

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**MARKO MUHIČ**

**DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

**LJUBLJANA, 2011**

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**MARKO MUHIČ**

**VPLIV ODTEGNITVE KISIKA IN HRANIL NA LASTNOSTI  
PRIVZEMA HISTAMINA V ASTROCITE PODGANE**

**THE EFFECT OF OXYGEN AND GLUCOSE  
DEPRIVATION ON CHARACTERISTICS OF HISTAMINE  
UPTAKE INTO RAT ASTROCYTES**

**LJUBLJANA, 2011**

Diplomsko delo sem opravljal na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Mojce Kržan.

Zahvaljujem se moji mentorici prof. dr. Mojci Kržan, dr. med., za vse strokovne nasvete in pomoč pri raziskovalnem delu in izdelavi diplomske naloge.

Nadalje se zahvaljujem asistentki Jožici Košir za uvajanje v eksperimentalno delo ter njeno pomoč pri izvajanju laboratorijskih poskusov. Hvala ji za vso potrpežljivost in prilagodljivost.

Hvala tudi staršem, bratu in prijateljem, ki so mi stali ob strani in polepšali čas, takrat ko sem to najbolj potreboval.

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelal samostojno pod mentorstvom prof. dr. Mojce Kržan.

Marko Muhič

# Kazalo

<b>POVZETEK</b> .....	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b> .....	<b>3</b>
<b>UVOD</b> .....	<b>5</b>
ŽIVČNI SISTEM.....	5
SINTEZA IN SKLADIŠČENJE NEVROTRANSMITORJEV .....	6
SPROŠČANJE NEVROTRANSMITORJEV .....	7
DELOVANJE NEVROTRANSMITORJEV .....	7
INAKTIVACIJA NEVROTRANSMITORJEV .....	8
TRANSPORTERJI.....	9
HISTAMIN .....	12
BIOSINTEZA HISTAMINA .....	13
HISTAMIN V CŽS.....	13
HISTAMIN KOT NEVROTRANSMITOR V CŽS .....	14
UČINKOVANJE HISTAMINA.....	15
INAKTIVACIJA HISTAMINA .....	15
ASTROCITI.....	18
MOŽGANSKA KAP .....	20
<i>Ishemična poškodba/reperfuzija</i> .....	20
<b>NAMEN DELA</b> .....	<b>22</b>
<b>MATERIALI</b> .....	<b>22</b>
<b>METODE</b> .....	<b>23</b>
PRIPRAVA CELIČNIH KULTUR.....	23
ISHEMIJA IN REPERFUZIJA V RAZMERAH IN VITRO .....	23
UČINEK $\text{Na}^+$ IN AKTIVNOSTI $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPAZE NA PRIVZEM HISTAMINA .....	24
OD KONCENTRACIJE HISTAMINA ODVIŠEN PRIVZEM IN SPROŠČANJE HISTAMINA .....	24
DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV PO BRADFORDOVI METODI .....	25
ANALIZA PODATKOV .....	25
<b>REZULTATI</b> .....	<b>25</b>
UČINEK $\text{Na}^+$ IN AKTIVNOSTI $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPAZE NA PRIVZEM HISTAMINA .....	25
OD KONCENTRACIJE HISTAMINA ODVIŠEN PRIVZEM IN SPROŠČANJE HISTAMINA .....	29
<b>RAZPRAVA</b> .....	<b>33</b>
<b>SKLEP</b> .....	<b>39</b>
<b>LITERATURA</b> .....	<b>40</b>

## Povzetek

Astrociti izražajo na svoji membrani številne transporterje, preko katerih privzemajo v zunajcelični prostor sproščene nevrottransmitorje. Kljub temu, da na astrocitih specifičnega transporterja za histamin še ne poznamo, vemo, da astrociti privzemajo histamin z aktivnim transportom in olajšano difuzijo. V diplomskem delu smo želeli ugotoviti, kako se spremenijo lastnosti privzema histamina, če astrocitne kulture prehodno za 1, 3 in 6 ur izpostavimo pomanjkanju kisika in hranil, kar se lahko zgodi pri ishemični poškodbi možganskega tkiva. Preučevali smo vpliv prisotnosti zunajceličnih  $\text{Na}^+$  ionov in aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze na privzem histamina v astrocite. Predvidevali smo tudi, se bo količina privzetega in sproščenega histamina iz astrocitov zmanjševala sorazmerno s trajanjem izpostavitvi pomanjkanju kisika in hranil, kar pa se je izkazalo za napačno. Poskuse smo izvedli v primarnih kulturah astrocitov. Ko so kulture astrocitov druge pasaže postale konfluentne, smo jim hranilni medij zamenjali z medijem brez glukoze in dodanega seruma in jih izpostavili hipoksičnim razmeram: 0,2%  $\text{O}_2$  in 5%  $\text{CO}_2$ , in sicer za 1, 3 oz. 6 ur. Potem smo zamenjali medij z gojilnim in celice za 21 ur prestavili v inkubator s 95% zrakom in 5%  $\text{CO}_2$ . Značilnosti in spremembe privzema histamina v astrocite smo ugotavljali s pomočjo radioaktivno označenega  $^3\text{H}$ -histamina. Pomanjkanje kisika in hranil povzroči funkcionalno poškodbo astrocitov, kar vpliva na lastnosti transporta histamina. S podaljševanjem časa pomanjkanja kisika in hranil se zmanjšuje delež aktivnega transporta, poveča pa se pasivni transport histamina v astrocite. Prisotnost zunajceličnih  $\text{Na}^+$  ionov in aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze vplivata na privzem histamina v astrocite. Koncentracija  $\text{Na}^+$  ionov vpliva na privzem histamina v astrocite v normalnih razmerah. Ta vpliv se ohrani tudi po 1, 3 in 6 urah izpostavljenosti celic pomanjkanju kisika in hranil.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza pomembno sodeluje pri vzdrževanju ionskega gradienta v fizioloških razmerah. Po 3 in 6 urah pomanjkanja kisika in hranil pa zaradi ishemične poškodbe ne vpliva več na privzem histamina. Količina privzetega in sproščenega histamina iz astrocitov je odvisna od začetne koncentracije histamina v kateri inkubiramo celice in se poveča ob ishemiji. Vzrok za to so poškodbe celične membrane, ki se povečujejo s trajanjem izpostavitve stresnim pogojem. Zaključimo lahko, da odtegnitvi kisika in hranil vplivata predvsem na način transporta histamina v astrocite v njihovih primarnih kulturah.

## Abstract

Astrocytes express numerous membrane transporters, which are involved in the uptake of previously released neurotransmitters. Although a specific histamine transporter has not been elucidated yet, astrocytes have been shown to take up histamine by at least two different mechanisms: facilitated electrodiffusion and active transport. In the present work we studied the influence of glucose and oxygen deprivation (OGD) on characteristics of histamine uptake into cultured rat astrocytes. The purpose of OGD was to simulate ischemic stroke. We studied whether the effect of extracellular  $\text{Na}^+$  and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity on histamine uptake in astrocytes persist or is changed after 1, 3 and 6 hours of OGD followed by reperfusion. We also predicted that the amount of taken up and released histamine from astrocytes would decrease proportionally to the length of OGD. The experiments were performed on primary cultures of astrocytes prepared from neonatal rats. Confluent astrocyte cultures in the second passage were incubated in glucose and serum deprived medium under hypoxic conditions, 0,2%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$  for 1, 3 or 6 hours. Thereafter the medium was replaced with a normal one and cultures were incubated in 95% air and 5%  $\text{CO}_2$  for additional 21 hours (reperfusion). Histamine uptake was initiated by exposing astrocytes to tritium marked histamine. Functional damage of astrocytes was caused by glucose and oxygen deprivation, which affected characteristics of histamine uptake. The consequence of longer OGD was, that more histamine was taken up into astrocytes by passive electrodiffusion and less by active transport. The presence of extracellular  $\text{Na}^+$  and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity influenced histamine uptake in astrocytes. Sodium ions affected histamine uptake in control conditions. The effect persisted after 1, 3 and 6 hours of OGD.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase is significantly involved in maintenance of ionic gradient in physiological conditions. After 3 and 6 hours of OGD the activity of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase had no effect on histamine uptake. The amount of taken up and released histamine from astrocytes depends on concentration of histamine and is increased after ischemia. OGD causes cell membrane damage. We can conclude, that OGD affects primarily the mechanism of histamine transport into primary astrocyte cultures.

## Okrajšave in simboli

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

BCRP - protein dovzetnosti za raka dojke - breast cancer resistance protein

CŽS - centralni živčni sistem

DAO - diamino-oksidaža

DAT - dopaminski transporter

DMEM - po Dulbeccu modificiran Eaglov medij

EAAT - transporter za ekscitatorne aminokisliline - excitatory amino acid transporter

GABA -  $\gamma$ -aminomaslena kislina

GAT - GABA transporter

GFAP – glialna kislina fibrilarna beljakovina - glial acidic fibrillary protein

GLYT - glicinski transporter

HNMT - histamin-N-metiltransferaza

MAO - monoamin-oksidaža

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

MDR - protein, ki zmanjša delovanje zdravil - multidrug resistance protein

MRP – protein, podoben proteinu, ki zmanjša delovanje zdravil - multidrug resistance related protein

NET - noradrenalinski transporter

OATP - organski anionski transportni polipeptid – organic anion transporting polypeptide

OCT - transporter za organske katione – organic cation transporter

OCTN - transporter za organske katione in karnitin - novel organic cation transporter

PEPT2 - peptidni transporter 2 – peptide transporter 2

PMAT - membranski transporter za monoamine - plasma membrane monoamine transporter

POT - od protonov odvisni transporter za oligopeptide - proton dependent oligopeptide transporter

SERT - serotonininski transporter

SLC - transporter za topljence

VGAT - vezikularni transporter za inhibitorne aminokisliline – vesicular GABA transporter

VGLUT - vezikularni transporter za glutamat – vesicular glutamate transporter

VMAT - vezikularni monoaminski transporter – vesicular monoamine transporter

# Uvod

## Živčni sistem

Živčni sistem sestavljata dve vrsti celic: nevroni in celice glije. Celice glije delimo na makroglijo in mikroglijo. Makroglijo sestavljajo astrociti in oligodendrociti (1).

Astrociti so morfološko celice zvezdaste oblike in vsebujejo veliko citoplazmatskih fibril, katerih glavna sestavina je protein GFAP (glial acidic fibrillary protein) (2). Nahajajo se predvsem v področju aksonov in dendritov ter obdajajo krvne žile. Oligodendrociti so satelitne celice v osrednjem živčevju, nahajajo se v bližini teles nevronov in okoli njih tvorijo izolacijski mielinski ovoj. Imajo podobno vlogo kot Schwannove celice zunaj osrednjega živčevja. Mikroglija je mezodermalnega izvora in je sorodna makrofagom in monocitom. Nahaja se večinoma okoli krvnih žil in se aktivira ob patoloških procesih (3).

Med nevroni poteka prenos informacij večinoma s pomočjo nevrotansmitorjev (Preglednica I). Ta kemični način prenosa lahko opišemo v naslednjih korakih. Najprej se morajo molekule nevrotansmitorja sintetizirati in shraniti, po aktivaciji nevrona pa se iz le-tega sprostijo in preko receptorjev sprožijo ustrezne odzive na sosednjih nevronih ali drugih tarčnih celicah. Sledi še odstranitev nevrotansmitorja iz sinaptične špranje.

**Preglednica I.** Shematska razdelitev nevrotansmitorjev (3,4).

vrsta nevrotansmitorja		
nizkomolekularni		acetilholin
	aminokisljine	glutamat, glicin, GABA, aspartat
	derivati aminokisljin, monoamini	dopamin, noradrenalin, adrenalin, serotonin, histamin
	plini	NO, CO
visokomolekularni		substancia P, substancia Y, endorfini, enkefalini, endokanabinoidi itd.

Nevrotansmitor je snov, ki zadošča naslednjim kriterijem:

1. samo predstopnje sinteze nevrotansmitorja lahko prehajajo krvno-možgansko pregrado, sam nevrotansmitor pa ne;
2. sintetizira se v nevronu in shranjuje v sinaptičnih veziklih;



3. po aktivaciji presinaptičnega nevrona se z eksocitozo sprosti v sinaptično špranjo;
4. količina sproščene prenašalca je zadostna, da sproži odgovor na postsinaptičnem nevronu ali drugih tarčnih celicah;
5. če tarčno celico izpostavimo prenašalcu ali njegovemu agonistu v dovolj velikih količinah, izzovemo enak odgovor, kakor bi ga endogeno sproščena snov;
6. za to snov mora obstajati specifičen mehanizem odstranjevanja iz sinaptične špranje (1).

Skupine nevronov, ki izločajo acetilholin in biogene amine, se lahko imenujejo po neurotransmitorju, ki ga izločajo ali po mestu nahajanja v osrednjem živčevju. Vsak sistem omenjenih nevronov ima jedra, iz katerih izhajajo aksoni v točno določene predele možganov. Tako ločimo npr. serotoninški, dopaminski, holinergični, adrenergični in histaminski sistem.

### **Sinteza in skladičenje neurotransmitorjev**

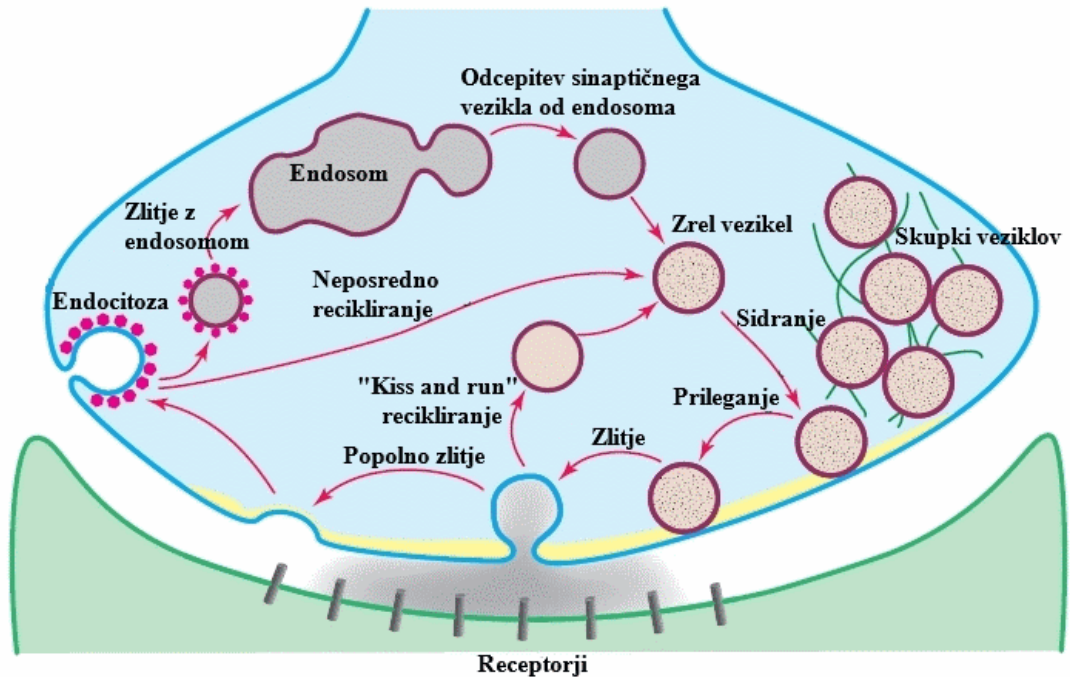
Sinteza neurotransmitorjev poteka v telesu živčne celice iz predstopenj, ki so v primeru monoaminskih prenašalcev aminokislina, v primeru glutamata, glicina in GABA pa vmesni produkti razgradnje glukoze.

Nevrotransmitorji z majhno molekularno maso, npr. biogeni amini, nastajajo v citoplazmi nevronov. Po sintezi se shranijo v sekretorne vezikle, da se ne bi razgradili v citoplazmi. V skupini degradacijskih encimov sta pomembna MAO-A in MAO-B. Vezikularni transport vseh monoaminov poteka s pomočjo vezikularnega monoaminskega transporterja 2 (VMAT2) (5). Sinteza neuropeptidov poteka zelo podobno kot sinteza ostalih proteinov. Najprej steče transkripcija DNA v mRNA, ki potuje do ribosoma, kjer poteče translacija. Molekula se nato procesira v endoplazmatskem retikulumu in v golgijevem aparatu shrani v vezikle (6). Signalne molekule lipidnega izvora, npr. endokanabinoidi in plini, se ne shranjujejo v veziklah (5).

## Sproščanje neurotransmitorjev

Akcijski potencial je hitro napredujoča depolarizacija vzdolž membrane aksona, ki povzroči sproščanje neurotransmitorjev iz živčnega končiča (sinaptično sproščanje) oz. iz varikozitet (zadebelitev) vzdolž nevrona (ekstrasinaptično sproščanje) (3,4).

Sinaptično sproščanje neurotransmitorjev poteka s procesom eksocitoze (Slika 1).



Slika 1. Življenjski cikel sinaptičnega vezikla.

## Delovanje neurotransmitorjev

Za delovanje mora biti neurotransmitor razpoložljiv v razmeroma velikih količinah, kar se doseže s shranjevanjem v vezikle.

Po sprostitvi v sinaptično špranjo neurotransmitor z difuzijo doseže postsinaptično membrano. Tam se lahko veže na več podtipov receptorjev in povzroči učinek na tarčnih celicah.

## Inaktivacija neurotransmitorjev

Nevrotransmitor se mora po vezavi na postsinaptični nevron čim prej inaktivirati, da se prepreči nenehna stimulacija le-tega ter prekomerno proženje akcijskega potenciala, ki lahko vodi v vzdražno poškodbo nevronov (5). Na ta način je omogočeno pošiljanje novih informacij, prepreči pa se tudi desenzitizacija receptorjev.

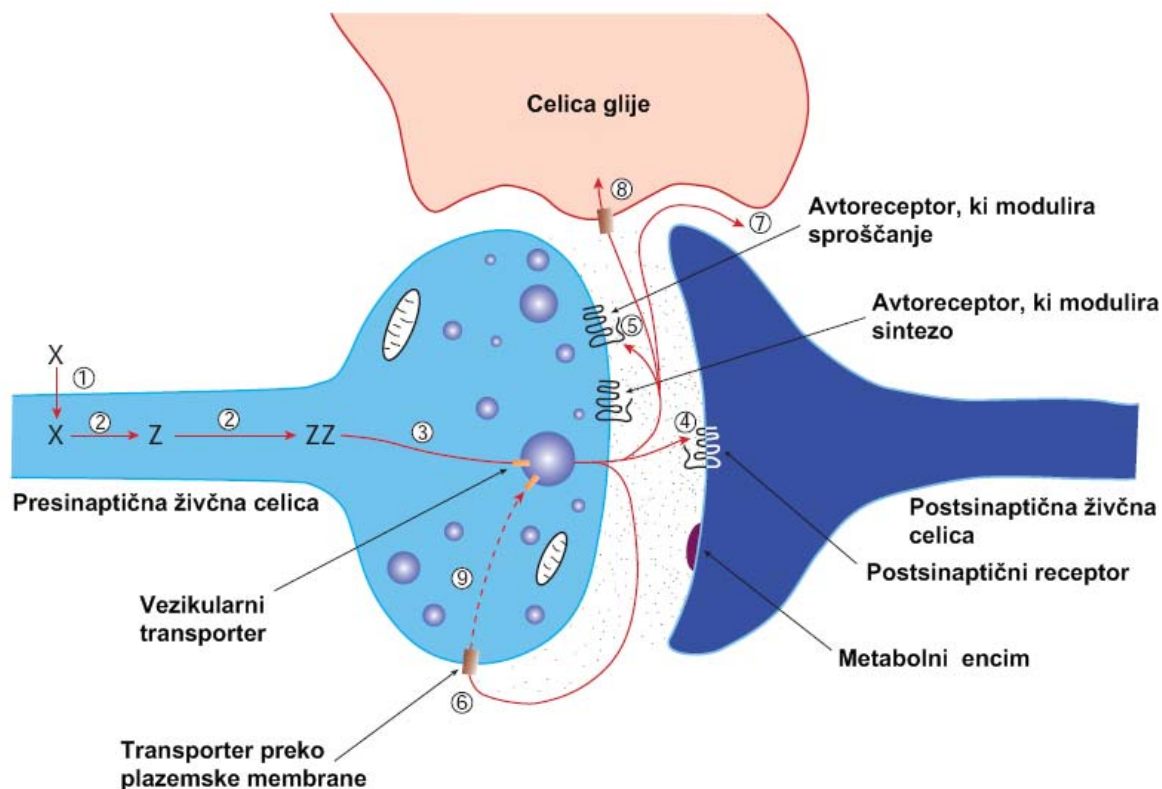
Inaktivacija neurotransmitorjev poteka preko štirih mehanizmov (Slika 2).

**Difuzija** - neurotransmitor oddifundira v obdajajoči medij, njegova koncentracija v sinaptični reži pade pod t.i. mejno koncentracijo, ki je sicer potrebna za stimulacijo prisotnih receptorjev.

**Encimska razgradnja** - specifičen encim spremeni strukturo neurotransmitorja tako, da ga postsinaptični receptor ne prepozna več.

**Ponovni privzem** - verjetno najbolj pogosta vrsta inaktivacije neurotransmitorja pri kateri se celotna molekula neurotransmitorja privzame nazaj s pomočjo specifičnih transportnih proteinov na presinaptičnem nevronu. Privzeti neurotransmitor se lahko ponovno shrani v sekretorni vezikel ali pa ga encimi v presinaptičnem nevronu razgradijo. Na ta način se zmanjša potreba po njegovi *de novo* sintezi.

**Celice glije** – s specifičnimi prenašalnimi proteini, izraženimi na svojih membranah, prenesejo neurotransmitor čez njo. Za primer glutamata vemo, da ga astrociti privzamejo s pomočjo petih različnih transportnih sistemov in ga razgradijo v neaktivni glutamin, ki se nato prenese v nevrone (1,5).



**Slika 2.** Shematski prikaz življenjskega cikla nevrottransmitorja.

Po akumulaciji aminokislinskih predhodnikov (1), se le-ti metabolizirajo do zrelega nevrottransmitorja (2). Nevrottransmitor se nato s pomočjo vezikularnih transporterjev skladišči v veziklih (3). Po sprostitvi se nevrottransmitor lahko veže na postsinaptične (4) ali presinaptične receptorje (5). Inaktivacija nevrottransmiterja poteka preko ponovnega privzema (6), nevrottransmiter lahko oddifundira z aktivnega mesta (7) ali pa ga privzamejo celice glije (8).

## Transporterji

Transporterji so integralni membranski proteini, ki prenašajo različne, lahko tudi nabite, molekule (hranila, zdravila, toksine, nevrottransmitorje) preko celične membrane. Po vezavi substrata se transporter konformacijsko spremeni in sprosti preneseno molekulo na drugi strani membrane. Transporterji so lahko oligospecifični (prenašajo strukturno podobne molekule) ali polispecifični (prenašajo snovi, ki so različnih velikosti in različnih struktur) (7). Udeleženi so tako pri olajšani difuziji, to je prenosu, ki poteka vzdolž koncentracijskega gradienta, kot pri aktivnem transportu, ki načeloma poteka proti koncentracijskemu gradientu (Preglednica II).

**Preglednica II.** Okvirne koncentracije ionov znotraj in zunaj celice, ki so bistvene za razumevanje delovanja transporterjev.

	koncentracija ionov (mmol/L)	
	znotraj celice	zunaj celice
Na <sup>+</sup>	12	145
K <sup>+</sup>	155	4
Cl <sup>-</sup>	4	120
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	8	27
proteini	155	bistveno manj

Transporterje lahko razdelimo glede na njihovo potrebo po energiji. Poznamo transporterje ABC, ki so odvisni od ATP, in transporterje SLC, ki za svoje delovanje potrebujejo elektrokemijski potencial in nimajo ATP vezavnih mest. Pomembnejši transporterji ABC so MDR (multidrug resistance protein), npr. glikoprotein P, MRP (multidrug resistance related protein) in BCRP (breast cancer resistance protein).

Obstajata dve glavni skupini transporterjev SLC za nevrotansmitorje na plazemski membrani nevronov in celic glije, in sicer SLC1 in SLC6.

Največjo skupino transporterjev predstavljajo predstavniki družine SLC6. Sestavljeni so iz 12 hidrofobnih transmembranskih domen. Mednje sodijo dopaminski transporter (DAT), serotoninški transporter (SERT), noradrenalinski transporter (NET), glicinski transporter (GLYT) in GABA transporter (GAT). Vsi omenjeni transporterji so prisotni tudi na membrani astrocitov (2). Odvisni so od ko-transporta Na<sup>+</sup> in pri večini tudi od Cl<sup>-</sup>, serotoninški transporter pa še od antiporta K<sup>+</sup> (8).

Druga pomembna družina je SLC1 v kateri se nahajajo transporterji odvisni od ko-transporta Na<sup>+</sup> in H<sup>+</sup>, nekateri od njih pa tudi od antiporta K<sup>+</sup>. V tej skupini se nahajajo transporterji za glutamat, EAAT 1-5 (excitatory amino acid transporter) (8).

Podobno strukturo kot transporterji iz družine SLC6 imajo tudi transporterji družine SLC22, med katere uvrščamo transporterje za organske katione (OCT), transporterje za organske katione in karnitin (OCTN) in organske anionske transporterje (OAT). Prenos substratov prek transporterjev za organske katione ni odvisen od Na<sup>+</sup> in Cl<sup>-</sup>, je nizko selektiven in visoko kapacitiven (2). Za OCT je značilno, da dodatek substrata v zunajcelični medij povzroči spremembo elektrokemijskega potenciala, kar spodbudi tok snovi v celico (9). Študije so pokazale, da so v možganih sesalcev prisotni vsi trije prenašalci iz skupine OCT (OCT1, OCT2, OCT3), vendar je prenašalca OCT3 veliko več kot OCT1 in OCT2 (10). OCT3 najdemo predvsem v hipokampusu, cerebelumu in cerebralnem korteksu (2). Prenašalec OCT3 se nahaja le v živčnih celicah, v astrocitih pa

je izražen le pri odraslih podganah (11). Na prenos prek OCTN vplivajo kationi in gradient protonov (9).

Poleg transporterja OCT3 igra pomembno vlogo pri privzemu monoaminov v CŽS tudi transporter PMAT (plasma membrane monoamin transporter). Transport preko PMAT ni odvisen od  $\text{Na}^+$  in  $\text{Cl}^-$ , je nizko selektiven in visoko kapacitiven (12).

Poznamo še antiporterje za več zdravil in toksinov (MATE, multidrug and toxin antiporters). Proteini MATE pa svoje delovanje potrebujejo protonski gradient (7). V družini SLC21 so pomembni organski anionski transportni polipeptidi (OATP), ki prenašajo amfifilne substrate. Značilni predstavniki družine SLC15 so peptidni transporterji (POT, proton dependent oligopeptide transporter). Domnevajo, da naj bi v CŽS PEPT2 (peptid transporter 2) prispeval k metabolizmu glutationa (9).

Poleg omenjenih skupin pa obstajajo še vezikularni transporterji, ki služijo za uskladičenje nevrotansmitorjev v sinaptične ali nevroendokrine sekretorne vezikle, tako da jih prenesejo iz citoplazme v lumen sekretornega vezikla. Poznamo naslednje skupine vezikularnih transporterjev: vezikularni monoaminski transporter (VMAT, SLC18), vezikularni transporter za glutamat (VGLUT, SLC17) in vezikularni transporter za inhibitorne aminokislino (VGAT, SLC32) (Preglednica III ) (2).

### Preglednica III. Pregled pomembnejših transporterjev.

Družina transporterjev	Pomembnejši transporterji	Značilnosti transporta
ABC	MDR, MRP, BCRP	odvisen od ATP
SLC6	DAT, SERT, NET, GYLT, GAT	ko-transport z Na <sup>+</sup> , pri večini tudi Cl <sup>-</sup> , pri SERT še antiport K <sup>+</sup>
SLC1	EAAT	ko-transport Na <sup>+</sup> in H <sup>+</sup> , pri nekaterih podtipih tudi antiport K <sup>+</sup>
SLC22	OCT	neodvisen od Na <sup>+</sup> in Cl <sup>-</sup> , nizko selektiven in visoko kapacitiven
	OCTN	podtipi odvisni od Na <sup>+</sup> , neodvisni od Na <sup>+</sup> , nekateri odvisni od ATP
	OAT	neodvisen od Na <sup>+</sup> in Cl <sup>-</sup> , nizko selektiven in visoko kapacitiven
ni uvrščen v nobeno družino	PMAT	neodvisen od Na <sup>+</sup> in Cl <sup>-</sup> , nizko selektiven in visoko kapacitiven
MATE	več podtipov	potreben H <sup>+</sup> gradient
SLC21	OATP	prenos amfifilnih substratov
SLC15	POT	PEPT2 udeležen pri metabolizmu glutationa
SLC18	VMAT	vezikularni transporterji
SLC17	VGLUT	
SLC32	VGAT	

Preko istega transporterja se v celico lahko privzema veliko različnih snovi, ki imajo skupne značilnosti (oblika, naboj). Med molekulami lahko pride zaradi tega do številnih interakcij, ki nato spodbudijo ali zavrejo privzemanje drugih molekul.

## Histamin

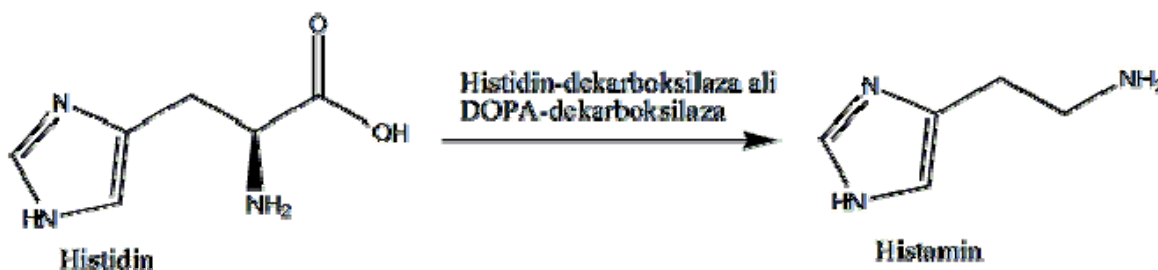
Histamin je aaminski nevrottransmitor, ki je prisoten v praktično vseh človeških tkivih. Spada med imidazole z značilnim heterocikličnim obročem z dvema dušikovima atomoma (5).

V najvišjih koncentracijah se nahaja v koži, bronhialni sluznici in sluznici črevesja. Zunaj osrednjega živčevja histamin deluje kot lokalni hormon, v osrednjem živčevju pa predvsem kot nevrottransmitor.

Histamin se izven osrednjega živčevja sintetizira in skladišči v citoplazemskih granulah mastocitov, bazofilcev in enterokromafinih celic. Opravlja pomembne vloge: pri vnetjih in alergičnih reakcijah, nadzira sekrecijo želodčne kisline, frekvenco in moč delovanja srca, krčenje bronhijev, v CZS pa deluje kot nevrotansmitor (3,5).

## Biosinteza histamina

Histamin v osrednjem živčevju nastaja z dekarboksilacijo aminokisline histidin, ki prehaja krvno-možgansko pregrado s pomočjo aktivnega transporta. V človeškem telesu lahko dekarboksilacijo histidina izvedeta dva encima: dihidroksifenilalanin-dekarboksilaza (DOPA-dekarboksilaza) in specifična histidin-dekarboksilaza, ki je odgovorna za sintezo histamina v možganih (Slika 3) (3).

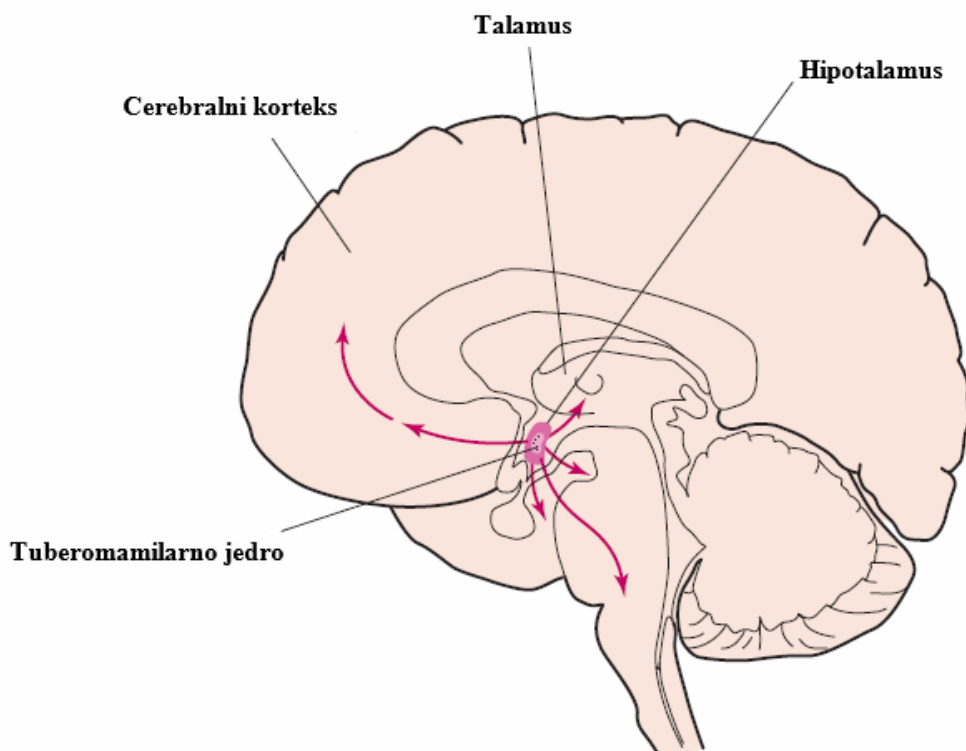


Slika 3. Shematski prikaz sinteze histamina.

## Histamin v CZS

V CZS nastane histamin v specifičnih nevronih. Z imunohistokemičnimi študijami so pokazali, da glavne histaminske poti izvirajo iz nevronov v posteriornem hipotalamusu in retikularni formaciji, ki nato ascendirajo skozi medialni del možganov in projicirajo ipsilateralno v telencefalon. Večina histamina pri človeku je v magnocelularnih nevronih v področju tuberomamilarnega jedra v posteriornem hipotalamusu (Slika 4). Histaminergični sistem sestoji iz dolgih, divergentnih, večinoma nemieliniziranih vlaken, ki difuzno projicirajo v številne telencefalne, mezencefalne in cerebelarne strukture, zato mu pripisujejo pomembne vloge pri raznih procesih in funkcijah v organizmu (regulacija ciklusa budnost/spanje, sekrecija hormonov, regulacija telesne temperature, hranjenje, tvorba spomina...) (3,5).





**Slika 4.** Histaminergične poti v osrednjem živčevju človeka.

## **Histamin kot neurotransmiter v CŽS**

Histamin je neurotransmiter, ki se iz tuberomamilarnega jedra sprošča v številna možganska področja. Najbolj raziskan centralni učinek histamina je njegov vpliv na regulacijo ritma budnost/spanje (5). V arei postremi vpliva na občutek za slabost in bruhanje.

Histamin, ki nastaja z dekarboksilacijo aminokislina histidin, se, tako kot ostali biogeni amini (serotonin, dopamin, noradrenalin, adrenalin), shranjuje s pomočjo vezikularnega monoaminskega prenašalca VMAT2 v sekretornih veziklih presinaptičnih nevronov, od koder se po aktivaciji nevrona sprošča v sinaptično špranjo (13). Veže se na receptorje sklopljene s transmembranskimi proteini G, ki imajo 7 značilnih transmembranskih področij ter znotrajcelično karboksilno in zunajcelično aaminsko končno verigo. Preko teh receptorjev nato povzroča svoje učinke (3,5).

## Učinkovanje histamina

Obstajajo vsaj štiri vrste histaminskih receptorjev, ki so oštevilčene glede na vrstni red odkritja, in jih opisuje Preglednica IV.

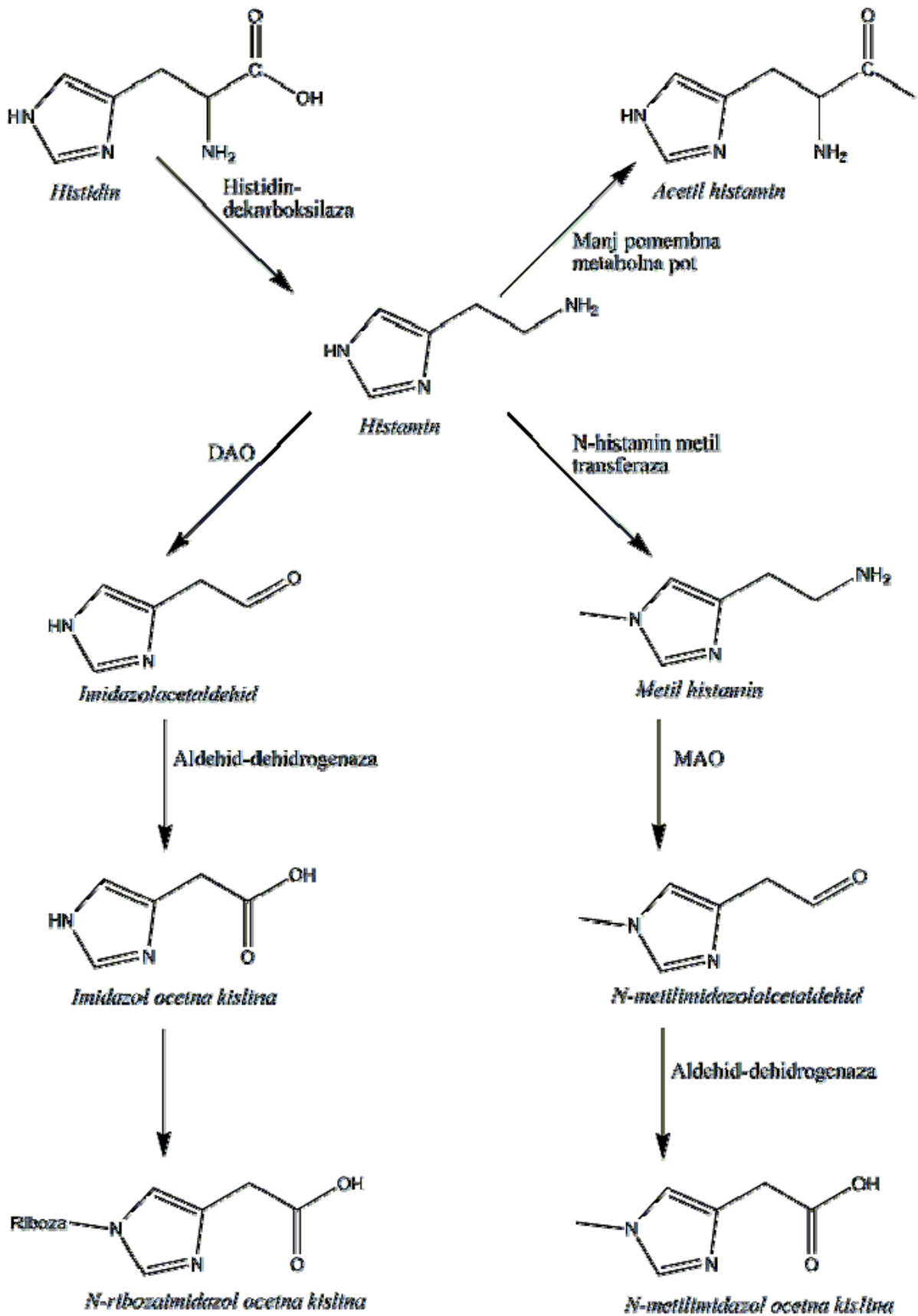
**Preglednica IV.** Vrste, lokacija in funkcija histaminskih receptorjev (3,5).

Tip receptorja	Lokacija	Funkcija
H <sub>1</sub>	zunaj osrednjega živčevja v gladkem mišičju črevesja, bronhijev in krvnih žil; tudi v ČŽS	glavna tarča delovanja zdravil, ki se uporabljajo za modulacijo alergij in imunskega odziva (antagonisti histaminskih receptorjev H <sub>1</sub> ); v ČŽS so odgovorni za regulacijo ritma budnost/spanje in uravnavanje kognitivnih funkcij
H <sub>2</sub>	zunaj osrednjega živčevja v parietalnih celicah želodca, srcu, stenah žil; v ČŽS na nevronih in astrocitih	zunaj osrednjega živčevja modulacija sekrecije želodčne kisline, dela srca in premera krvnih žil; v ČŽS vloga še ni pojasnjena
H <sub>3</sub>	predvsem v ČŽS, striatum, nukleus akumbens, cerebralni korteks; manj zunaj osrednjega živčevja	avtorceptorji, presinaptični receptorji, katerih aktivacija se odraža z zmanjšano sintezo in sproščanjem histamina iz živčnih celic; veliko se jih nahaja tudi v področju možganov, kjer je veliko ne-histaminskih nevronov, tu naj bi učinkovanje histamina preko H <sub>3</sub> receptorjev vplivalo na aktivnost serotoninskih in dopaminskih nevronov; študije na živalih so pokazale, da blokada teh receptorjev in s tem ojačenje učinkov histamina, vodi v pomembno izboljšanje spomina in učenja (14)
H <sub>4</sub>	ČŽS, celice in tkiva imunskega sistema	strukturno podobni H <sub>3</sub> receptorjem, potencialna nova terapevtska tarča (15,16)

## Inaktivacija histamina

Histamin se po sprostitvi v sinaptično špranjo inaktivira z N-metilacijo, saj oksidativna deaminacija v ČŽS ni prisotna, ker se encim DAO nahaja le na periferiji in ne more preiti hematoencefalne bariere. N-metilacija poteka s pomočjo encima histamin-N-metiltransferaze (HNMT). Histamin se metilira v tele-metilhistamin, ta pa se v možganih lahko metabolizira še z monoamin-oksido B (MAO B) in aldehyd-dehidrogenazo, ki sta intracelularna encima (Slika 5) (3,17). Tudi HNMT se nahaja v citosolu, zato se mora sproščeni histamin, preden se encimsko razgradi, privzeti v nevrone ali astrocite. Domnevajo, da je razgradnja s HNMT ključna metabolne pot.

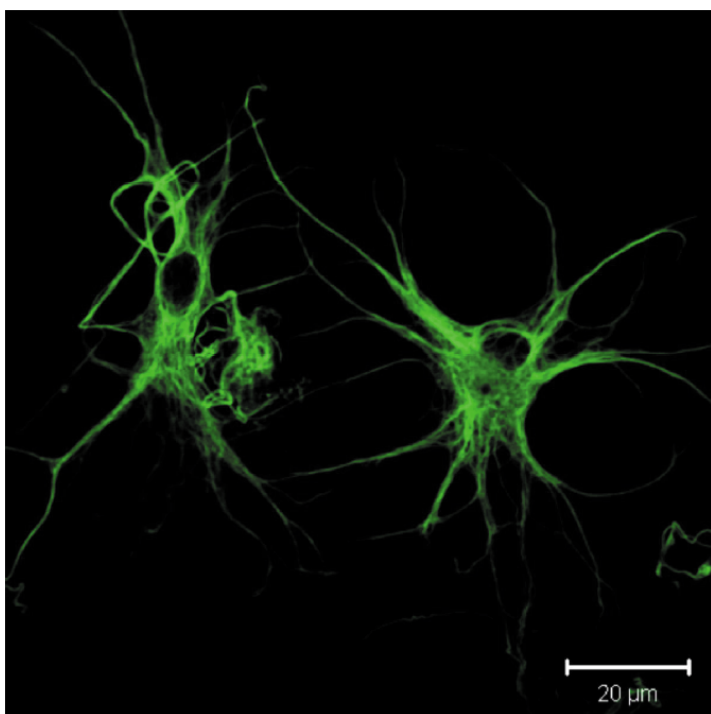
Za inaktivacijo histamina z N-metiltransferazo so razvili dve hipotezi. Membranska hipoteza pravi, da se HNMT lahko premakne na plazemsko membrano in tako deluje na celični površini. Membranski HNMT pretvori histamin v neaktivno obliko telemetilhistamin že v sinaptični špranji. Hipoteza transporterjev pa predvideva, da se histamin privzema s pomočjo OCT2 in OCT3 ter razgrajuje intracelularno. Glede na izsledke dosedanjih študij je hipoteza transporterjev bolj verjetna (18).



Slika 5. Metabolizem histamina, ki poteka v organizmu preko dveh metabolnih poti.

## Astrociti

Astrociti so morfološko celice zvezdaste oblike in vsebujejo veliko citoplazmatskih fibril, katerih glavna sestavina je GFAP (Slika 6). Astrociti so ektodermalnega izvora, njihova vloga pa ni le podpora nevronov, temveč tudi aktivno sodelujejo pri dogajanju v CŽS ter uravnavajo koncentracije nevrotansmitorjev, citokinov, rastnih dejavnikov in molekul zunajceličnega matriksa (19). Omenjene celice predstavljajo eno večjih shramb glikogena v centralnem živčnem sistemu (2). Pomembno vlogo imajo pri izgradnji in vzdrževanju hematoencefalne bariere. Medsebojno so povezani preko presledkovnih stikov. Le-ti omogočajo komunikacijo, predvsem preko sprememb koncentracij kalcijevih ionov, ter izmenjavo ionov in manjših molekul (2,4). V večini možganskih področij predstavljajo 25-50% celičnega volumna. Sivo substanco gnezdijo predvsem protoplazmatski, belo substanco pa fibrilarni astrociti (5).



**Slika 6.** Astrociti vzgojena iz korteksa neonatalnih podgan v primarni kulturi in označena s protitelesi proti GFAP, ki je zanje značilen protein. Slika je bila posneta v Referenčnem centru za konfokalno mikroskopijo Carl-Zeiss Laboratorija za nevroendokrinologijo in celično fiziologijo, PAFI.

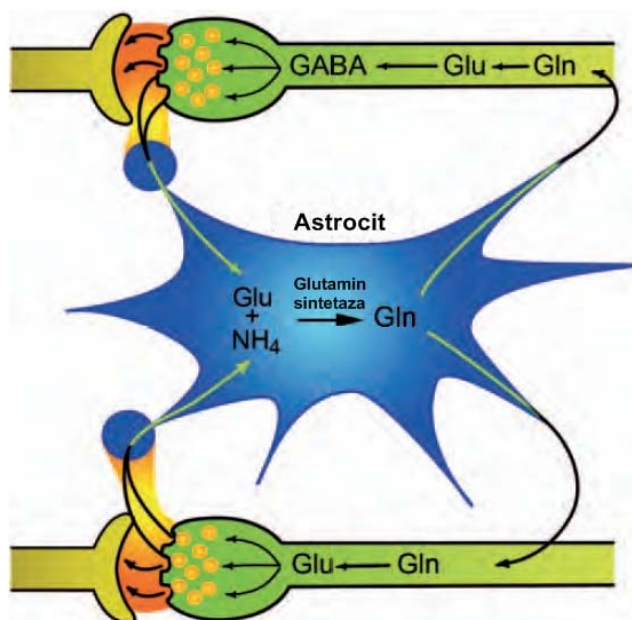
Oblika in funkcija astrocitov se posebej razlikuje med razvojem, v odraslem obdobju in po poškodbi osrednjega živčevja.

Med razvojem so embrionalni radialni astrociti poglavitni vir molekul zunajceličnega matriksa in adhezijskih molekul, ki omogočajo usmerjeno rast, organizacijo in povezovanje nevronov. Poleg tega sproščajo tudi nevrotrofične dejavnike, ki omogočajo preživetje, rast in diferenciacijo nevronov. Po končanem razvojnem obdobju pa se proizvodnja nevrotrofičnih dejavnikov bistveno zmanjša.

V odraslem obdobju, ko se izrastki astrocitov skrčijo in se celice preoblikujejo v protoplazmatske in fibrilarne astrocite, je njihova vloga predvsem vzdrževanje stalnega zunajceličnega okolja, ki je nujno potrebno za nemoteno delovanje nevronov. Astrociti sodelujejo pri sinaptičnem prenosu, saj privzamejo prebitek  $K^+$  ionov, ki se sprostijo ob prenosu dražljaja. Pomembno vlogo pa imajo tudi pri inaktivaciji neurotransmitorjev, ki se sprostijo v sinaptično špranjo. Na membrani astrocitov najdemo transportne proteine za številne neurotransmitorje, npr. glutamat, aspartat, GABA, glicin, biogene amine (Slika 7). Astrociti privzemajo tudi histamin in vsebujejo encime za njegovo razgradnjo.

Pri patoloških procesih se spremenijo v reaktivne celice, ki aktivno posredujejo v procesu regeneracije osrednjega živčevja.

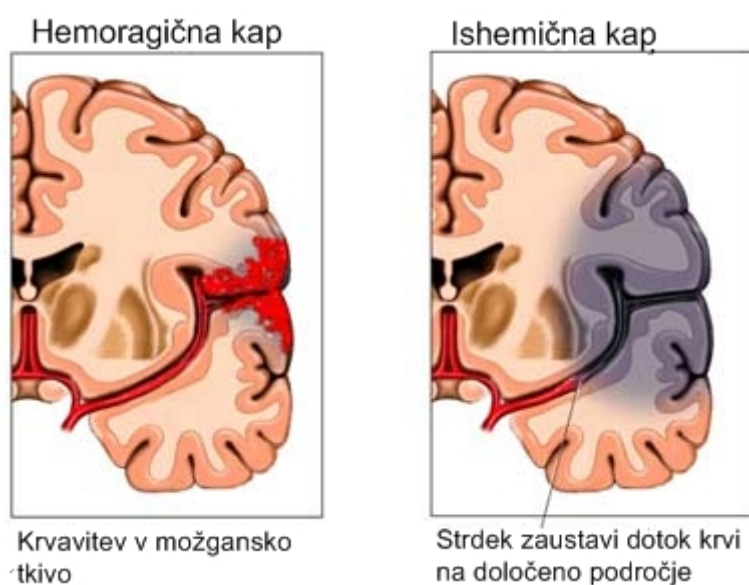
Astrociti so torej enakopraven član tridelne sinapse, uravnavajo tvorbo in vzdrževanje sinaps (19).



**Slika 7.** Primer cikla glutamat-glutamin (Glu-Gln), ki prikazuje sklopljenost metabolizma neurotransmitorjev med nevroni in astrociti.

## Možganska kap

Možgansko kap lahko opredelimo kot skupek nevroloških izpadov, ki trajajo več kot 24 ur in so posledica motene prekrvavitve možganov. Motnja v prekrvavitvi določenega dela možganov je lahko posledica zamašitve žile ali pa krvavitve. Ishemična kap je posledica zamašitve žile s trombusom ali embolusom. Hemoragična kap, ki je manj pogosta, pa je posledica rupture žile (Slika 8).



**Slika 8.** Hemoragična in ishemična kap.

### Ishemična poškodba/reperfuzija

Po možganski kapi pride v predelu ishemije do poškodbe zaradi zmanjšane oskrbe možganskega tkiva s kisikom in hranilnimi snovmi. Razvoj poškodbe se iz središča ishemije širi na druge predele možganov. Poškodba ima sredico, kjer so celice najbolj prizadete. Lupino poškodbe, ki ji pravimo tudi penumbra ali ishemično obrobje, pa sestavljajo celice, kjer je poškodba v trenutku infarkta manjša.

Možgani imajo aerobno presnovo, ki je skoraj izključno odvisna od razgradnje glukoze. Pri okluziji večje arterije postane področje, ki ga oskrbuje zamašena žila, ishemično. Zato se v teh celicah zaloge energije hitro izrabijo. Pride do motenj homeostaze. Sprva se poruši ravnotežje ionskih gradientov, zato se živčne celice depolarizirajo. Sledi povečano sproščanje nevrottransmitorjev v sinaptično špranjo. Med temi so tudi ekscitatorne

aminokislina, predvsem glutamat. Zaradi porušenega ionskega ravnovesja je zmanjšana sposobnost odstranjevanja sproščeneh neurotransmitorjev. Sproščeni glutamat se v fizioloških razmerah vrača s ponovnim privzemom v presinaptične nevrone in privzemom preko membranskih transporterjev v astrocite. Ker je transport aminokislin sklopljen z ionskimi gradienti, se s porušenjem teh posledično zmanjša odstranjevanje glutamata iz sinaptične špranje. Ekscitatorne aminokislina se tako kopičijo v zunajceličnem prostoru. Nekateri izmed glutamatnih receptorjev (NMDA, metabotropni) po aktivaciji povzročijo vdor kalcijevih ionov v postsinaptične celice. To povzroči preobremenitev celic s kalcijem. Povišana znotrajcelična koncentracija kalcija sproži številne škodljive procese, med drugim tudi povečano nastajanje prostih radikalov, kar ključno pripomore k nevrotoksičnosti. Zaradi energetske izčrpanosti in porušeneh ionskih gradientov v celico vdrejo natrijevi ioni. Nastane možganski edem, ki še dodatno zmanjša perfuzijo žil.

V sredici ishemičnega področja je perfuzija žil močno zmanjšana. Trajna anoksična depolarizacija se razvije že v nekaj minutah po razvoju ishemije. V tem delu poškodbe celice hitro propadejo zaradi energetske izčrpanosti in porušene ione homeostaze.

Okoli sredice je penumbra, v kateri je pretok krvi še mogoč, saj področje ni popolnoma energetsko izčrpano. Astrociti aktivno sodelujejo pri reševanju sebe in drugih nevronov. Ob ishemiji se poveča aktivnost kalijevih kanalov TREK-2, kar omogoči repolarizacijo astrocitov, ki lahko tako znova sodelujejo pri zniževanju zunajcelične koncentracije glutamata (20). Če poškodbe ne omejimo umetno z ustreznim posegom, se lahko področje penumbre radialno širi, saj se v tem področju ponavljajo procesi energetske izčrpanosti, postishemičnega vnetja in edema. Temeljni cilj pri zdravljenju ishemične poškodbe je torej zaviranje širjenja teh procesov v področju penumbre (21).



## Namen dela

Možganska kap je zelo pogosta nevrološka bolezen s hudimi posledicami za posameznika in družbo. Veliko je že znanega, kako se na ishemijo odzovejo živčne celice, manj pa kako na hipoksijo in pomanjkanje hranil odreagirajo astrociti. Želeli smo preučiti, kako hipoksija in pomanjkanje hranil vplivata na privzem histamina, kar je ena od temeljnih funkcij astrocitov.

V razmerah *in vitro* se astrociti prehranjujejo večinoma z aerobno razgradnjo glukoze, zato jih navadno vzdržujemo v gojitvenem mediju z visoko koncentracijo glukoze in dodatkom fetalnega govejega seruma v inkubatorju, v katerega dovajamo mešanico zraka in CO<sub>2</sub>. Če astrocitom odstranimo glukozo, poleg tega pa še proteine, ki so prisotni v serumu, in jih izpostavimo okolju brez kisika, povzročimo, da se hitro porabijo zaloge energije ter s tem izzovemo motnje homeostaze, ki lahko vodijo v (i)reverzibilno okvaro njihove funkcije.

V diplomski nalogi bomo preverili naslednje delovne hipoteze.

1. Po prehodnem pomanjkanju kisika in hranil se bodo spremenile lastnosti transporta histamina v astrocite.
2. Prisotnost zunajceličnih Na<sup>+</sup> ionov in aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze bosta vplivala na privzem histamina v astrocite v kontrolnih razmerah in po pomanjkanju kisika in hranil.
3. Količina privzetega in sproščenega histamina iz astrocitov se bo zmanjševala sorazmerno s časom izpostavljenosti pomanjkanju kisika in hranil.

## Materiali

Uporabili smo: medij za izolacijo celičnih kultur Leibowitz L-15 (Sigma, ZDA); medij za gojenje celičnih kultur Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), natrijev piruvat, L-glutamin, gentamicin, tripsin-EDTA (GIBCO, Velika Britanija); serum (FBS) (Cambrex, Belgija); <sup>3</sup>H-histamin (NEN, ZDA); ouabain (Serva, Nemčija); pufer za privzem: HEPES, holin klorid, MgSO<sub>4</sub> (Sigma, ZDA), NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in CaCl<sub>2</sub> (Merck, Nemčija); NaOH (Riedel, Nemčija); reagent za določanje proteinov (BioRad, Velika Britanija) in scintilacijsko tekočino Aquasol (NEN, ZDA).

## Metode

### Priprava celičnih kultur

Primarne kulture astrocitov smo pripravili iz možganskih skorij 3 dni starih mladičev podgan obeh spolov seva Wistar po metodi Schwartzove in Wilsonove (22). Vsi postopki na živalih so bili opravljeni v skladu z dovoljenjem Veterinarske uprave Republike Slovenije za izvajanje poskusov na živalih št. 34401-1/2010/8 in smernicami za delo s poskusnimi živalmi, ki jih je izdal Komite za zaščito živali Nacionalnih inštitutov zdravja, Bethesda, ZDA.

Iz lobanje dekapitiranih podgan smo previdno odstranili možgane ter jih potopili v raztopino Leibowitz L-15. Nato smo z možganov odstranili možganske ovojnice in možgansko skorjo. Po odstranitvi mening smo v raztopini Leibowitz L-15 s pomočjo pipet in injekcijskih igel različnih svetlin mehansko razdrobili možgansko tkivo. Po centrifugiranju suspenzije smo usedlino prenesli v gojilne posode, ki so vsebovale medij za gojenje astrocitov z naslednjo sestavo: DMEM (po Dulbeccu modificiran Eaglov medij) z visoko koncentracijo glukoze, ki smo mu dodali še 10 volumskih odstotkov govejega fetalnega seruma, 1 mM piruvata, 2 mM glutamina in 25  $\mu$ M/mL gentamicina, kot priporočata Scwartzova in Wilsonova (22). Celice smo gojili v inkubatorju pri 37°C v mešanici 95% zraka in 5% CO<sub>2</sub>.

Ko so kulture postale prvič konfluentne, smo jih stresali preko noči pri 150 obratih/minuto. Medij smo zamenjali naslednje jutro. Postopek s stresanjem in menjanjem medija smo ponovili trikrat. S stresanjem se znebimo celic mikroglije, ki se ne morejo pritrditi na gojitveno posodo tako učinkovito kot astrociti. Takoj zatem smo naredili prvo pasažo in celice gojili še približno en teden. Nato smo izvedli še drugo pasažo. Odstop celic od podlage gojilne posode smo dosegli z raztopino tripsin-EDTA. Celice smo presadili na gojilne plošče in jih gojili še tri tedne, nato pa jih uporabili v poskusih.

### Ishemija in reperfuzija v razmerah *in vitro*

Da smo ponazorili ishemijo in reperfuzijo v razmerah *in vitro*, smo celicam 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% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> in preostankom N<sub>2</sub>. Po 1, 3 oziroma 6 urah inkubacije smo celicam zamenjali medij. Ponovno smo jim dali gojitveni medij z visoko koncentracijo glukoze in seruma, inkubirali nadaljnjih 21 ur pri 37°C, 95% zraka in 5% kisika. Nato smo jih uporabili za test privzema histamina.

### **Učinek Na<sup>+</sup> ionov in aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze na privzem histamina**

Po ishemiji in reperfuziji smo odstranili DMEM in celice dveh kolon dvakrat sprali s pufrom za privzem (25 mM HEPES, 125 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,7 mM CaCl<sub>2</sub>, 5,6 mM glukoze, pH 7,4), celice tretje kolone pa s pufrom, ki je bil povsem enak puftru za privzem, le da je namesto NaCl vseboval holin klorid. Celice smo pri 37°C 30 min inkubirali v naslednjih medijih: prvo kolono v puftru za privzem, drugo s 60 µl 1 mM ouabainom, tretjo pa s pufrom, v katerem smo NaCl nadomestili s holin kloridom. Dodali smo 100 µl 0,75 µM <sup>3</sup>H-histamina in reakcijo prekinili po 20 minutah.

Privzem smo prekinili tako, da smo celice postavili na led in jih štirikrat hitro sprali z ledeno mrzlim pufrom za privzem, ki ni vseboval CaCl<sub>2</sub>. Astrocite smo nato denaturirali s 300µl 0,5 M NaOH. Plošče smo postavili na stresalnik za 10min pri 200 obratih/min. V 250 µl vsakega vzorca smo dodali še 1,5ml scintilacijske tekočine in izmerili radioaktivnost, v preostanku vsakega vzorca pa izmerili koncentracijo proteinov z Bradfordovo metodo.

Naredili smo tudi poskus, pri katerem smo spiranje in tretiranje s <sup>3</sup>H-histaminom izvajali pri 4°C.

### **Od koncentracije histamina odvisen privzem in sproščanje histamina**

Po ishemiji in reperfuziji smo odstranili DMEM in celice dvakrat sprali s pufrom za privzem (25 mM HEPES, 125 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,7 mM CaCl<sub>2</sub>, 5,6 mM glukoze, pH 7,4). Celice smo nato 30 minut inkubirali pri 37°C v puftru za privzem, nato pa smo jim dodali 100 µl <sup>3</sup>H-histamina, v koncentracijah 5, 8, 10, 30 in 50 nM, ter inkubirali 20 minut. Imeli smo tudi kontrolo. Po zaključeni inkubaciji smo celice štirikrat sprali s pufrom za privzem sobne temperature brez CaCl<sub>2</sub>. Nato smo dodali 600 µl pufrja za privzem brez CaCl<sub>2</sub> ter inkubirali še 15 minut. Po preteku inkubacijskega

časa smo 500  $\mu\text{l}$  tekočine prenesli v epico, ostalo pa zavrgli. V epice smo dodali še 1,5 ml scintilacijske tekočine ter izmerili radioaktivnost. Celice, ki so ostale na gojilnih ploščah, smo denaturirali s 300  $\mu\text{l}$  0,5M NaOH. Plošče smo postavili na stresalnik za 10 min pri 200 obratih/min. V 250  $\mu\text{l}$  vsakega vzorca smo dodali 1,5ml scintilacijske tekočine in izmerili radioaktivnost, v preostanku vsakega vzorca pa izmerili koncentracijo proteinov z Bradfordovo metodo.

## **Določanje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi**

Za določitev proteinov smo odpipetirali po 8  $\mu\text{L}$  vzorca na ploščo za določitev proteinov. Vsakemu vzorcu smo dodali 152  $\mu\text{L}$  bidestilirane vode in 40  $\mu\text{L}$  reagenta BioRad. Za umeritveno krivuljo smo pripravili 0,5  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , 1,6  $\mu\text{g}$ , 2  $\mu\text{g}$ , 4  $\mu\text{g}$ , 6  $\mu\text{g}$  in 10  $\mu\text{g}$  albumina. Vzorce smo nato premešali in pustili 30 min. Po poteku 30 minut smo spektrofotometrično izmerili absorpcijo pri valovni dolžini 595 nm. Meritev vsakega vzorca smo opravili v dveh paralelkah.

## **Analiza podatkov**

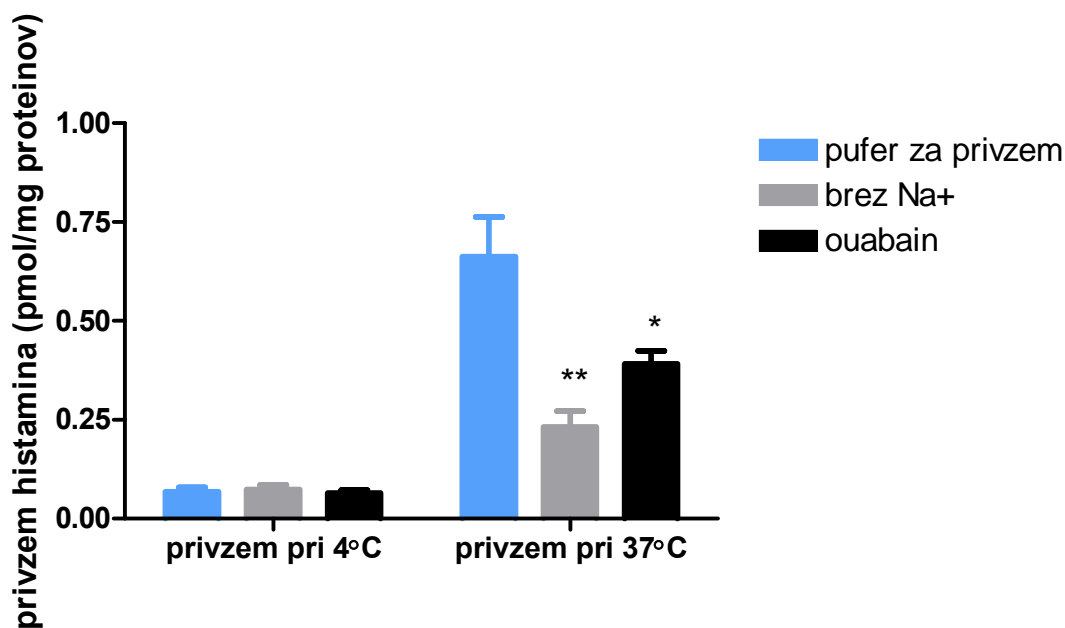
Vse poskuse smo izvedli v najmanj treh paralelkah in jih ponovili. S pomočjo računalniškega programa GraphPad Prism 5 smo izračunali statistične značilnosti privzema in sproščanja histamina. Uporabili smo t-test, če smo primerjali dva vzorca, ali enosmerno analizo variance (ANOVA) in Bonferronijev ali Dunnetov post-hoc test, če smo primerjali več skupin podatkov med seboj. Statistično značilno razliko predstavlja vrednost  $p \leq 0,05$ .

## **Rezultati**

### **Učinek $\text{Na}^+$ ionov in aktivnosti $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze na privzem histamina**

Transport histamina smo spremljali v primarnih kulturah astrocitov. Najprej nas je zanimal vpliv  $\text{Na}^+$  ionov in ouabaina, inhibitorja encima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, na količino privzetega histamina. Preučevali smo celokupni privzem histamina, ki poteka pri 37°C, in nespecifični privzem histamina, ki poteka pri 4°C, oboje v fizioloških razmerah ter po

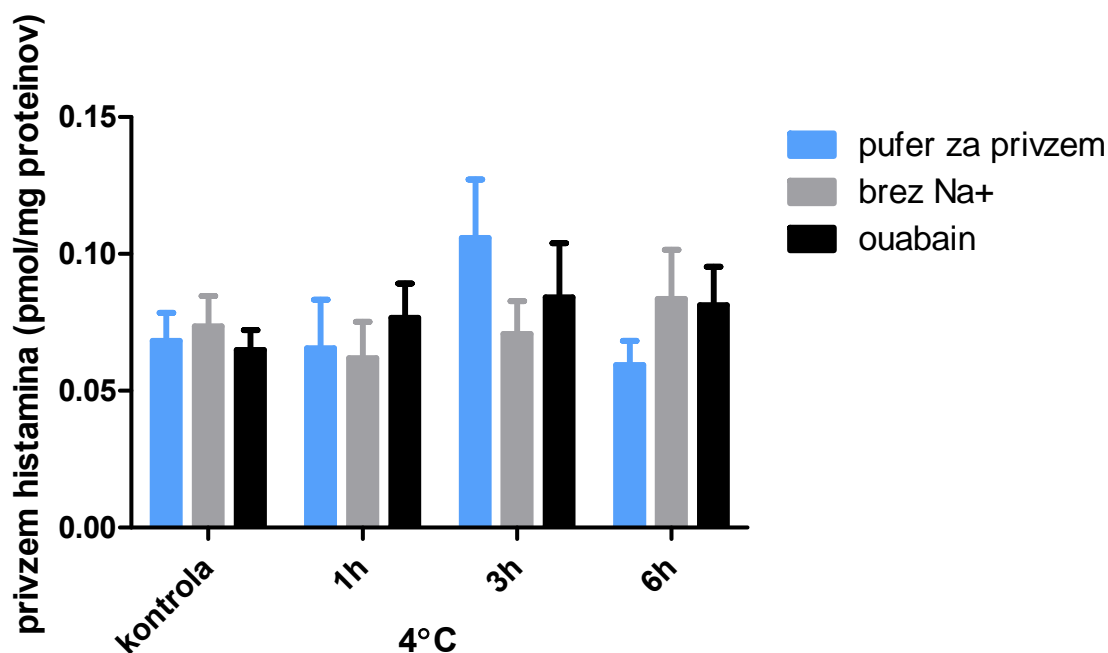
ishemiji in reperfuziji. Kontrolno skupino so predstavljali astrociti vzgojeni v mediju DMEM, ki je vseboval visoko koncentracijo glukoze in 10 volumskih odstotkov seruma v mešanici 95% zraka in 5% kisika, ter niso bili izpostavljeni pomanjkanju kisika in hranil. Na tem modelnem sistemu je bil opravljen privzem histamina v pufru za privzem, pufru za privzem brez Na<sup>+</sup> ionov ter tistem z dodanim ouabainom.



**Slika 9.** Privzem <sup>3</sup>H-histamina v primarnih kulturah astrocitov pri 4°C in 37°C v normalnih razmerah, torej brez ishemije in reperfuzije. Vrednosti označene z zvezdicami predstavljajo statistično značilno zmanjšanje privzema <sup>3</sup>H-histamina v neonatalne astrocite, \* p<0,05, \*\* p<0,01. Prikazane vrednosti predstavljajo srednje vrednosti ± standardne napake aritmetičnih sredin (n=8 za 4°C, n=4 za 37°C).

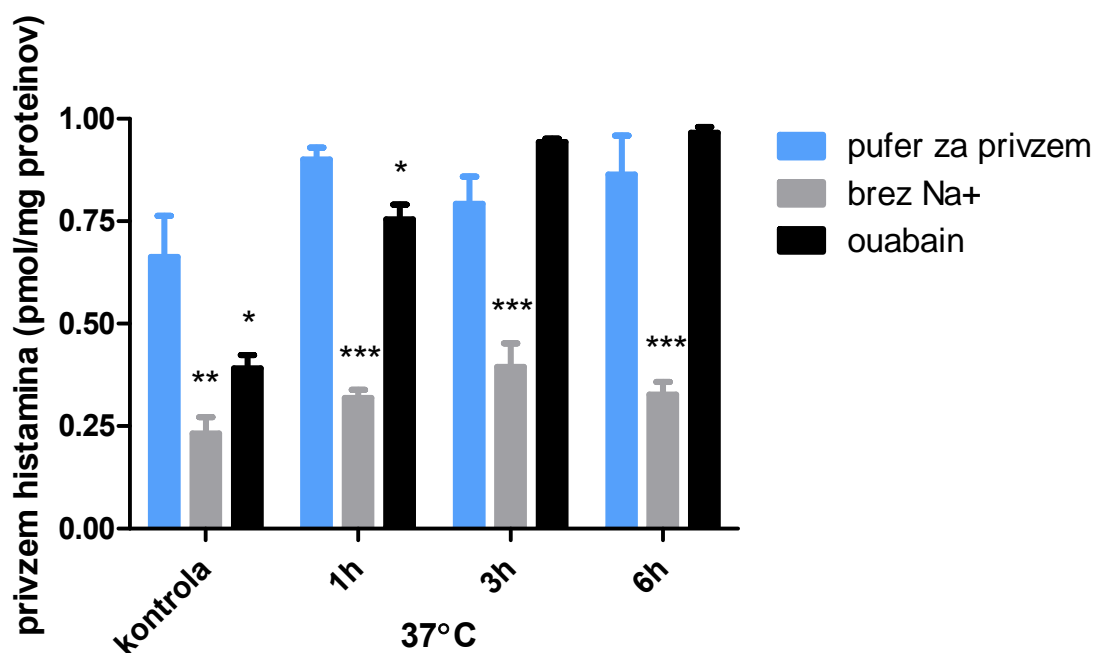
Slika 9 prikazuje privzem histamina pri 4°C in 37°C ter vpliv pomanjkanja Na<sup>+</sup> ionov in inhibicije Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze na omenjeni proces pri obeh temperaturah. Privzem histamina v astrocite je pri 37°C statistično značilno večji kot pri 4°C. Privzem pri 37°C predstavlja celokupni privzem, privzem pri 4°C pa nespecifični privzem. Privzem histamina pri 37°C je odvisen od prisotnosti Na<sup>+</sup> ionov v zunajcelični tekočini, saj se v njihovi odsotnosti privzem histamina v astrocite statistično značilno zmanjša. Zamenjava NaCl s holin kloridom je zmanjšala celokupni privzem histamina več kot za polovico, z 0,66 na 0,23 pmol/mg proteinov. Do zmanjšanja celokupnega privzema z 0,66 na 0,39 pmol/mg

proteinov pride tudi, če inhibiramo  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazo z oubainom. Privzem pri  $4^\circ\text{C}$  je bistveno manjši, saj obsega le približno 10% celokupnega, poleg tega pa ni odvisen od prisotnosti  $\text{Na}^+$  ionov in aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze. Histamin se v fizioloških razmerah, torej pri telesni temperaturi in sestavi medija za privzem, ki ponazarja sestavo zunajcelične tekočine, privzema na dva načina: z aktivnim in pasivnim transportom.



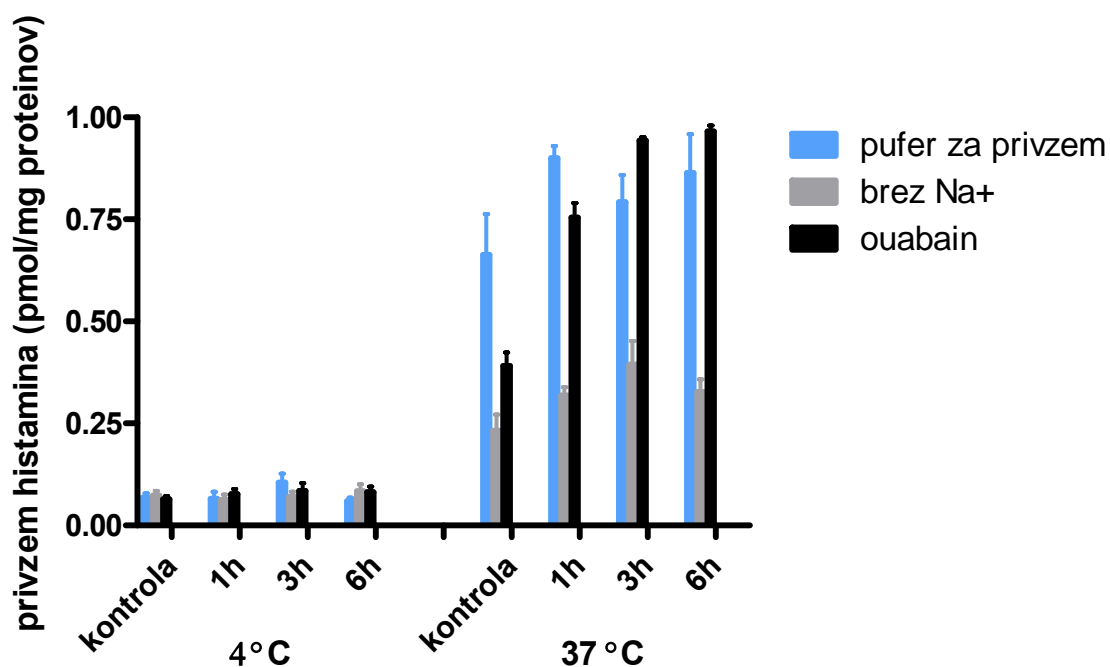
**Slika 10.** Privzem  $^3\text{H}$ -histamina v primarnih kulturah astrocitov pri  $4^\circ\text{C}$ . Prikazane vrednosti predstavljajo srednje vrednosti  $\pm$  standardne napake aritmetičnih sredin ( $n=8$ ).

Na sliki 10 je prikazan vpliv ishemije in reperfuzije pri nespecifičnem privzemu histamina. Po 1, 3 in 6 urni predhodni izpostavitvi astrocitov pomanjkanju kisika in hranil se količina privzetega histamina bistveno ne razlikuje od kontrolne vrednosti. Pri  $4^\circ\text{C}$  se histamin privzema le z elektrodifuzijo, ki ni odvisna niti od količine  $\text{Na}^+$  ionov v mediju za privzem niti od predtretiranja z oubainom. Zaključimo lahko, da nespecifični privzem histamina z elektrodifuzijo ostaja nespremenjen ne glede na trajanje ishemije in reperfuzije.



**Slika 11.** Privzem  $^3\text{H}$ -histamina v primarnih kulturah astrocitov pri  $37^\circ\text{C}$ . Vrednosti označene z zvezdicami predstavljajo statistično značilno zmanjšanje privzema  $^3\text{H}$ -histamina v neonatalne astrocite, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Prikazane vrednosti predstavljajo srednje vrednosti  $\pm$  standardne napake aritmetičnih sredin ( $n=4$ ).

Ko smo preučevali privzem histamina v astrocite pri  $37^\circ\text{C}$ , smo opazili značilne spremembe mehanizma tega procesa (Slika 11). Količina privzetega histamina se po 1, 3, in 6 urah hipoksije in 21 urni reperfuziji ni bistveno razlikovala tiste v kontrolnih razmerah. Prav tako ishemija in reperfuzija nista povzročili spremembe odvisnost privzema od razpoložljivosti  $\text{Na}^+$  ionov v mediju za privzem. 3 in 6 urna izpostavitvev ishemiji in reperfuziji pa je povzročila, da privzem histamina ni bil odvisen od aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze. Zaključimo lahko, da več kot enourna ishemija okvari aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze.



**Slika 12.** Primerjava privzemov  $^3\text{H}$ -histamina v primarnih kulturah astrocitov pri 4°C in 37°C. Prikazane vrednosti predstavljajo srednje vrednosti  $\pm$  standardne napake aritmetičnih sredin (n=8 za 4°C, n=4 za 37°C).

Privzem histamina pri 4°C se bistveno razlikuje od privzema pri 37°C (Slika 12). Privzem pri 4°C predstavlja le okoli desetino količine histamina, ki se privzame pri 37°C. Pri 4°C ne opazimo odvisnosti od  $\text{Na}^+$  ionov in ouabaina. Zaključimo lahko, da se histamin pri 4°C privzema v astrocite le z elektrodifuzijo, pri 37°C pa z elektrodifuzijo (40-50%) in aktivnim transportom (50-60%).

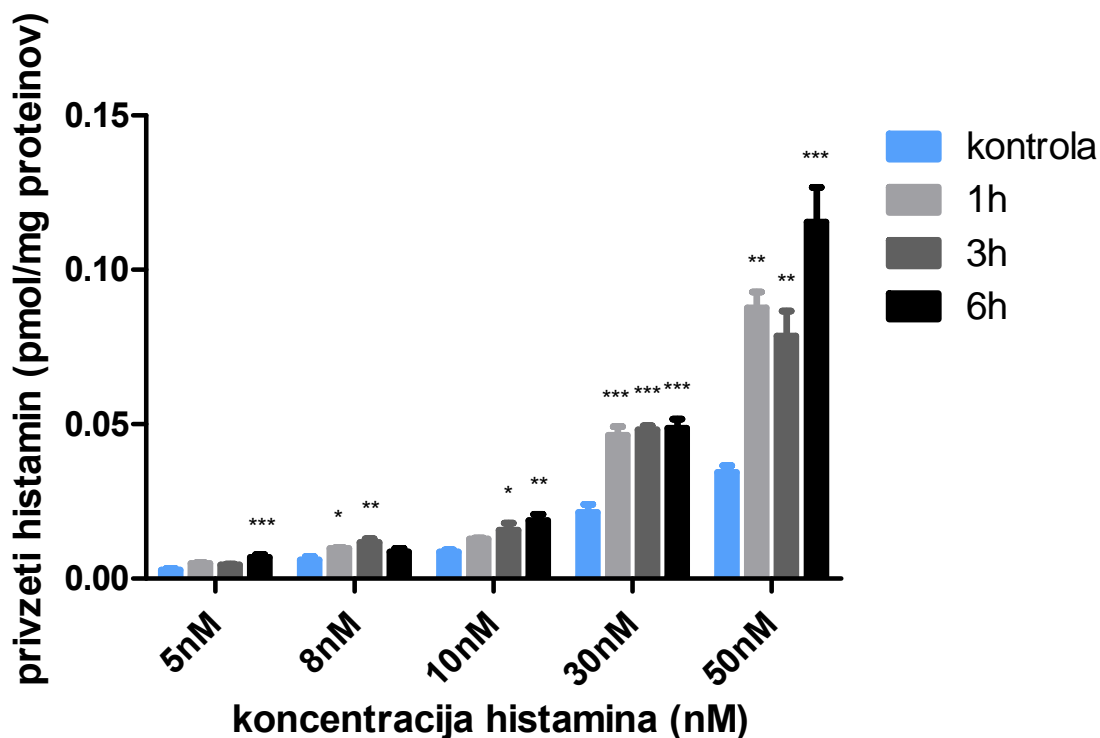
### **Od koncentracije histamina odvisen privzem in sproščanje histamina**

Ker je promet neurotransmiterja s pomočjo transporterjev dvosmeren proces, smo v nadaljevanju raziskave želeli ugotoviti, kako ishemija/reperfuzija vpliva predvsem na sproščanje pa tudi na privzem histamina.

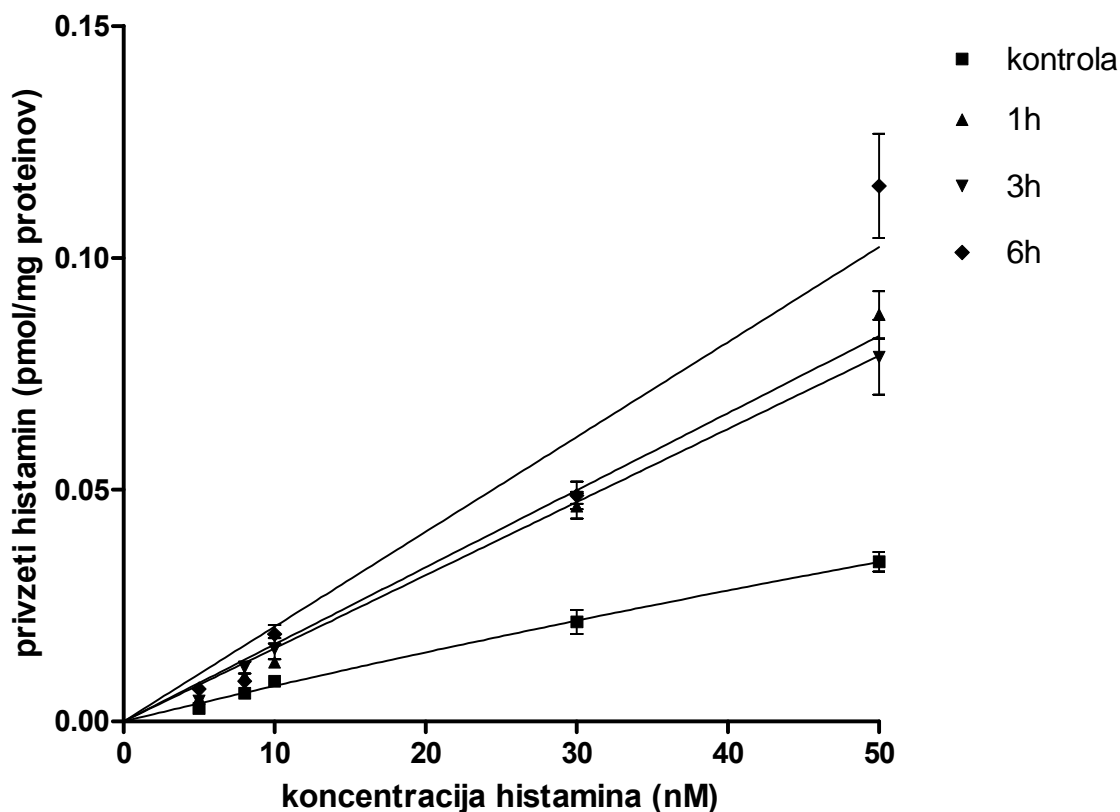
Kontrolno skupino so predstavljali astrociti vzgojeni v mediju DMEM, ki je vseboval visoko koncentracijo glukoze in 10 volumskih odstotkov seruma v mešanici 95% zraka in 5% kisika, ter niso bili izpostavljeni pomanjkanju kisika in hranil. Na tem modelnem sistemu je bil opravljen privzem histamina le v pufru za privzem.



Celokupni privzem histamina v astrocite smo izračunali tako, da smo sešteli tako količino histamina, ki je ostal privzet v celicah, kot tudi tisto, ki se je sprostila iz astrocitov. Količina privzetega histamina v astrocite je naraščala v odvisnosti od njegove koncentracije, v kateri smo celice inkubirali (Slika 13).

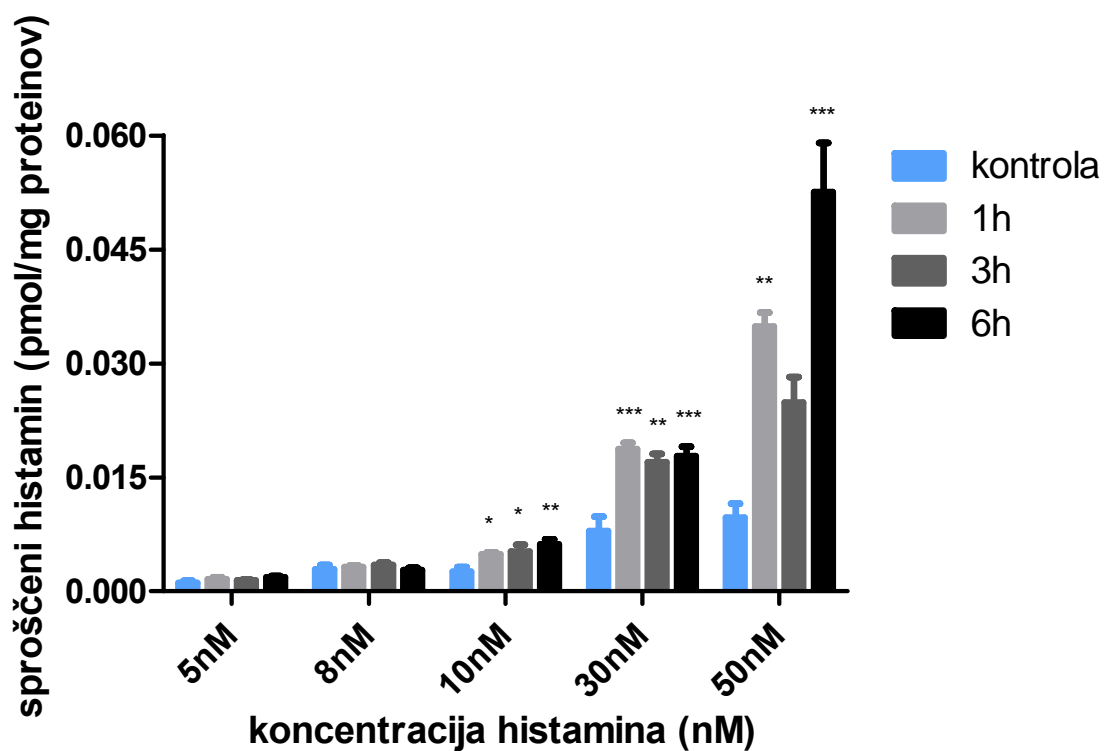


**Slika 13.** Celokupni privzem  $^3\text{H}$ -histamina v primarnih kulturah astrocitov pri  $37^\circ\text{C}$ . Astroцитom smo dodali 5, 8, 10, 30, 50 nM  $^3\text{H}$ -histamina. Izpostavitve hipoksiji/reperfuziji povzročijo povečan privzem histamina glede na kontrolno vrednost. Vrednosti označene z zvezdicami predstavljajo statistično značilne razlike v privzemu  $^3\text{H}$ -histamina v neonatalne astrocite, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Prikazane vrednosti predstavljajo srednje vrednosti  $\pm$  standardne napake aritmetičnih sredin ( $n=4$ ).

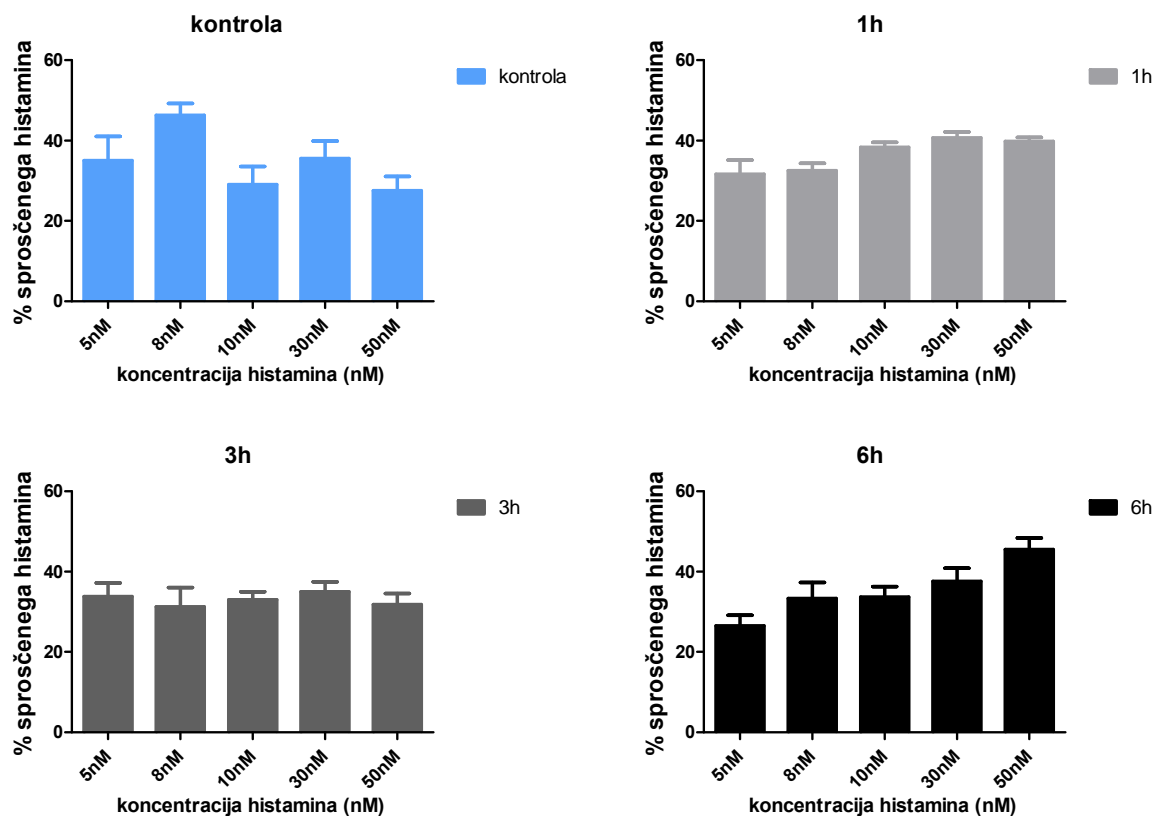


**Slika 14.** Celokupni privzem  $^3\text{H}$ -histamina v primarnih kulturah astrocitov pri  $37^\circ\text{C}$ . Prikazane vrednosti predstavljajo srednje vrednosti  $\pm$  standardne napake aritmetičnih sredin ( $n=4$ ).

Če analiziramo količino privzetega histamina v odvisnosti od koncentracija histamina, opazimo, da se v kontrolnih razmerah nakazuje saturacija, medtem ko po izpostavitvi hipoksiji/reperfuziji količina privzetega histamina linearno narašča (Slika 14). Med 1 in 3 urami hipoksije/reperfuzije ni bistvenih razlik, po 6 urah pa je količina privzema večja. Linearna odvisnost naraščanja privzema histamina v odvisnosti od koncentracije histamina v inkubacijskem mediju nakazuje na izgubo kontrole nad količino privzetega histamina v astrocitate. Hkrati nakazuje tudi na manjšo vlogo ali celo odsotnost prenašalcev pri tem procesu. Verjetno se po izpostavitvi pomanjkanju kisika in hranil histamin v astrocitate prenaša z olajšano difuzijo ali celo difuzijo brez udeležbe prenašalcev, ker pride do poškodbe celične membrane.



**Slika 15.** Sproščanje  $^3\text{H}$ -histamina iz primarnih kultur astrocitov. Izpostavitvev hipoksiji/reperfuziji povzroči povečano sproščanje histamina glede na kontrolno vrednost. Vrednosti označene z zvezdicami predstavljajo statistično značilno razliko pri sproščanju  $^3\text{H}$ -histamina iz neonatalnih astrocitov, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Prikazane vrednosti predstavljajo srednje vrednosti  $\pm$  standardne napake aritmetičnih sredin ( $n=4$ ).



**Slika 16.** Odstotek sproščenega  $^3\text{H}$ -histamina, izračunan kot kvocient med sproščenim histaminom in celokupno privzetim histaminom.

Delež sproščenega histamina preko transporterja ostaja enak ne glede na dolžino izpostavitve ishemiji/reperfuziji (Slika 16). To pomeni, da če se je povečal privzem, se je povečalo tudi sproščanje histamina iz astrocitov. Sproščanje histamina preko transporterskega sistema poteka v manjši meri kot privzem. Zaključimo lahko, da pomanjkanje kisika in hranil ne vpliva na količino histamina, ki se sprosti preko transportnih proteinov.

## Razprava

Sinaptični proces v osrednjem živčevju je močno uravnavan. Za normalno delovanje možganov je potrebno natančno in kompleksno urejeno sproščanje nevrotansmitorjev, prav tako pa je pomembna tudi njihova čim hitrejša inaktivacija in odstranitev z mesta delovanja. Koncentracija nevrotansmitorja lahko po sproščanju v sinaptično špranjo doseže celo molarne vrednosti. Če ne pride do hitre in učinkovite odstranitve prenašalcev,

ostajajo nevroni prekomerno vzdraženi, kar vodi v nepravilno delovanje in lahko v končni fazi povzroči ireverzibilno poškodbo nevronov.

Ena od glavnih nalog astrocitov je vzdrževanje homeostaze in zagotavljanje ustreznega mikrookolja, v katerem lahko živčne celice nemoteno delujejo. Astrociti lahko iz zunanjceličnega prostora odstranjujejo prebitke kalijevih ionov ter ekscitatornih neurotransmitorjev (glutamat) in na ta način ščitijo nevrone pred morebitno vzdražno poškodbo (19). Vloga neurotransmitorja glutamata v osrednjem živčevju je zaradi njegovega izrednega pomena ena najbolj raziskanih. V primeru glutamata ishemija povzroči spremembo elektrokemijskega gradienta, ta pa nato njegovo povečano sproščanje. Znano je tudi, da sproščanje povzročeno z ishemijo poteka v večji meri preko transporterjev kot pa z eksocitozo, posredovano s kalcijevimi ioni. Nevroni so ob ishemiji veliko bolj občutljivi, ker nimajo lastnih energetskih zalog. Astrociti so bolj odporni na ishemijo, ker imajo lastne zaloge glikogena, ki jih lahko koristijo za ohranjanje ionskega gradienta in ustrezno delovanje glutamatnega transporta (23). Poleg transporterjev za glutamat (EAAT 1-5) astrociti vsebujejo tudi transporterje za druge neurotransmitorje in tako sodelujejo pri inaktivaciji le-teh (noradrenalin, serotonin, dopamin). Za astrocitate vemo, da v večji meri kot nevroni privzemajo histamin in predstavljajo glavno mesto njegove inaktivacije v osrednjem živčevju (24, 25, 26).

Histamin je eden od klasičnih prenašalcev v osrednjem živčevju, ki se inaktivira tako z difuzijo v zunajcelični prostor kot tudi z encimsko razgradnjo. Ker se encim histamin N-metil-transferaza, ki razgrajuje histamin v osrednjem živčevju, nahaja znotrajcelično (26, 27), se morajo molekule histamina ponovno privzeti v živčne celice oz. v astrocitate.

Zaradi svojega neto pozitivnega naboja pri fiziološkem pH, eksperimentalno določeni pKa vrednosti histamina sta 5,8 in 9,4, histamin ne more oz. zelo težko prosto prehajati v celice preko lipidnega dvosloja. Za lažji prehod v celico histamin nujno potrebuje transportni protein, kar smo potrdili tudi mi. Histamin se v fizioloških razmerah prenaša preko celične membrane z dvema procesoma: elektrodifuzijo in aktivnim transportom odvisnim od  $\text{Na}^+$  ionov in aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze. S pomočjo aktivnega transporta se v fizioloških razmerah prenese dobra polovica histamina v astrocitate. Selektivnega zaviralca privzema histamina še ne poznamo, zato smo poskuse, ki ponazarjajo nespecifični privezem histamina opravili pri  $4^\circ\text{C}$ , to je temperaturi, pri kateri v telesu ne morejo potekati procesi, ki terjajo porabo energije.

Histamin se privzema v astrocite na enak način kot ostali biogeni amini. Dopaminski transporter (DAT), serotoninški transporter (SERT), noradrenalinski transporter (NET), glicinski transporter (GLYT) in GABA transporter (GAT) so prisotni na membrani astrocitov. Prenos molekul preko njih zahteva razpoložljivost  $\text{Na}^+$  ionov in aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze.

Za ponazoritev ishemičnih razmer smo izbrali ustaljeni eksperimentalni model ishemije v razmerah *in vitro*. Celicam nismo odvzeli le kisika s premestitvijo v inkubator, ki je bil preprihan z mešanico plinov, temveč smo gojitveni medij nadomestili tudi z raztopino DMEM, ki ni vsebovala glukoze niti govejega fetalnega seruma. Po 1, 3 in 6 urah ishemičnih razmer smo astrocite za 21 ur prenesli v inkubator s 95% zraka in 5%  $\text{CO}_2$  ter jih ponovno gojili v gojitvenem mediju z glukozo in serumom. Tako smo ponazorili reperfuzijo, v fizioloških razmerah ponovno prekrvavitve. Navedeno trajanje odtegnitve kisika in hranil smo izbrali zato, ker izsledki ne samo kliničnih študij temveč tudi rezultati klinične prakse kažejo, da lahko močno zmanjšamo posledice ishemične možganske kapi, če ukrepamo znotraj treh ur od nastopa simptomov (5). V treh urah po nastopu simptomov ishemične kapi je čas za interventne ukrepe z radiološkimi postopki, npr. raztapljanje in/ali odstranjevanje strdkov. Po tem časovnem intervalu pride že do ireverzibilnih nevroloških okvar.

Izpostavitve primarnih kultur astrocitov ishemiji in reperfuziji je bistveno spremenila njihove lastnosti pri privzemu histamina. V normalnih razmerah in 1, 3 in 6 urnem prehodnem pomanjkanju kisika in hranil je transport histamina odvisen od prisotnosti zunajceličnih  $\text{Na}^+$  ionov, vendar le če ga merimo pri  $37^\circ\text{C}$  (Slika 11). Če nadomestimo  $\text{NaCl}$  s holin kloridom, se namreč transport histamina pri  $37^\circ\text{C}$  statistično značilno zmanjša več kot za polovico. Pri  $4^\circ\text{C}$  zunajcelična koncentracija  $\text{Na}^+$  nima vpliva (Slika 10). Transport pri  $4^\circ\text{C}$  poteka z elektrodifuzijo, ki ni odvisna od zunajceličnega  $\text{Na}^+$ , zato odtegnitev  $\text{Na}^+$  ionov na ta proces ne vpliva.

Za vzpostavitev in vzdrževanje ustreznega ionskega gradienta  $\text{Na}^+$  ionov *in vivo* je nujno potreben njihov aktivni transport, pri tem pa ima ključno vlogo  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza. Potrdili smo, da inhibicija  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze pri  $37^\circ\text{C}$  povzroči zmanjšanje gradienta  $\text{Na}^+$  ionov in s tem zmanjšan privzem histamina v kontrolnih razmerah in po 1 urni hipoksiji/reperfuziji (Slika 11). Pri daljši izpostavitvi stresnim pogojem pa se kopičijo poškodbe membrane in odpove delovanje  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, zato ta izgubi svoj vpliv. Pri  $4^\circ\text{C}$  z inhibicijo  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -

ATPaze ne opazimo bistvenih sprememb v privzemu (Slika 10). Pri tej temperaturi  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza namreč ni aktivna, prav tako pa ne deluje aktivni transport.

Transport preko prenašalcev je odvisen od temperature. Pri 4°C se histamin prenaša v astrocite le z elektrodifuzijo, le-ta pa ni odvisna od koncentracijskega gradienta  $\text{Na}^+$  ionov in aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze. Pri 37°C se histamin privzema v astrocite z olajšano difuzijo in predvsem z aktivnim transportom odvisnim od prisotnosti zunajceličnih  $\text{Na}^+$  ionov, ki so gonilna sila za vzdrževanje aktivnega transporta histamina v astrocite. Prav tako je pomemben tudi encim  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza, ki pomaga vzpostavljati ionski gradient potreben za učinkovito delovanje transporta.

Zaključimo lahko, da se histamin pri 4°C privzema v astrocite le z elektrodifuzijo, pri 37°C pa tako z elektrodifuzijo (40-50%) kot z aktivnim transportom (50-60%), ki je odvisen od prisotnosti  $\text{Na}^+$  ionov in vzdrževanja njihovega ustreznega gradienta. Zmanjšanje aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze smo opazili že po 1 uri hipoksije/reperfuzije, 3 in 6 urna hipoksija/reperfuzija pa je povzročila njeno ireverzibilno okvaro. Predvidevamo, da pri elektrodifuziji sodelujeta transporterja OCT in PMAT, oba nizko selektivna in visoko kapacitivna.

Pri poskusu, kjer smo opazovali od koncentracije odvisen privzem in sproščanje histamina, smo opazili, da se v celice privzame več histamina, če jih inkubiramo pri višjih koncentracijah histamina (Slika 13). To je v skladu s pričakovanji. Nevrotransmitter se mora po interakciji z receptorjem čim hitreje inaktivirati. Tako se prepreči prekomerna stimulacija postsinaptičnega nevrona oziroma prekomerno proženje akcijskega potenciala, kar lahko vodi v vzdražno poškodbo nevronov. Razlog za statistično signifikantno razliko kontrole in skupin, pri katerih smo povzročili pomanjkanje kisika in hranil, je zelo verjetno poškodba celične membrane. Povečanje privzema histamina lahko pripišemo povečanemu pasivnemu transportu, difuziji in olajšani difuziji.

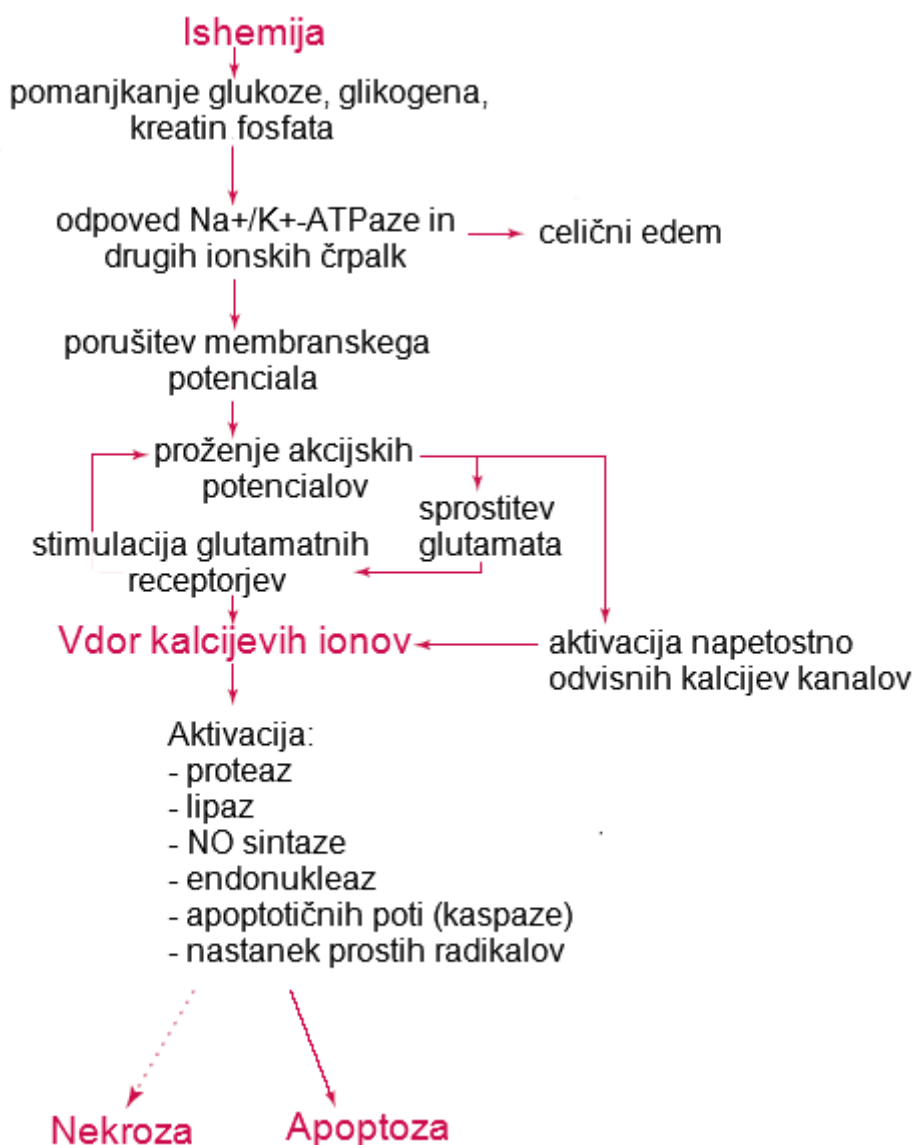
Pri analizi količine privzetega histamina v odvisnosti od koncentracija histamina (Slika 14) se v kontrolnih razmerah nakazuje saturacija, medtem ko po izpostavitvi hipoksiji/reperfuziji količina privzetega histamina linearno narašča. Linearna odvisnost kaže na izgubo kontrole nad količino privzetega histamina in na spremembo v samem mehanizmu transporta. Histamin se po ishemiji/reperfuziji transportira z olajšano difuzijo ali celo difuzijo brez udeležbe prenašalcev, kar je posledica poškodbe celične membrane.

Prav tako večji naklon pri 1, 3 in 6 urnem pomanjkanju kisika in hranil pomeni povečan privzem histamina zaradi kopičenja poškodb membrane.

Histamin se po predhodnem privzemu iz primarnih kultur astrocitov tudi sprošča. Pri poskusu smo izbrali inkubacijo v pufru brez  $\text{CaCl}_2$ , ker smo tako zmanjšali morebitno sproščanje iz veziklov in opazovali predvsem sproščanje posredovano preko transporterjev. Sproščanje histamina iz celic je večje, če smo jih izpostavili večji koncentraciji histamina. To lahko pripišemo dejstvu, da celice vedno težijo k vzpostavljanju homeostaze. Opazili smo, da se pri koncentracijah inkubacije 10, 30 in 50 nM kontrolne vrednosti statistično razlikujejo od večine preostalih eksperimentalnih vrednosti (Slika 15). Razlog lahko pripišemo poškodbam membrane in posledičnemu povečanju pasivnega transporta, olajšani difuziji in celo običajni difuziji.

Zaključimo lahko, da ishemija resno okvari celično membrano in tako močno zmanjša njeno sposobnost za vzpostavljanje homeostaze (Slika 17).





**Slika 17.** Dogodki po ishemiji, ki vodijo v celično smrt.

Dvosmerni transport histamina pri astrocitih lahko uravnava zunajcelično koncentracijo histamina v možganih. Sproščanje histamina iz astrocitov poteka v manjšem obsegu kot privzem. Histamin se privzame, kadar je v prebitku, ter izplavlja, kadar so za optimalno delovanje potrebne večje koncentracije histamina v zunajcelični tekočini. Astrociti so enakopraven člen tridelne sinapse in delujejo kot nekakšen puferski sistem, ki skuša nevtralizirati ekstremne odklone v koncentraciji histamina v sinaptični špranji in njeni okolici. Pri tem je njihova osnovna naloga čim hitreje privzeti histamin in s tem preprečiti predolgo stimulacijo postsinaptičnega nevrona. Po njegovem privzemu pa so astrociti

sposobni histamin tudi sproščati. Tako aktivno sodelujejo pri sinaptičnem prenosu informacije, saj lahko podaljšujejo stimulacijo postsinaptičnega nevrona.

## Sklep

Hipoksija in reperfuzija lahko povzročita funkcionalno poškodbo astrocitov, ki se odraža v spremenjenih lastnostih privzema histamina v astrocite vzgojene iz neonatalnih podgan.

V diplomski nalogi smo potrdili dve delovni hipotezi, eno pa ovrgli.

1. Po predhodni odtegnitvi kisika in hranil so se spremenile lastnosti transporta histamina v astrocite. V normalnih razmerah poteka privzem histamina v astrocite z olajšano difuzijo in aktivnim transportom preko prenašalcev. S podaljševanjem časa pomanjkanja kisika in hranil se zmanjša delež aktivnega transporta, poveča pa se pasivni transport.

2. Na privzem histamina v astrocite vplivata tako prisotnost zunajceličnih  $\text{Na}^+$  ionov kot aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze. Koncentracija  $\text{Na}^+$  ionov vpliva na privzem histamina v astrocite v normalnih razmerah in po 1, 3 in 6 urah izpostavljenosti pomanjkanju kisika in hranil.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza pomembno sodeluje pri vzdrževanju ionskega gradienta. Po 3 in 6 urah pomanjkanja kisika in hranil ne vpliva več na privzem histamina zaradi ishemične poškodbe.

3. Količina privzetega in sproščenega histamina iz astrocitov se ne zmanjša sorazmerno s časom izpostavitve pomanjkanju kisika in hranil, ampak se poveča. Prav tako se poveča količina privzetega in sproščenega histamina, če so bili astrociti izpostavljeni višji koncentraciji histamina. Vzrok so poškodbe celične membrane, ki se večajo s trajanjem izpostavitve stresnim pogojem.

## Literatura

1. Kandel E, Schwartz Jessell T. Principles of Neural Sciences. New York: McGraw Hill; 2000: 77-316.
2. Perdan K, Lipnik-Štangelj M, Kržan M. The Impact of Astrocytes in the Clearance of Neurotransmitters by Uptake and Inaktivation. V: Ottova- Leitmannova A (ur.) *Advances in planar lipid bilayers and liposomes. Vol. 9*, Amsterdam [etc.]: Elsevier: Academic Press, 2009, str. 211-35.
3. Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. The Biochemical Basis of Neuropharmacology. New York-Oxford: Oxford University Press; 1996. 82-103.
4. Deutch AY, Roth RH. Neurotransmitters. In: Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR, editors. *Fundamental Neuroscience*. San Diego: Academic Press; 1999. 193-234.
5. Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC. Serotonin, acetylcholine, and histamine. In: Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC, editors. *Molecular Neuropharmacology, a foundation for clinical neuroscience*. New York: McGraw-Hill; 2001. 191-211.
6. Multimedia Neuroscience Education Project, Williams College. <http://web.williams.edu/imput/I.html>, 28.2.2011.
7. Koepsell H. Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 375-81.
8. Gether U, Andersen PH, Larsson OM, Schousboe A. Neurotransmitter transporters: molecular function of important drug targets. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27: 375-83.
9. You G, Morris ME, Wang B. Drug transporters. *Molecular Characterization and Role in Drug Disposition*, letnica. 1-33, 411-470.
10. Lee G, Dallas S, Hog M, Bendayan R. Drug Transporters in the Central Nervous System: Brain Barriers and Brain Parenchyma Considerations. *Pharmacological Reviews* December 1, 2001 vol. 53 no. 4: 569-596.
11. Perdan-Pirkmajer K, Pirkmajer S, Grubič Z, Kržan M. The expression of organic cation transporter mRNA in cultured adult and neonatal rat astrocytes and their possible functional role. *Predstavitev postra na "WorldPharma2010 (16th IUPHAR WorldCongress of Basis and Clinical Pharmacology) Bridging Basic and Clical Pharmacology"*, Copenhagen 17-23 July 2010. Kopenhagen: Danish Society for Pharmacology, 20.07.2010.

12. 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.
13. Perdan- Pirkmajer K., Mavri J., Kržan M. Histamine reuptake by astrocytes: an experimental and computational study. *J Mol Mod* 2010; 16:1151-8.
14. Passani MB, Lin JS, Hancock A, Crochet S, Blandina P. The histamine H3 receptor as a novel therapeutic target for cognitive and sleep disorders. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25(12): 618-25.
15. Nguyen T, Shapiro DA, George SR, Setola V, Lee DK, Cheng R, Rauser L, Lee SP, Lynch KR, Roth BL, O'Dowd BF. Discovery of a novel member of the histamine receptor family. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 427-33.
16. Connelly WM, Shenton FC, Lethbridge N, Leurs R, Waldvogel HJ, Faull RL, Lees G, Chazot PL. The histamine H4 receptor is functionally expressed on neurons in the mammalian CNS. *Br J Pharmacol* 2009; 157(1):55-63.
17. 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.
18. Ogasawara M, Yamauchi K, Satoh Y, Yamaji R, Inui K. 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.
19. Kržan M. Funkcija astrocitov. *Zdr Vest* 2001; 70:553-9.
20. Kucheryavykh LY, Kucheryavykh YV, Inyushin M, Shuba YM, Sanabria P, Cubano LA, Skatchkov SN, Eaton MJ. Ischemia Increases TREK-2 Channel Expression in Astrocytes: Relevance to Glutamate Clearance. *Open Neurosci J.* 2009 Jan 1;3:40-47.
21. Zorec R. Možganska kap. V: Ribarič S (ur) Izbrana poglavja iz patološke fiziologije 2001; 298-304.
22. Schwartz JP, Wilson DJ. Preparation and characterization of type 1 astrocytes cultured from adult rat cortex, cerebellum, and striatum. *Glia* 1992; 5(1):75-80.
23. Grewer C, Gameiro A, Zhang Z, Tao Z, Braams S, Rauert T. Glutamate forward and reverse transport: from molecular mechanism to transporter-mediated release after ischemia. *IUBMB Life* 2008 Sep;60(9):609-19.

24. Rafalowska U, Waskiewicz J, Albrecht J. Is neurotransmitter histamine predominantly inactivated in astrocytes? *Neurosci Lett* 1987;80:106-10.
25. Sukurai E, Oreland L, Nisiyama S, Kato M, Watanabe T, Yanai K. Evidence for the presence of histamine uptake into the synaptosomes of rat brain. *Pharmacology* 2006; 78(2): 72-80.
26. Osredkar D, Burnik-Papler T, Pecaver B, Kralj-Iglic V, Krzan M. Kinetic and pharmacological properties of [<sup>3</sup>H]-histamine transport into cultured type 1 astrocytes from neonatal rats. *Inflamm Res* 2009 Feb;58(2):94-102.
27. Gabarg M, Baudry M, Benda P, Schwartz JC. Simultaneous presence of histamine-N-methyltransferase and catechol-O-methyltransferase in neuronal and glial cells in culture. *Brain Res* 1975 Jan 17;83(3):538-41.