktivirajo kaspaze in apoptozo po intrinzični poti (30).

Geni za kaspaze so, tako kot geni, ki zavirajo (npr. Bcl2) ali spodbujajo (npr. Trp53) celično smrt, močno izraženi in aktivirani tako pri zgodnji, kot pri pozni fazi ishemije; genske manipulacije ali zdravila, ki blokirajo kaspaze ali spodbujajo delovanje Bcl2, dajejo odpornost proti ishemični poškodbi. Kaspaze so aspartatno specifične cisteinske proteaze in obstajajo v celicah kot proencimi (neaktivni encimski prekursorji oz.

zimogeni). Do zdaj jih je bilo identificiranih 12, kaspazi 1 in 3 pa bi naj imeli osrednji vlogi v apoptozi po ishemiji (28).

Aktivirane kaspaze so encimi, ki cepijo proteine in s tem neposredno razgrajujejo celico, ali pa aktivirajo neaktivne oblike drugih proteinov, ki sodelujejo pri apoptozi. Inhibitorji kaspaz ne samo zmanjšajo količino mrtvega tkiva pri fokalni ishemiji, ampak tudi zmanjšajo nevrolški deficit, kar kaže na možnost ohranjanja funkcij ishemičnega nevrnskega tkiva (28).

Tudi aktivacija drugih proteaz, kot je npr. družina IL-1 β konvertaz, sodeluje pri apoptozi, kar nakazuje na povezavo z vnetnim odzivom (30).



Slika 7: Shematski prikaz dogodkov pri možganski kapi.

1.4.5 VLOGA ASTROCITOV PRI MOŽGANSKI KAPI

Nevroni so izmed vseh celic najbolj dovzetni na ishemično poškodbo, še posebej pa so občutljivi na poškodbe s kisikovimi prostimi radikali, ki nastajajo med in po reperfuziji. To je najbolj očitno pri odmiranju nevronov v dnevih po inzultu; pojav imenujemo zakasnjena celična smrt. Po drugi strani so astrociti na ishemijo znatno bolj odporni in obstaja mnogo dokazov za njihovo konstitutivno neuroprotektivno delovanje, vsaj v razmerah *in vitro* (31).

Glavni vzrok za celične poškodbe po ishemiji je nastajanje reaktivnih kisikovih spojin (ROS). Obseg poškodbe, ki jo povzročijo kisikove reaktivne spojine, je odvisen predvsem od astrocitov. Astrociti, ki vsebujejo glutation, namreč poskrbijo za odstranjevanje večine prostih radikalov. Pri ishemiji je vloga GSH v odstranjevanju oksidantov najbolj očitna pri

meritvah upada njegove koncentracije v obdobju reperfuzije, ko bi naj bilo nastajanje prostih radikalov največje. V celičnih kulturah je bilo dokazano, da je delovanje ekscitotoksičnih spojin, ki spodbujajo nastanjanje ROS, odvisno od intracelularne koncentracije GSH. Ekstracelularni GSH glede na raziskave deluje nevroprotektivno tako *in vivo* kot *in vitro* (31).

Študije na celičnih kulturah so pokazale, da imajo astrociti večjo vsebnost GSH, pa tudi mnogo večje aktivnosti ključnih encimov, udeleženih v metabolizmu GSH in višje koncentracije pomembnih intermediatov. Ne samo, da so astrociti bolj kompetentni za odstranjevanje ROS, ampak tudi podpirajo odstranjevanje ROS v nevronih. Možno je, da lahko astrociti razbremenijo nevrone, tako da se ponudijo kot alternativna tarča napadu ROS. Vplivajo tudi na nivo GSH v nevronih; poskusi na kulturah so pokazali zelo nizke koncentracije GSH v nevronih, če v kulturi ni bilo prisotnih tudi astrocitov. Nevroni, kultivirani skupaj z astrociti, so mnogo bolj odporni na napad ROS kot nevrone, kultivirani sami. Dokazano je bilo tudi, da astrociti z odstranjenim GSH izgubijo sposobnost pomoči nevronom (3).

1.4.6 VLOGA HISTAMINA PRI MOŽGANSKI KAPI

Cerebralna ishemija inducira prekomerno sproščanje glutamata in poveča intracelularno koncentracijo kalcija v nevronih, kar izzove encimske procese, ki vodijo v ireverzibilno možgansko poškodbo. Histamin se pri ishemiji povečano izloča zaradi povečane oz. intenzivnejše histaminergične aktivnosti. V nasprotju z glutamatom je sproščanje histamina pri ishemiji postopno in dolgotrajno. Povečanje histamina morda deluje protektivno ob ishemični poškodbi, saj supresija histaminergične aktivnosti poslabša histološki izid, povzročen z ishemijo. Preishemična administracija histamina zavre ishemično sproščanje glutamata in zmanjša nevronske poškodbe, medtem ko blokada centralnih H₂ receptorjev poslabša ishemično poškodbo. To nakazuje, da ima histamin zaščitne učinke pri ishemični poškodbi, posredovane preko H₂ receptorjev, kadar se histamin da pred indukcijo ishemije. Postishemično dajanje histidina (prekursorja histamina) ublaži tako možganski infarkt kot zakasnelo nevronske smrt; s tem bi se lahko preprečevalo reperfuzijske poškodbe po ishemičnih dogodkih. Protivnetno delovanje, povzročeno s stimulacijo H₂ receptorjev, je najverjetnejši mehanizem, odgovoren za izboljšanje (3).

1.4.7 DEKSAMETAZON PRI ZDRAVLJENJU MOŽGANSKE KAPI

Glukokortikoidi so razred steroidnih hormonov, ki se vežejo na glukokortikoidne receptorje, prisotne v skoraj vseh celicah vretenčarjev. Ime je skovanka, ki nakazuje na njihovo vlogo v regulaciji metabolizma glukoze, sintezo v adrenalni skorji in steroidno strukturo (**glucose + cortex + steroid**) (32).

Njihova glavna vloga je modulacija vnetne reakcije. Sodelujejo v povratnih mehanizmih pri imunskem odzivu in zmanjšujejo aktivnost imunskega sistema. Po vezavi na receptor se sproži ekspresija protivnetnih proteinov v jedru, zavre pa izražanje provnetnih proteinov v citosolu (32).

Deksametazon spada med sintetične glukokortikoide. Njegovo delovanje je 20 do 30-krat močnejše od naravnega hormona kortizola in 4 do 5-krat močnejše od prednizona (33).

Ker je bila farmakoterapija z glukokortikoidi pri vnetjih in neoplazmah v možganih tako uspešna, so podobne učinke pričakovali tudi pri zdravljenju možganske kapi, čeprav še ni bil poznan točen patološki proces, niti metodologija za klinična preskušanja. Večina preskušanj je bilo premajhnih v obsegu ali pa prepoznih za zdravljenje poškodbe, kar je vodilo v (pre)zgodnje opuščanje te potencialne poti zdravljenja (34).

Citotoksični ali intracelularni edem predstavlja najzgodnejši odziv na cerebralno poškodbo (ishemično ali travmatično) in je posledica odpovedi ionskih črpalk, kar povzroči vdor vode v celice. Klinični učinek in odziv na kortikosteroide pri tem tipu edema je negotov. Vazogeni edem se pojavi več ur kasneje in je posledica poškodovane krvno-možganske bariere, ki postane prepustna in dovoljuje vstop vode, elektrolitov in tudi proteinov v parenhim. V študijah vazogenega edema pri možganskih tumorjih so odkrili močno odzivnost na kortikosteroide, kar nakazuje tudi na možnost uporabe pri možganski kapi; težava je le v tem, da vazogeni edem nima velikega prispevka k celotnemu edemu po ishemični kapi. Razlika v patofiziologiji obeh tipov edema je morda vzrok za razlike v terapevtskem odzivu (34, 35).

Deksametazon je v določenih študijah zmanjšal možganski edem po ishemiji, vendar mehanizem še ni poznan. Ena možnost je inhibicija aktivnega transporta Na^+ preko krvno-možganske bariere (KMB), saj nekateri steroidi, še posebej progesteron, inhibirajo natrijev

transport v izoliranih možganskih kapilarah. V študiji je bil možganski edem značilno zmanjšan po predzdravljenju z deksametazonom ali progesteronom. Oba steroida sta v zdravih možganih zmanjšala permeabilnost KMB na aminoizomasleno kislino (AIB, pasivno permeabilna spojina) za okoli 40 %, v ishemičnih možganih pa v manjši meri. Nasprotno, uporaba steroidov ni imela vpliva na permeabilnost bariere za Na^+ niti v zdravih niti ishemičnih možganih. Študija nakazuje, da zdravljenje z deksametazonom ali progesteronom sicer zmanjša možganski edem v prvih fazah ishemije, vendar ta učinek ni posledica zmanjšane permeabilnost krvno-možganske bariere na Na^+ (36).

Glukokortikoidi imajo lahko močan učinek na izid možganske poškodbe, vendar je le-ta izrazito odvisen od časa dajanja po inzultu. Čeprav ima dajanje kortikosteroidov tik pred ali po inzultu majhen učinek na poškodbo, pri podganjih mladičih pa celo poveča smrtnost, je Barks s sodelavci pokazal, da je delovala uporaba 24 ur pred inzultom močno protektivno. Tudi uporaba 6 ur pred inzultom je nudila nekaj zaščite. Mehanizem tega učinka še ni odkrit (30).

Študija, v katero so vključili 100 pacientov z infarktom v območju srednje cerebralne arterije, kiso naključno prejeli deksametazon (100 mg i.v. na dan, 7 dni), po enem letu spremljanja ni pokazala razlik v primerjavi s kontrolno skupino. Kljub temu pa so pri bolnikih, ki so prejeli deksametazon, opazili hitrejše vidno izboljšanje, še posebej pri tistih s hudimi kapmi in obsežnimi edemi (35).

V drugi študiji pa so pri bolnikih s kapjo, ki so prejeli deksametazon, opazili večjo smrtnost in slabše izboljšanje stanja kot pri kontrolni skupini bolnikov, vendar so imeli pacienti, ki so prejeli deksametazon, tudi obsežnejše kapi. Statistična analiza pacientov s kapjo v predelu srednje cerebralne arterije ni pokazala razlike v izidu in neželenih posledicah zdravljenja pri pacientih na terapiji s steroidi ali brez njih. Zato so mnenja o uporabi steroidov pri možganski kapi deljena (35, 37).

Študije nakazujejo, da deksametazon v nezrelih podganjih možganih nabrž deluje protektivno proti ishemiji, saj poveča obseg glikolize in s tem poveča koncentracijo možganskega ATP. Kortikosteroidi imajo na možgane še druge neraziskane učinke, kot je značilno povečan krvni pretok skozi možgane na testnih živalih. Sodelovali bi naj tudi pri odstranjevanju prostih radikalov. Vseeno pa še ni dovolj dokazov, ki bi podpirali rutinsko

uporabo glukokortikoidov pri akutnem cerebralnem infarktu; za zdravljenje edema se preferirajo dehidracijske spojine, kot je npr. glicerol (34, 35, 38).

2. NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Možgani človeka tehtajo 1,5 kg, kar predstavlja največ 2 % telesne mase. Možgani so dobro prekrvljeni, saj gre skozi njih približno 12 do 15 % krvi na časovno enoto. Porabijo tudi 20 % vse glukoze, ki jo potrebuje telo, zato je dovajanje kisika in hranil nujno za vzdrževanje pravilnega delovanja možganov. Možganska smrt nastopi nekaj minut po prekinitvi krvnega obtoka; pri zdravljenju možganske kapi imamo 3 urni interval, v katerem moramo izvesti interventne posege, da se izognemo nevrološkim posledicam.

V našem delu nas je zanimalo, kako na pomanjkanje kisika in hranil reagirajo astrociti. Zato smo jim odvzeli glukozo in serum in jih postavili v inkubator, ki ni vseboval kisika; vzpostavili smo eksperimentalni model možganske kapi in preverili, kako to vpliva na privzem histamina v astrocite. Ker vsaka poškodba možganov izzove vnetje, ki dodatno okvari možgane, smo v drugem delu raziskovalne naloge preverili, če kortikosteroidi zmanjšajo posledice eksperimentalne poškodbe.

V raziskovalni nalogi smo preverili naslednje delovne hipoteze:

1. Po odtegnitvi kisika in hranil se bo količina privzetega histamina v astrocite zmanjšala.
2. Pomanjkanje kisika in hranil bo spremenilo kinetiko privzema histamina.
3. Deksametazon bo ohranil sposobnost privzema histamina v astrocite.

3. MATERIALI IN OPREMA

3.1 MATERIALI

- [³H]-histamin (histamine dihydrochloride) (66,7 GB q/mmol; specifična aktivnost 12,54 Ci/mmol; Perkin Elmer, ZDA)
- Histamin (histamine dihydrochloride) (Sigma)
- L-15 Medium (Leibovitz); Sigma
- Tripsin – EDTA, 0,05 % (1X), GIBCO
- Antibiotik gentamicin – 50 mg/ml; GIBCO, 15750-045
- Albumin iz govejega seruma (Sigma)
- DMEM – po Dulbeccu spremenjen Eaglov medij (1X); GIBCO
- Natrijev piruvat, 100 mM; GIBCO
- L-glutamin, 200 mM (100X); GIBCO
- pufer za privzem histamina, sestava:
 - HEPES (Sigma)
 - MgSO₄ × 7H₂O (Sigma)
 - CaCl₂ (Sigma)
 - Glukoza (Merck)
 - NaCl (Merck)
 - KCl (Merck)
 - KH₂PO₄ (Merck)
- Scintilacijska tekočina Aquasol (DuPont)
- Reagent za barvanje (Bio-Rad Protein Assay)
- NaOH (Merck)

3.2 OPREMA

VRSTA APARATURE	PROIZVAJALEC
Brezprašna komora z laminarnim pretokom zraka	Iskra
Centrifuga	Sigma
Centrifugirke	TPP, Eppendorf
Hladilnik	Gorenje
Inkubator	Binder
Mikrotitrne plošče	TPP (96 well, UV-transparentne)
Nastavki za pipete	TPP, Eppendorf
Plastenke za gojenje s perforiranim zamaškom	TPP
Pipete	Gilson, Eppendorf
Scintilacijski števec	Perkin Elmer
Spektrofotometer	Tecan Group Ltd.
Tehtnica	Mettler
Vorteks	Tehtnica Železniki
Zmrzovalna skrinja	Gorenje

4. METODE

4.1 POSKUSNE ŽIVALI

Za izvajanje poskusov na živalih smo pridobili dovoljenje Veterinarske uprave Republike Slovenije št. 34401-1/2010/8. 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 primarnih kultur astrocitov smo uporabili neonatalne (3 dni stare) podgane vrste *Rattus norvegicus* seva Wistar obeh spolov. Živali smo žrtvovali z namenom odstranitve možganov.

To živalsko vrsto smo izbrali zlasti zaradi možnosti primerjave z že objavljenimi študijami, možnosti prenosa ugotovitev v humano medicino ter lahke dostopnosti. Živalsko tkivo je bilo potrebno uporabiti, ker ni ustreznega neživalskega modela za izvajanje poskusov, potrebnih za preverjanje naših hipotez.

4.2 PRIPRAVA PRIMARNIH KULTUR ASTROCITOV

Za pridobitev čistih kultur astrocitov možganske skorje smo le-te pripravljali po uveljavljenemu protokolu.

Podgane je dekapitiral tehnik, ki ima dovoljenje za izvajanje evtanazije poskusnih živali. Iz lobanje dekapitiranih podgan smo previdno odstranili možgane ter jih potopili v raztopino Leibowitz L-15. Nato smo z možganov odstranili možganske ovojnice in izolirali možgansko skorjo. S pomočjo pipet in injekcijskih igel različnih svetlin smo mehansko razdrobili možgansko tkivo v raztopini L-15. Dobljeno suspenzijo smo centrifugirali, nato pa usedlino prenesli v gojilne posode z medijem DMEM (po Dulbeccu modificiran Eaglov medij). Ta 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.

Celice smo gojili do prve konfluentnosti, jih nato stresali preko noči pri 225 obratih/minuto in zjutraj zamenjali medij. S postopkom, ki smo ga ponovili tri dni zapored, smo odstranili kontaminirajoče celice, predvsem mikroglijo, ki se ne more pritrčiti na gojitveno posodo tako dobro kot astrociti. Nato smo celice v posodah tripsinizirali in odlepljene prenesli v nove posode. 24 ur smo jih gojili v prisotnosti 20 μ M/mg antimetabolita citozin arabinozida, ki je onemogočil rast fibroblastom.

Ko so celice znova postale konfluentne, smo jih ponovno 3 dni stresali čez noč, čez dan pa zamenjali medij. Zopet smo jih tripsinizirali in prenesli na testne plošče z 12 luknjicami; te kulture astrocitov smo v inkubatorju gojili še 3 tedne, nato pa smo jih uporabili za poskus.

4.3 PRIVZEM HISTAMINA V KULTURE ASTROCITOV

Za pridobitev informacij o lastnostih privzema histamina v kulture astrocitov smo plošče najprej za določen čas izpostavili hipoksiji in pomanjkanju hranil, za tem pa še simulirali reperfuzijo s ponovnim dodatkom hranil in kisika za 21 ur. Nato smo spremljali koncentracijsko odvisnost privzema ter vpliv dodatka deksametazona na privzem histamina.

4.3.1 PRIPRAVA TESTNIH PLOŠČ

Ishemija in reperfuzija v razmerah in vitro

Vsako ploščo smo pred poskusom izpostavili pomanjkanju kisika in hranil. Celicam smo najprej odstranili gojilni medij ter ga nadomestili z DMEM brez glukoze in seruma. Nato smo jih inkubirali 1, 3 ali 6 ur v inkubatorju z 0,2 % O₂ in 5 % CO₂. Po hipoksiji smo celicam zamenjali medij; ponovno smo dodali gojitveni medij z visoko koncentracijo glukoze in seruma, inkubirali nadaljnjih 21 ur pri 37°C, 95 % zraka in 5 % O₂ ter nato naredili poskus privzema histamina.

Inkubacija z deksametazonom

Deksametazon smo v primarne kulture astrocitov dodali pred izpostavitvijo hipoksiji ali med reperfuzijo (po hipoksiji); v vsakem primeru je inkubacija z deksametazonom trajala 24 ur pri 37 °C. Nato smo odstranili medij z dodatkom deksametazona in ga zamenjali s svežim. Enako smo naredili tudi s kontrolno ploščo, le da ni bila izpostavljena hipoksiji.

4.3.2 POSKUS

Privzem histamina

Poskuse smo izvajali pri 37 °C, kjer se spremlja celokupni privzem in pri 4 °C, kjer prevladuje nespecifičen privzem; za inkubacijo pri 4 °C smo vzorce postavili na led, pri 37 °C pa smo vzorce imeli v inkubatorju. Specifični privzem je predstavljal razliko med celokupnim privzemom in privzemom histamina, izmerjenega pri 4 °C.

Najprej smo odstranili DMEM medij in celice dvakrat sprali s pufrom za privzem. Nato smo na plošče dodali različne koncentracije ³H-histamina in histamina, v končnih koncentracijskih območjih od 0,125 μM do 90 μM in inkubirali 20 minut pri 37 oz. 4 °C. Slepri vzorec so predstavljali astrociti, ki jim je bil dodan le pufer za privzem. Po preteklem času smo reakcijo prekinili s postavitvijo testnih plošč na led ter odstranitvijo inkubacijske tekočine. Sledilo je trikratno spiranje z ledeno mrzlim pufrom brez CaCl₂ in liziranje celic z dodatkom 300 μl 0,5 M NaOH med stresanjem. V 250 μl lizata smo s scintilacijskim števcem izmerili količino privzetega histamina, v preostalem lizatu pa smo določili koncentracijo proteinov.

Vpliv deksametazona na privzem histamina:

Na začetku poskusa smo dodali po 100 μl 0,125 μM ³H-histamina, inkubirali 20 minut pri 37 °C in privzem prekinili s postavitvijo reakcijskih petrijevok na led ter odstranitvijo inkubacijske tekočine. Sledilo je trikratno spiranje z ledeno mrzlim pufrom brez CaCl₂ in liziranje celic z 300 μl 0,5 M NaOH med stresanjem. V 250 μl lizata smo s scintilacijskim števcem izmerili količino privzetega histamina, v preostalem lizatu pa smo določili koncentracijo proteinov.

4.4 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PRIVZETEGA HISTAMINA

Koncentracijo histamina, privzetega v celice, smo določili s tekočinskim scintilacijskim števcem, s katerim smo merili β sevanje, ki ga oddaja ³H histamin. 250 μl vsakega vzorca smo dodali 1500 ml scintilacijske tekočine Aquasol; to je 'koktejl' aromatskih topil z dodatkom scintilatorjev. Scintilator je snov, ki absorbira energijo ionizirajočega sevanja, nato pa jo odda v obliki svetlobe. V idealnih pogojih vsak beta žarek povzroči svetlobni

signal. Števec ima dve fotopomnoževalni celici, ki zaznavata svetlobne signale. Štejejo se le signali, ki dosežejo obe celici, ostale pa detektor prezre; s tem se odstrani šum ozadja. Meritve so potekale pri sobnem tlaku in temperaturi.

4.5 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV (METODA PO BRADFORDU)

Koncentracijo proteinov smo določali po Bradfordovi metodi (z barvilom BioRad). Na mikrotitrski plošče smo odpipetirali standarde albumina (0,5 µg, 1 µg, 1,6 µg, 2 µg, 4 µg, 6 µg in 10 µg, razredčeno na 200 µl) ter po 8 µl vzorcev, ki smo jim dodali po 152 µL vode in 40 µL barvila ter premešali. Pripravljene raztopine smo pustili stati 30 min pri sobni temperaturi, nato pa spektrofotometrično izmerili absorpcijo pri 595 nm valovne dolžine. Dobljene koncentracije proteinov smo uporabili pri podajanju koncentracij privzetega histamina. Meritve so potekale pri sobnem tlaku in temperaturi.

4.6 ANALIZA PODATKOV

Vse poskuse smo večkrat ponovili. Vsak poskus je bil izveden najmanj v treh paralelah, rezultati pa so bili statistično obdelani.

Statistično značilne razlike smo računali z enosmerno analizo variance (ANOVA) pri primerjavi več skupin hkrati. Statistično značilno razliko predstavlja stopnja tveganja največ 0,05.

Za analizo podatkov smo uporabili računalniški program GraphPad Prism 5.

4.6.1 PRIVZEM HISTAMINA

Za določitev in primerjavo kinetičnih parametrov privzema histamina v astrocite smo dobljene podatke obdelali z nelinearno regresijo. Nelinearna regresija prilagodi podatke katerikoli enačbi, ki definira Y kot funkcijo X in še enega ali več parametrov; poišče vrednosti, ki tvorijo krivuljo, ki je čim bližje izvornim podatkom (minimizira vsoto kvadratov navpičnih razlik med točkami iz podatkov in krivuljo).

S tem procesom smo eksperimentalne podatke prilagodili enačbi 1, če smo želeli podatke o količini privzema (B_{\max}), oz. enačbi 2, če smo želeli podatke hitrosti privzema (V_{\max}). S prvo enačbo smo izračunali tudi ravnotežno konstanto privzema; z drugo pa Michaelis-Mentonovo konstanto privzema (K_m).

Vrednosti parametrov smo nato statistično primerjali z enostransko analizo variance (ANOVA) z naknadnim Bonferronijevim testom (39, 40).

$$B = \frac{B_{\max}[L]}{[L] + K_D} \quad (1)$$

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_M} \quad (2)$$

4.6.2 VPLIV DEKSAMETAZONA NA PRIVZEM

Obdelava podatkov je bila enostavnejša, saj je bila edina uporabljena koncentracija histamina $0,125 \mu\text{M}$. Pri vsakem poskusu smo tako izračunali količino histamina, ki se je privzel pri tej koncentraciji, vrednosti pa nato primerjali z enostransko analizo variance (ANOVA) z naknadnim Bonferronijevim testom.

5. REZULTATI

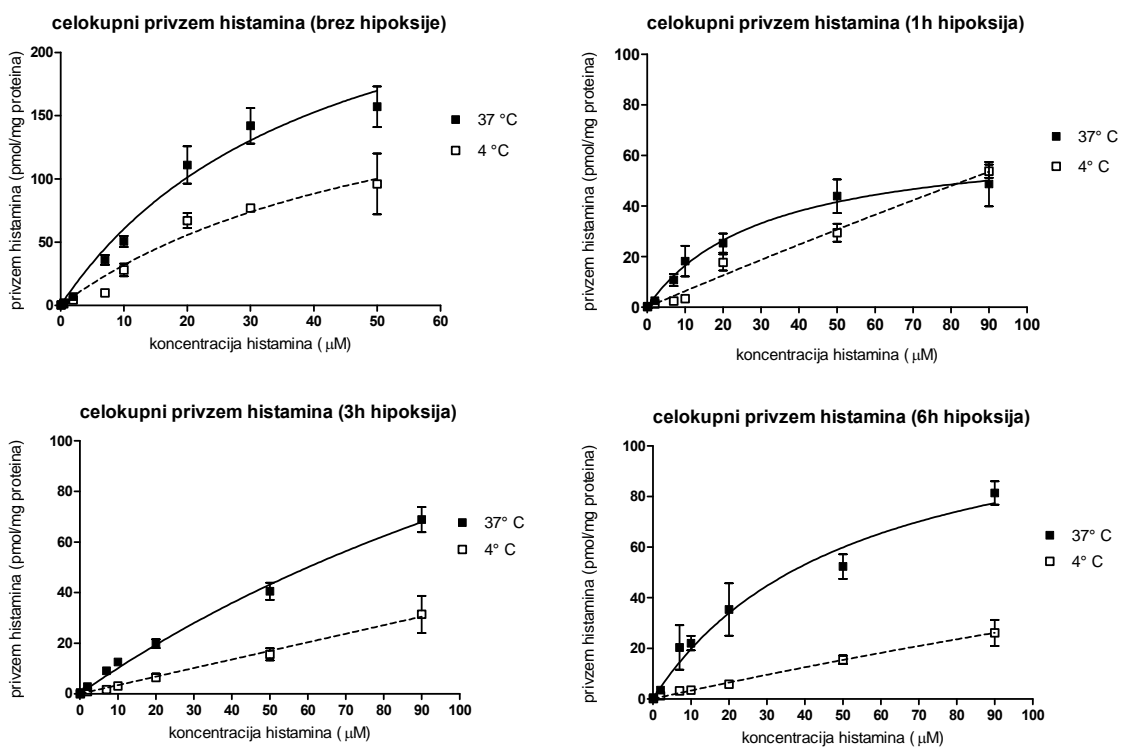
5.1 PRIVZEM HISTAMINA V ODVISNOSTI OD KONCENTRACIJE HISTAMINA

5.1.1. CELOKUPNI PRIVZEM

Histamin se v fizioloških razmerah v neonatalne astrocite privzema s pomočjo dveh procesov: transportom preko prenašalca in elektrodifuzijo (25). V naših poskusih smo privzem histamina preučevali pri 37 °C, kjer smo merili celokupni privzem (vsota specifičnega in nespecifičnega privzema), ter pri 4 °C, kjer smo merili le nespecifični privzem histamina, saj energetske odvisni procesi ne potekajo pri tej temperaturi.

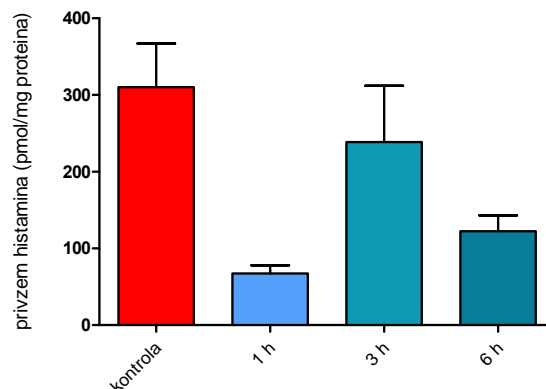
Kot kontrolna vrednost, s katero smo primerjali vrednosti kinetičnih in farmakoloških parametrov privzema histamina po prehodnem pomanjkanju hrane in kisika so nam služili rezultati privzema histamina v astrocite, vzgojene po istih metodah in v »fizioloških« razmerah. Maksimalni privzem je znašal $310 \pm 56,77$ pmol/mg prot./min.

Maksimalni privzem histamina (B_{max}) je pri 1 urnem pomanjkanju kisika in hranil znašal $67,21 \pm 10,59$ pmol/mg prot./min, pri 3 urnem pomanjkanju $238,8 \pm 74,03$ pmol/mg prot./min, pri 6 urnem pomanjkanju pa $122,3 \pm 20,72$ pmol/mg prot./min.



Slika 8: Privzem histamina v astrocite v odvisnosti od njegove koncentracije pri 37 °C oz. 4 °C; na grafu 1A je prikazan privzem brez predhodne hipoksije in pomanjkanja hranil, grafi 1B, 1C oz. 1D pa prikazujejo privzem po 1-, 3- oz. 6-urni hipoksiji in pomanjkanju hranil. Vrednosti so prikazane kot srednja vrednost ± standardna napaka aritmetične sredine najmanj 2 poskusov, opravljenih v triplicatih.

Vrednosti maksimalnega privzema smo statistično primerjali z enostransko analizo variance (ANOVA) in naknadnim Bonferronijevim testom; med vrednostmi ni bilo statistično značilnih razlik.



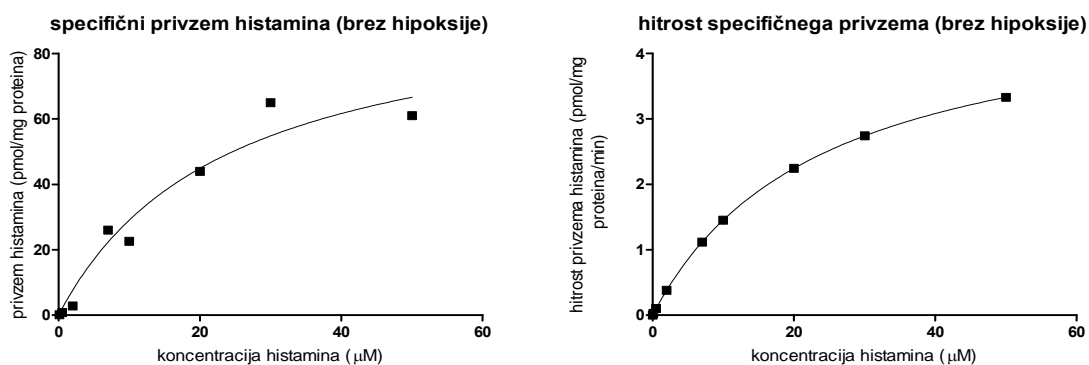
Slika 9: Maksimalni privzem histamina pri kontroli ter 1 urnem, 3 urnem in 6 urnem pomanjkanju kisika in hranil. Vrednosti maksimalnega privzema smo primerjali z enostransko analizo variance (ANOVA) in naknadnim Bonferronijevim testom; med vrednostmi ni bilo statistično značilnih razlik. Vrednosti so prikazane kot srednja vrednost \pm standardna napaka aritmetične sredine najmanj 2 poskusov, opravljenih v triplikatih.

5.1.2. SPECIFIČNI PRIVZEM

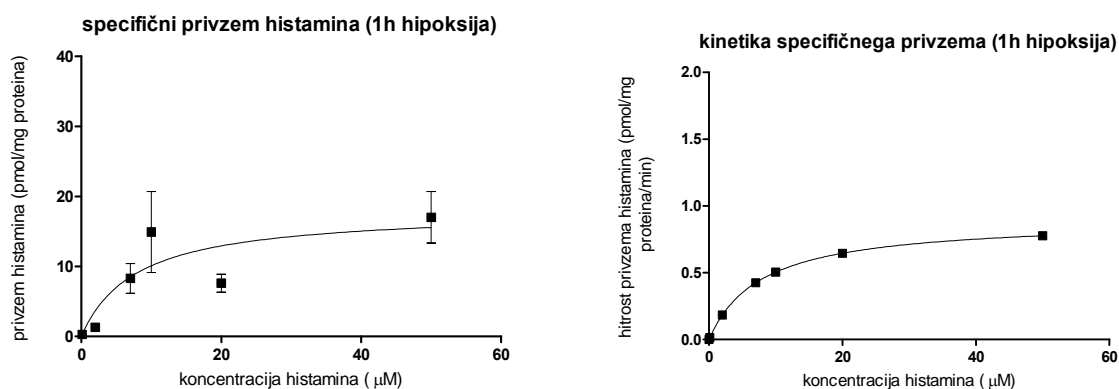
Specifični privzem histamina poteka preko selektivnega, še neopredeljenega transporterja. Gre za aktiven proces, saj je za prenos potrebna energija v obliki ATP, delovanje prenašalca pa je odvisno tudi od ustreznega gradienta Na^+ .

Ker še ne poznamo selektivnega zaviralca privzema histamina, smo najprej izmerili celokupni privzem v astrocite pri 37 °C ter nespecifični privzem pri 4 °C. Vrednosti specifičnega privzema smo nato dobili tako, da smo od celokupnega odšteli nespecifični privzem histamina.

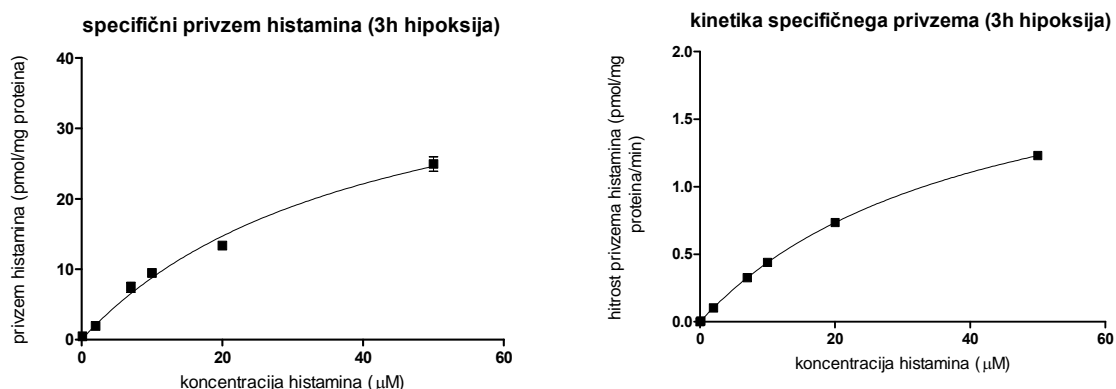
Iz dobljenih podatkov smo z nelinearno regresijo dobili krivulje hitrosti specifičnega privzema, ki so nam dale vrednosti parametrov specifičnega privzema: maksimalno hitrost privzema (V_{max}) ter Michaelis-Mentenovo konstanto (K_m).



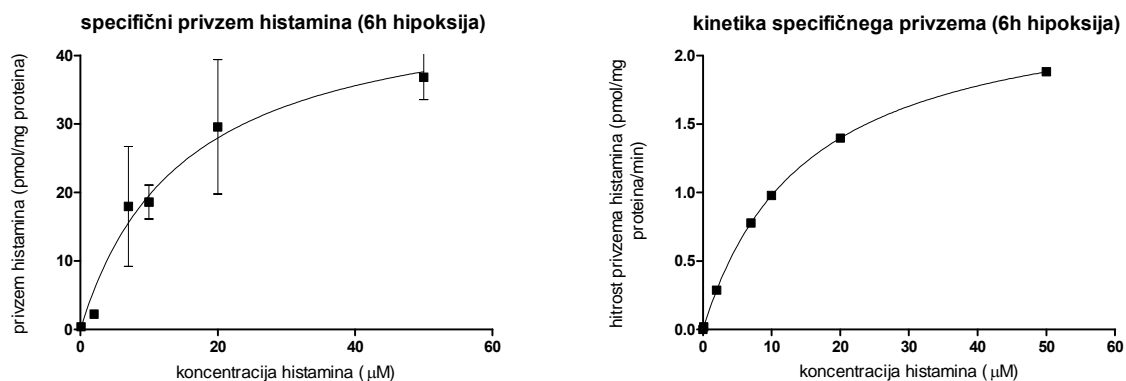
Slika 10: Specifični privzem histamina in hitrost specifičnega privzema pri kontroli, ki ni bila izpostavljena hipoksiji in pomanjkanju hranil. V_{\max} specifičnega privzema histamina je znašala $4,922 \pm 0,001$ pmol/mg prot./min, K_m pa je bila $23,87 \pm 0,02$ μM . Vrednosti so prikazane kot srednja vrednost \pm standardna napaka aritmetične sredine najmanj 2 poskusov, opravljenih v triplikatih.



Slika 11: Specifični privzem histamina in hitrost specifičnega privzema pri astrocitih, ki so bili izpostavljeni 1-urni hipoksiji in pomanjkanju hranil. V_{\max} specifičnega privzema histamina je znašala $0,8981 \pm 0,0004$ pmol/mg prot./min, K_m pa je bila $7,80 \pm 0,01$ μM . Vrednosti so prikazane kot srednja vrednost \pm standardna napaka aritmetične sredine najmanj 2 poskusov, opravljenih v triplikatih.

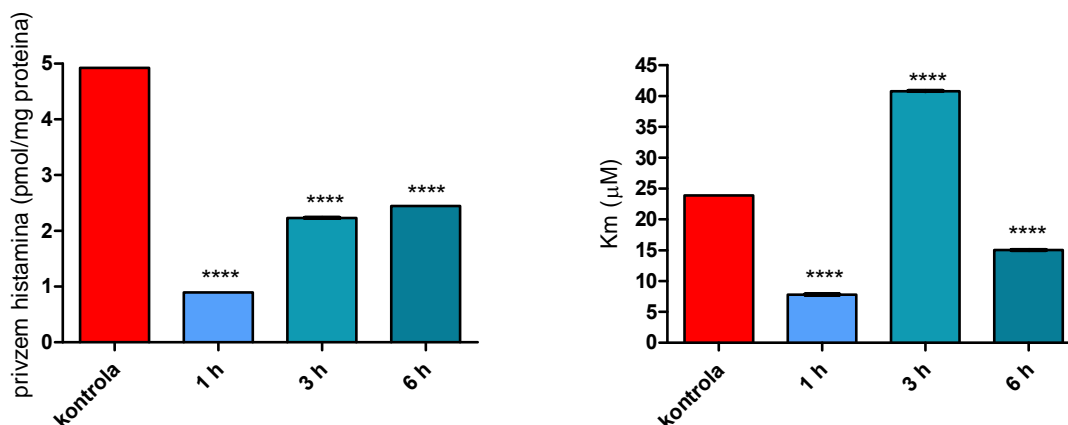


Slika 12: Specifični privzem histamina in hitrost specifičnega privzema pri astrocitih, ki so bili izpostavljeni 3-urni hipoksiji in pomanjkanju hranil. V_{\max} specifičnega privzema histamina je znašala $2,233 \pm 0,001$ pmol/mg prot./min, K_m pa je bila $40,78 \pm 0,05$ μM . Vrednosti so prikazane kot srednja vrednost \pm standardna napaka aritmetične sredine najmanj 2 poskusov, opravljenih v triplikatih.



Slika 13: Specifični privzem histamina in hitrost specifičnega privzema pri astrocitih, ki so bili izpostavljeni 6-urni hipoksiji in pomanjkanju hranil. V_{\max} specifičnega privzema histamina je znašala $2,445 \pm 0,001$ pmol/mg prot./min, K_m pa je bila $15,00 \pm 0,01$ μM . Vrednosti so prikazane kot srednja vrednost \pm standardna napaka aritmetične sredine najmanj 2 poskusov, opravljenih v triplikatih.

Vrednosti maksimalne hitrosti specifičnega privzema in Michaelis-Mentenove konstante smo statistično primerjali z enostransko analizo variance (ANOVA) z naknadnim Bonferronijevim testom; ugotovili smo značilne razlike, tako v primerjavi s kontrolo, kot med samimi hipoksijami.



Slika 14: Maksimalna hitrost privzema histamina (V_{max}) ter Michaelis-Mentenova konstanta (K_m) pri kontroli ter 1-urnem, 3-urnem in 6-urnem pomanjkanju kisika in hranil. Vrednosti maksimalnega privzema smo primerjali z enostransko analizo variance (ANOVA) in naknadnim Bonferronijevim testom; vrednosti, označene z zvezdicami, predstavljajo statistično značilne razlike, **** $p < 0,0001$. Vrednosti so prikazane kot srednja vrednost \pm standardna napaka aritmetične sredine najmanj 2 poskusov, opravljenih v triplikatih.

5.2 VPLIV DEKSAMETAZONA NA PRIVZEM HISTAMINA

Možganska poškodba izzove vnetje, ki delovanje možganov dodatno okvari; poškodovane možganske celice začno proizvajati mediatorje vnetja, izločajo pa tudi kemokine, ki vodijo migracijo dodatnih vnetnih celic proti ishemičnemu področju (28).

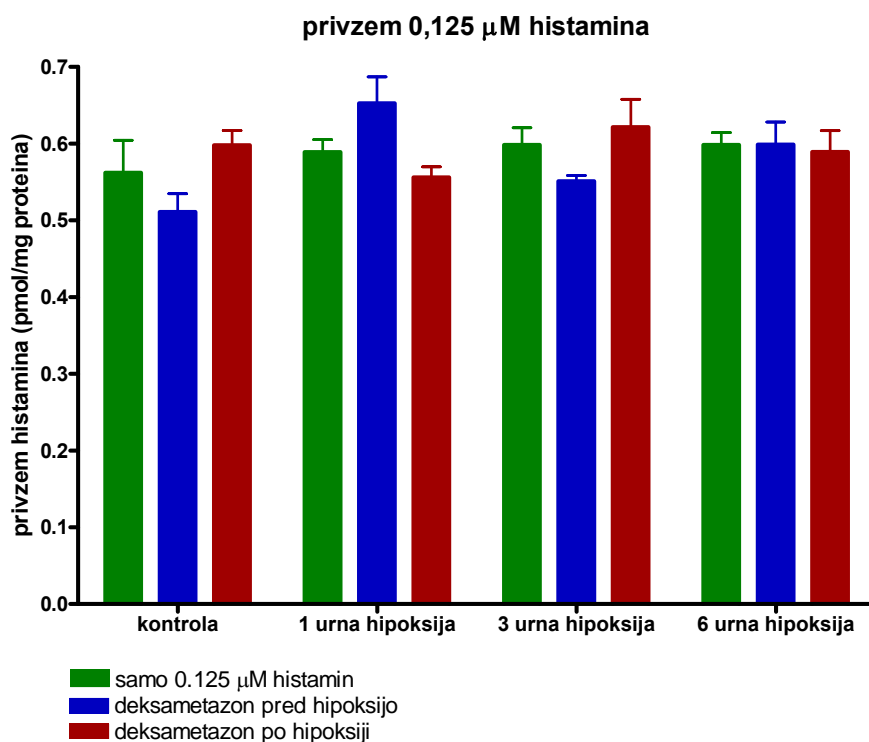
Poškodba, povzročena zaradi vnetja se zmanjša, kadar se prepreči infiltracija nevrofilcev (z indukcijo sistemske nevtropenije), nevtralizira adhezijske molekule s protitelesi ali pa zavre delovanje vnetnih mediatorjev (28).

Glukokortikoidi so znani modulatorji vnetne reakcije. Sodelujejo v povratnih mehanizmi pri imunskem odzivu in zmanjšujejo njegovo aktivnost. Mehanizem njihovega delovanja

še ni povsem pojasnjen; vplivajo na izražanje protivnetnih proteinov v jedru in zavirajo sintezo provnetnih proteinov v citosolu (32).

Ker je pomen vnetja pri ishemični možganski poškodbi velik, smo v drugem delu diplomskega dela preverili, če kortikosteroidi lahko zmanjšajo vpliv eksperimentalne poškodbe na privzem histamina v astrocite.

Deksametazon smo v kulture dodali pred izpostavitvijo hipoksiji in pomanjkanju hranil ali med reperfuzijo (po izpostavitvi hipoksiji in pomanjkanju hranil). V vsakem primeru je inkubacija trajala 24 ur pri 37 °C. Nato smo v kulture dodali 0,125 μ M histamin in izvedli privzem. Dobljene vrednosti privzema smo statistično primerjali z enostransko analizo variance (ANOVA) ter naknadnim Bonferronijevim testom; ugotovili smo, da med vrednostmi privzema ni bilo značilnih razlik.



Slika 15: Vpliv dodatka deksametazona na privzem 0,125 μ M histamina. Vrednosti maksimalnega privzema smo primerjali z enostransko analizo variance (ANOVA) in naknadnim Bonferronijevim testom; deksametazon pri kulturah, ki so bile izpostavljene odtegnitvi kisika in hranil, ni vplival na privzem histamina v primerjavi s kontrolo. Prav tako se niso pokazale nobene značilne razlike med kulturami, če je bil histamin dodan pred ali po odtegnitvi kisika in hranil. Vrednosti so prikazane kot srednja vrednost \pm standardna napaka aritmetične sredine reprezentativnega poskusa, opravljenega v triplicatih.

6. RAZPRAVA

Nevrotransmisija v osrednjem živčnem sistemu je močno uravnavana. Za normalno funkcijo možganov mora biti sproščanje neurotransmiterjev natančno, prav tako pa je pomembna njihova čim hitrejša inaktivacija oziroma odstranitev z mesta delovanja, ker lahko koncentracija neurotransmiterja po sproščanju v sinaptično špranjo doseže celo molarne vrednosti; povprečna koncentracija histamina v CZS je 315 nmol/L. Če ne pride do hitre in učinkovite odstranitve prenašalcev, ostanejo nevroni prekomerno vzdraženi, kar vodi v njihovo nepravilno delovanje in lahko nevrone tudi ireverzibilno poškoduje.

Možganska kap je skupek nevroloških izpadov, ki so ali posledica prehodnega ali trajnega zmanjšanja v pretoku krvi skozi eno izmed glavnih možganskih arterij ali krvavitve. Vzrok za ishemično možgansko kap je večinoma zamašitev žile zaradi tromboze ali embolije. Ne zadosten pretok krvi skozi možgane omeji dostavo substratov, še posebej kisika in glukoze, kar zmanjša količino energije, ki je na voljo za vzdrževanje ionskih gradientov (28), ki so nujno potrebni za vzdrževanje membranskih potencialov in normalno delovanje možganskih celic. Ker nimajo možgani praktično nobene zaloge kisika in zelo majhne zaloge glikogena in glukoze, so zelo občutljivi na ishemične poškodbe (3). Zaradi izčrpanih energijskih zalog in porušeni ionskih gradientov so onemogočeni številni celični procesi, med drugim tudi privzem neurotransmiterjev prek transporterjev.

Za ponazoritev ishemičnih razmer smo v našem delu izbrali ustaljeni eksperimentalni model ishemije v razmerah *in vitro*. Celice smo premestili v inkubator, ki je bil preprihovan z mešanico plinov (s pomanjkanjem kisika) ter gojitveni medij nadomestili z raztopino DMEM, ki ni vsebovala niti glukoze niti govejega fetalnega seruma.

Navedeno trajanje ishemije in reperfuzije smo izbrali zato, ker izsledki kliničnih študij in tudi opažanja iz klinične prakse kažejo, da lahko močno zmanjšamo posledice ishemične možganske kapi, če ukrepamo znotraj 3 ur od nastopa simptomov (6). V tem času po nastopu simptomov ishemične kapi obstaja možnost za interventne ukrepe, npr. raztapljanje in/ali odstranjevanje strdkov z interventno radiološkimi postopki. Po

tem časovnem intervalu že pride do ireverzibilnih nevroloških okvar, predvsem živčnih celic.

Perisinaptični astrociti ne zapolnjujejo samo prostora, ampak so enakovredni člani tridelne sinapse, ki sestoji iz pre- in postsinaptične nevronske celice ter perisinaptičnih astrocitov (10).

Na membranah astrocitov so izraženi številni ionski kanali, kot npr. za K^+ , Na^+ , Cl^- , HCO_3^- in Ca^{2+} . Pomembni so pri ohranjanju prave koncentracije K^+ ionov v ekstracelularnem prostoru med nevroni, s čimer ščitijo nevrone pred stalno depolarizacijo (6, 10, 11).

Perisinaptični astrociti sodelujejo tudi pri odstranjevanju presežnih nevrottransmitterjev iz sinaptične špranje, saj imajo na svojih membranah izražene številne transporterje za različne nevrottransmitterje. Astrociti histamin privzemajo v večji meri kot nevroni, zato so najbrž tudi glavno mesto njegove inaktivacije, saj se v astrocitih izraža tudi histamin-N-metiltransferaza, encim, ki pretvarja histamin v N-metil-histamin (41). Zanimivo je tudi, da astrociti, ne pa živčne celice, vsebujejo pet različnih transporterjev za glutamat, ki se tudi pretežno prevzema v astrocite, ne pa v živčne celice, se v astrocitih razgradi v amino kislino glutamin, ki se izplavi iz astrocitov in privzame v živčne celice, kjer se ponovno pretvori v nevrottransmitter glutamat (42).

Astrociti izkoriščajo glukozo značilno bolje kot nevroni. Predstavljajo glavno skladišče glikogena v CZS in tako zalagajo nevrone z glukozo. Morda je to en od razlogov, da so na ishemično poškodbo občutljivi manj kot nevroni. Zaradi tega so pomembni pri ishemični poškodbi možganov, saj njihove funkcije (tudi sposobnost privzema nevrottransmitterjev) propadejo kasneje kot nevronske, oz. je potrebna obsežnejša možganska poškodba.

Metabolizem histamina v možganih se začne z njegovo metilacijo, ki poteka s pomočjo encima histamin-N-metiltransferaza (HNMT). Ker se HNMT nahaja v citoplazmi celic, histamin pa zaradi pozitivnega naboja le težko prehaja v intracelularni prostor, se mora pred razgradnjo privzeti nazaj v celice oz. okoliško glijo (24).

Na membranah astrocitov so izraženi mnogi transporterji za biogene amine; dopaminski transporter (DAT), serotoninški transporter (SERT), noradrenalinski

transporter (NET), glicinski transporter (GLYT) in GABA transporter (GAT). Ti transporterji spadajo med plazemske membranske transporterje (genska družina SLC6), ki so sestavljeni iz 12 transmembranskih domen, katerih C in N terminalni del se nahajata v citoplazmi; prenos molekul preko njih zahteva razpoložljivost Na^+ ionov in aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze (10, 43).

Histamin prav tako spada med biogene amine. Njegov privzem v glavnem poteka preko selektivnega histaminskega transporterja, ki pa zaenkrat še ni poznan; tudi ta prenos zahteva razpoložljivost Na^+ ionov in aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze (10). Zato je možno (ni pa nujno), da tudi histaminski transporter spada v SCL6 družino plazemskih membranskih transporterjev. Gotovo ne gre za transporterje za GABA, noradrenalin, dopamin ali glicin, saj so vsi poleg Na^+ sklopljeni tudi s Cl^- , transporter za serotonin pa tudi s K^+ ; za histaminski transporter je znano, da je prenos neodvisen od razpoložljivosti Cl^- in K^+ (43).

Možno je tudi, da transport histamina poteka preko prenašalca, sorodnega glutamatnemu. Glutamatni transporter pripada v SLC1 družino transportnih proteinov. Tudi ti so sekundarno-aktivni, kar pomeni, da za prenos glutamata uporabljajo prosto energijo, shranjeno v obliki transmembranskega koncentracijskega gradienta Na^+ , ki ga omogoča aktivno črpanje ionov s pomočjo Na^+/K^+ ATPaze. Prenos ene molekule glutamata v celico je sklopljen s sočasnim premikom 3 Na^+ in 1 H^+ v celico, izstopi pa en K^+ . Izstop kalijevega iona se zgodi neodvisno od prenosa Na^+ in glutamata v celico (42).

Histamin se prenaša tudi preko drugih prenašalcev. Dva znana transporterja za endogene biogene amine sta plazemski membranski monoaminski transporter (PMAT) in organski kationski transporter 3 (OCT3); oba sta sposobna tudi privzema histamina. Privzem je neodvisen od Na^+ in Cl^- , z nizko afiniteto za substrat, vendar z visoko kapaciteto prenosa (44).

Celokupni privzem histamina torej sestavlja več različnih procesov; nespecifični privzem, ki ga predstavlja pasivna difuzija prek membran, specifični aktivni privzem preko še nepoznanega transporterja ter olajšana difuzija, ki poteka preko transporterjev OCT3, PMAT, MATE (in morda še drugih).

Proces privzema je kompleksno sestavljen, pa tudi celice se na ishemično poškodbo odzivajo različno. To je morda vzrok za statistično neznačilne razlike pri primerjavi celokupnega privzema histamina v astrocite po eksperimentalni ishemiji, tako v primerjavi s kontrolo kot tudi v primerjavi med različno dolgimi ishemijami. Ker pri primerjavi celokupnih privzemov nismo prišli do nobenih pravih zaključkov, smo se v nadaljevanju posvetili predvsem specifičnemu privzemu histamina.

Maksimalen specifični privzem histamina po eksperimentalni ishemiji se značilno razlikuje od kontrolne vrednosti. Po vseh eksperimentalnih ishemijah je maksimalen specifični privzem zmanjšan vsaj za dvakrat v primerjavi s kontrolo; pri kontroli znaša 4,922 pmol/mg prot./min, pri 1-urni ishemiji 0,8981 pmol/mg prot./min, pri 3-urni ishemiji 2,233 pmol/mg prot./min, pri 6-urni ishemiji pa 2,445 pmol/mg prot./min.

Statistično značilne so tudi razlike pri primerjavi različno dolgih ishemij. Zanimivo pa je, da je najmanjši maksimalni specifični privzem imela kultura, izpostavljena 1-urnemu pomanjkanju, sledi privzem pri 3-urnem pomanjkanju, največji pa je bil maksimalni specifični privzem pri 6-urnem pomanjkanju kisika in hranil. Pričakovali smo ravno nasproten vrstni red, saj smo predvidevali, da se bo z daljšanjem eksperimentalne ishemije privzem histamina zmanjševal.

Pri primerjavi Michaelis-Mentenove konstante specifičnega privzema smo prav tako ugotovili značilne razlike. Ni pa prišlo do nekega splošnega zvečanja ali zmanjšanja konstante v primerjavi s kontrolo (23,87 μM), saj je pri 1-urnem (7,80 μM) in 6-urnem (15,00 μM) pomanjkanju kisika in hranil K_m manjša od kontrolne vrednosti, pri 3-urnem pomanjkanju pa je konstanta opazno večja (40,78 μM). Prav tako ni opaziti nobene korelacije v parametru K_m pri primerjavi različno dolgih eksperimentalnih ishemij.

Predvidevamo, da smo dobili relevantne rezultate za specifični privzem samo pri 1-urni ishemiji. Ker sta maksimalna privzema tako pri 3-urni kot tudi 6-urni ishemiji večja v primerjavi z 1-urno predvidevamo, da je to zaradi poškodbe membran med ishemijo, zaradi česar se je povečala nespecifična (elektro)difuzija histamina. Težava je v tem, da zaradi nepoznavanja strukture histaminskega transporterja tudi ne poznamo njegovega specifičnega inhibitorja, zato smo specifični privzem izračunali kot razliko privzemov pri 37 °C in 4 °C. S tem pa se nismo mogli popolnoma znebiti vpliva še drugih vrst

privzema, elektrodifuzije in nespecifične difuzije, do katere lahko pride po poškodbi celičnih membran.

Na to misel nas napeljujejo sami rezultati. Maksimalni specifični privzem se pri 1-urni ishemiji v primerjavi s kontrolo zmanjša več kot za 5-krat (0,8981 proti 4,922 pmol/mg prot./min), tako pri 3-urni (2,233 pmol/mg prot./min) kot tudi 6-urni ishemiji (2,445 pmol/mg prot./min) pa je maksimalni privzem v primerjavi s kontrolo zmanjšan malo več kot za faktor 2. Predvidevamo, da je po 1-urni ishemiji sicer prišlo do okvare histaminskega transporta, ne pa še do okvar celičnih membran. 3- in 6-urna ishemija sta povzročili okvare membrane astrocitov, zaradi česar so postale (bolj) prepustne in se je povečala elektrodifuzija oz. nespecifična difuzija preko membran. Predvidevamo, da vrednost maksimalnega privzema predstavlja vsoto okrnjenega privzema prek transporterjev ter nespecifične difuzije prek membran.

Te ugotovitve tudi sovpadajo z izsledki kliničnih študij in klinične prakse, ki pravijo, da je primeren čas za ukrepanje po možganski kapi znotraj treh ur od nastopa ishemije. Po 1-urni ishemiji so celice sicer imele okrnjeno funkcijo specifičnega privzema, vendar so obdržale intaktno membrano, ki je ključna za vzdrževanje ionskih gradientov. Po 3- in 6-urni hipoksiji je bil privzem histamina sicer večji, vendar na račun membranskih poškodb, ki čez čas povzročijo celični propad.

Astrociti v razmerah *in vivo* na poškodbo odreagirajo s t.i. reaktivno gliozo. Dogodki si sledijo po naslednjem vrstnem redu: poškodba možganov (mehanska, infekcijska, nevrotoksična, ishemična); aktivacija mikroglije (možganskih makrofagov), ki začnejo izločati številne citokine in druge mediatorje vnetja, ki med drugim poskrbijo, da se astrociti pretvorijo iz mirujočih v reaktivne, ki so po svoji morfologiji in funkciji zelo podobni fetalnim. Hkrati pa izločaje kemokinov in citokinov (npr. različnih predstavnikov interleukinov), povzroči migracijo dodatnih vnetnih celic proti ishemičnemu področju (8, 28).

Poškodba, povzročena zaradi vnetja se zmanjša, kadar se prepreči infiltracija nevrofilcev (z indukcijo sistemske nevtropenije), nevtralizira adhezijske molekule s protitelesi ali pa zavre delovanje vnetnih mediatorjev (28), zato se glukokortikoide že uporablja npr. po mehanski poškodbi hrbtenjače, ker so ugotovili, da preprečitev vnetja bistveno pospeši zdravljenje (45).

Glukokortikoidi so znani modulatorji vnetne reakcije. Sodelujejo v povratnih mehanizmih pri imunskem odzivu in zmanjšujejo aktivnost imunskega sistema. Sprožajo ekspresijo protivnetnih proteinov v jedru in zavirajo izražanje provnetnih proteinov v citosolu (32).

Protivnetno delovanje glukokortikoidov poteka na več različnih načinov. Glukokortikoidi zmanjšujejo transkripcijo mnogih provnetnih citokinov. To se lahko zgodi z neposredno interakcijo s promoterskimi elementi mnogih citokinskih genov, lahko pa posredno preko interakcije z aktivatorskim proteinom 1 (AP-1), ki je transkripcijski faktor ali nuklearnim faktorjem- κ B (NF- κ B). Poleg teh učinkov, ki jih povzroča klasična interakcija med glukokortikoidnim receptorjem in DNA oz. raznimi proteinskimi kompleksi, imajo glukokortikoidi še druge učinke, od katerih so mnogi (sploh hitri) še nepojasnjeni (46).

V naših eksperimentih smo opazovali tudi vpliv desametazona na privzem histamina v astrocite, ki so bili izpostavljeni pomanjkanju kisika in hranil. Dodatek deksametazona na privzem histamina ni imel vpliva, saj ni bilo statistično značilnih razlik, če smo primerjali privzem pri kontroli s privzemom po 1-, 3- in 6-urnem pomanjkanju kisika in hranil. Prav tako nismo opazili nikakršne razlike v količini prizetega histamina v astrocite, če smo deksametazon dodali pred eksperimentalno ishemijo ali po njej.

Ker deksametazon na privzem histamina ni imel vpliva predvidevamo, da je to posledica dejstva, da v kulturi, kjer so prisotni le astrociti, izpostavitvev pomanjkanju kisika in hranil ne povzroči vnetja.

Znano je, da astrociti lahko izločajo razne živčne prenašalce, citokine, rastne dejavnike, molekule zunajceličnega matriksa ter nevrotrofične faktorje, ki uravnavajo morfologijo, rast, diferenciacijo in preživetje določenih nevronskih podskupin (predvsem v razvojnem obdobju možganov). Med poškodbo se spremenijo v reaktivne celice, ki sodelujejo pri regeneraciji živčevja oz. pri njegovem brazgotinjenju (ob večji poškodbi) (8). Ne izločajo pa provnetnih citokinov in kemokinov ali na kakšen drugačen način neposredno sodelujejo pri vnetni reakciji.

Naše eksperimente smo izvajali *in vitro*, v kulturah čistih astrocitov; *in vivo* so prisotne še druge vrste celic, npr. mikroglija. Mikroglija so celice imunskega odziva v CZS, ki

se aktivirajo ob poškodbi, okužbi ali bolezni (1). Aktivirana mikroglija je sposobna izločanja številnih provnetnih citokinov, ki inducirajo vnetje (med akutnim vnetjem živčevja pa delujejo tudi potencialno nevrotrofično), kemokinov, ki stimulirajo migracijo vnetnih celic ter proteaz, ki razgrajujejo celice in zunajcelični matriks (47).

Verjetno bi bili rezultati drugačni, če bi opazovali posledice ishemije in reperfuzije v ko-kulturi, ki bi vsebovala mikroglijo in astrocte oz. še bolj realno dogajanje *in vivo* bi ponazorila kultura, ki bi vsebovala živčne celice, astrocite in mikroglijo.

Drugi razlog, zakaj deksametazon ni povzročil spremembe v količini privzetega histamina po 1-, 3- in 6-urni hipoksiji in reperfuziji, je lahko tudi v tem, ker smo preverjali privzem pri relativno nizki (fiziološki) koncentraciji histamina 0,125 $\mu\text{mol/L}$, kar je tudi najvišja koncentracija histamina, ko smo za preučevanje lahko uporabili le radioaktivno označen histamin brez dodatka neoznačenega. Privzem neurotransmiterja postane bolj pomemben pri višjih koncentracijah, ki se v sinapsi pojavijo po sproščanju.

Obstaja pa tudi možnost, da je deksametazon v bistvu deloval. Brez dodatka deksametazona bi naj bil privzem histamina pri hipoksijah manjši kot pri kontroli. Tako pa je praktično enak, tako da bi lahko rekli, da je deksametazon pravzaprav ohranil sposobnost privzema. Vendar je ta interpretacija rezultatov manj verjetna, saj so bile vrednosti privzema praktično enake tistim, ki smo jih dobili pri preverjanju koncentracijske odvisnosti privzema histamina pri tej koncentraciji histamina (0,125 $\mu\text{mol/L}$); torej dodatek deksametazona na privzem ni vplival.

Zaključimo lahko, da pomanjkanje kisika in hranil pomembno okvari celično membrano ter funkcije membranskih transporterjev, kar spremeni lastnosti privzema histamina v astrocite. Dodatek deksametazona v kulturah, ki vsebujejo le astrocite, na privzem histamina nima vpliva.

7. SKLEPI

Pomanjkanje kisika in hranil povzroči funkcionalno poškodbo astrocitov, ki se odraža v spremenjenih lastnostih privzema histamina.

V diplomski nalogi smo potrdili drugo delovno hipotezo, prvo in tretjo pa smo ovrgli.

1. Po odtegnitvi kisika in hranil se količina celokupnega privzetega histamina v astrocite ni statistično značilno zmanjšala. V normalnih razmerah poteka privzem histamina v astrocite z olajšano difuzijo ter aktivnim transportom preko prenašalcev. Po hipoksiji se poveča delež histamina, ki se privzame z difuzijo, zmanjša pa delež, ki se privzema z aktivnim transportom; vsota celokupnega privzema ostane vseeno približno enaka.

2. Pomanjkanje kisika in hranil sta spremenila kinetiko specifičnega privzema histamina v astrocite. Vrednosti maksimalnega privzema histamina po eksperimentalni ishemiji so bile vsaj dvakrat manjše v primerjavi s kontrolno vrednostjo. Statistično značilne so bile tudi razlike v Michaelis-Mentenovi konstantni specifičnega privzema.

3. Deksametazon ni ohranil sposobnosti privzema histamina v astrocite. Sicer so privzemi po eksperimentalnih ishemijah praktično enaki tistim pri kontroli, vendar to ni posledica dodatka deksametazona.

8. LITERATURA

- 1) Kandel E, Schwartz J, Jessell T. *Principles of Neural Sciences*. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 2000: 29-31, 166-74.
- 2) Greenstein B, Greenstein A. *Color Atlas of Neuroscience: Neuroanatomy and Neurophysiology*. Stuttgart: Thieme; 2000; 76-7.
- 3) Adachi N. *Cerebral ischemia and brain histamine*. Brain Research Reviews. 2005; 50 (2): 275-86.
- 4) Cenim.se. *Živčni sistem*. <http://www.cenim.se/333-a.html>. Dostopano: 13.2.2011.
- 5) Wikipedija. *Akcijski potencial*. http://sl.wikipedia.org/wiki/Akcijski_potencial. Dostopano: 20.2.2011.
- 6) Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC, editors. *Molecular Neuropharmacology, a foundation for clinical neuroscience*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 2008.
- 7) Inštitut za biofiziko. *Praktikum iz biofizike*. <http://biofiz.mf.uni-lj.si/studij/literatura/bfpraktikum.pdf>. Dostopano: 22.2.2011.
- 8) Kržan M. *Funkcija astrocitov*. Zdr Vest 2001; 70; 553-9.
- 9) Baumann N, Pham-Dinh D. *Biology of Oligodendrocyte and Myelin in Mammalian Central Nervous System*. Physiological Reviews 2001; 81 (2): 871-927.
- 10) Perdan K, Lipnik-Štangelj M, Kržan M. *The Impact of Astrocytes in the Clearance of Neurotransmitters by Uptake and Inactivation*. Advances in planar lipid bilayers and liposomes 2009; 9: 211-35.
- 11) Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. 8th ed. New York - Oxford: Oxford University Press; 2003.
- 12) Kimelberg HK, Aschner M. *Astrocytes in Brain Aging and Neurodegeneration*. Austin (TX): R.G. Landes Company; 1998: 15-40.
- 13) Siegel G, Albers WR, Brady S, et al. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 7th ed. Burlington - San Diego - London: Elsevier Academic Press; 2005: 167-83, 249-65.
- 14) Squire L, Berg D, Bloom F, et al. *Fundamental neuroscience*. 3rd ed. Burlington - San Diego - London: Elsevier Academic Press; 2008: 134-6.

- 15) Melaney Birdsong Farr. *Synaptic Transmission and Neurotransmitters*. http://www.melaneyb.com/2420_physiology/germann_notes/5SYNAPSE_germann.pdf. Dostopano: 2.3.2011.
- 16) Univerzita Karlova v Praze, 1. Lékařská fakulta. *Neurochemistry*. <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/bpen/neurochemistry.htm>. Dostopano: 2.3.2011.
- 17) Hediger MA, Romero MF, Peng JB, et al. *The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins: Introduction*. Pflügers Arch – Eur J Physiol 2004; 447: 465-8.
- 18) Gether U, Andersen PH, Larsson OM, et al. *Neurotransmitter transporters: molecular function of important drug targets*. Trends in Pharmacological sciences 2006; 27 (7): 375-83.
- 19) Rang HP, Dale MM, Ritter JM, et al. *Rang & Dale's Pharmacology*. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2007:510-2.
- 20) Karlstedt K, Sallmén T, Eriksson KS, et al. *Lack of Histamine Synthesis and Down-Regulation of H₁ and H₂ Receptor mRNA Levels by Dexamethasone in Cerebral Endothelial Cells*. J Cereb Blood Flow Metab 1999; 19 (3): 321-30.
- 21) Brown RE, Stevens DR, Haas HL. *The physiology of brain histamine*. Progress in Neurobiology 2001; 63: 637-72.
- 22) Nguyen T, Shapiro DA, George SR, et al. *Discovery of a Novel Member of the Histamine Receptor Family*. Mol Pharmacol 2001; 59 (3): 427-33.
- 23) Barnes WG, Hough LB. *Membrane-bound histamine N-methyltransferase in mouse brain: possible role in the synaptic inactivation of neuronal histamine*. J Neurochem 2002; 82 (5): 1262-71.
- 24) Ogasawara M, Yamauchi K, Satoh Y, et al. *Recent Advances in Molecular Pharmacology of the Histamine Systems: Organic Cation Transporters as a Histamine Transporter and Histamine Metabolism*. J Pharmacol Sci 2006; 101 (1): 24-30.
- 25) Osredkar D, Burnik-Papler T, Pečavar B, et al. *Kinetic and pharmacological properties of [3H]-histamine transport into cultured type 1 astrocytes from neonatal rats*. Inflamm Res 2009; 58 (2): 94-102.
- 26) Gründemann D, Liebich G, Kiefer N, et al. *Selective Substrates for Non-Neuronal Monoamine Transporters*. Mol Pharmacol 1999; 56 (1): 1-10.

- 27) Perdan K, Kobe Z, Kržan 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.
- 28) Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. *Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view*. *Trends Neurosci* 1999; 22 (9): 391-7.
- 29) Zorec R. *Možganska kap*. V: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. Deveta izdaja. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2001: 297-304.
- 30) Lin RCS. *New concepts in cerebral ischemia*. Boca Raton - London - New York - Washington, D.C.: CRC Press LLC; 2002: 53-60.
- 31) Griffin S, Clark JB, Canevari L. *Astrocyte–neurone communication following oxygen–glucose deprivation*. *J Neurochem* 2005; 95 (4): 1015-22.
- 32) Wikipedia. *Glucocorticoid*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Glucocorticoid>. Dostopano: 12.3.2011.
- 33) Wikipedia. *Dexamethasone*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Dexamethasone>. Dostopano: 12.3.2011.
- 34) Norris JW. *Steroids May Have a Role in Stroke Therapy*. In: *Controversies in Stroke*. *Stroke* 2004; 35: 228-9.
- 35) Ogun SA, Odusote KA. *Effectiveness of high dose dexamethasone in the treatment of acute stroke*. *West Afr J Med* 2001; 20 (1): 1-6.
- 36) Betz AL, Coester HC. *Effect of steroid therapy on ischaemic brain oedema and blood to brain sodium transport*. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1990; 51: 256-8.
- 37) De Reuck J, Vandekerckhove T, Bosma G, et al. *Steroid treatment in acute ischaemic stroke. A comparative retrospective study of 556 cases*. *Eur Neurol* 1988; 28 (2): 70-2.
- 38) Tuor UI, Yager JY, Bascaramurty S, et al. *Dexamethasone prevents hypoxia/ischemia-induced reductions in cerebral glucose utilization and high-energy phosphate metabolites in immature brain*. *J Neurochem* 1997; 69 (5): 1954-63.
- 39) Graph pad prism. *The difference between linear and nonlinear regression*. http://www.graphpad.com/curvefit/linear_vs_nonlinear.htm. Dostopano: 16.4.2011.

- 40) Graph pad prism. *Comparison of enzyme kinetics with radioligand binding*.
http://www.graphpad.com/curvefit/kinetics_vs_binding.htm. Dostopano:
16.4.2011.
- 41) Rafalowska U, Waskiewicz J, Albrecht J. *Is neurotransmitter histamine predominantly inactivated in astrocytes?* Neurosci Lett 1987; 80:106-10.
- 42) Grewer C, Gameiro A, Zhang Z, et al. *Glutamate forward and reverse transport: from molecular mechanism to transporter-mediated release after ischemia*. IUBMB Life. 2008 Sep; 60 (9): 609-19.
- 43) Chen NH, Reith ME, Quick MW. *Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6*. Pflugers Arch. 2004 Feb; 447 (5): 519-31.
- 44) Duan H, Wanh J. *Selective transport of monoamine neurotransmitters by human plasma membrane monoamine transporter and organic cation transporter 3*. J Pharmacol. Exp Ther 2010 Dec; 335 (3): 743-53.
- 45) Bracken MB. *Steroids for acute spinal cord injury*. Cochrane Database Syst Rev. 2002; (3): CD001046.
- 46) Wikström AC. *Glucocorticoid action and novel mechanisms of steroid resistance: role of glucocorticoid receptor-interacting proteins for glucocorticoid responsiveness*. J Endocrinol. 2003 Sep; 178 (3): 331-7.
- 47) Wood PL. *Roles of microglia in chronic neurodegenerative diseases*. In: *Neuroinflammation: mechanisms and management*. 2nd ed. New Jersey. Humana Press Inc; 2003: 3-28.