

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MINA KOVAČEVIČ

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, september 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MINA KOVAČEVIČ

LASTNOSTI OD NATRIJEVIH IONOV NEODVISNEGA  
TRANSPORTA HISTAMINA V ASTROCITE NOVOROJENE  
PODGANE  
PROPERTIES OF A SODIUM IONS INDEPENDENT  
HISTAMINE TRANSPORT IN NEONATAL RAT  
ASTROCYTES

Ljubljana, 2012

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.

Spektroskopske meritve, elementne analize, mikroskopijo in druga merjenja sem opravila s pomočjo tehnične sodelavke Jožice Košir.

## **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Mojci Kržan za vso spodbudo, strokovne nasvete, pomoč in potrpežljivost pri izdelavi diplomske naloge. Prav tako se iskreno zahvaljujem tehnični sodelavki Jožici Košir, ki me je uvedla v eksperimentalno delo ter mi pomagala pri izvedbi vseh poskusov. Hvala ji za vso prijaznost!

Zahvaljujem se tudi mojima sončkoma Ianu Matiji in Matiji, ki sta mi vlivala pozitivno energijo takrat, ko sem jo najbolj potrebovala. Hvala mojim zlatim staršem, starim staršem, bratu in vsem prijateljem za vso podporo na moji poti.

Hvala tudi kolegu in prijatelju Sašu Kovačiču za vso pomoč in potrpežljivost pri uporabi računalnika.

## **Izjava**

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

Mina Kovačević

# VSEBINA

KAZALO SLIK.....	4
KAZALO PREGLEDNIC.....	4
POVZETEK .....	5
ABSTRACT .....	6
SEZNAM OKRAJŠAV .....	7
1. UVOD.....	8
1.1. Histamin .....	8
1.2. Histamin v osrednjem živčevju (OŽ) .....	8
1.2.1. Mastociti .....	9
1.2.2. Histaminergični nevroni .....	9
1.2.3. Funkcije osrednjega histaminergičnega sistema.....	10
1.3. Vloga histamina v sinapsi.....	11
1.3.1. Biosinteza histamina.....	11
1.3.2. Privzem histamina .....	12
1.3.3. Inaktivacija histamina.....	13
1.3.4. Histaminski receptorji v možganih.....	15
1.4. Astrociti .....	16
1.4.1. Funkcije astrocitov .....	18
2. NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE.....	20
2.1. Namen dela .....	20
2.2. Delovne hipoteze .....	20
3. OPREMA IN MATERIALI .....	21
3.1. Oprema .....	21
3.2. Materiali .....	21
4. METODE .....	23

4.1. Priprava celičnih kultur .....	23
4.2. Privzem histamina v celične kulture astrocitov (koncentracijska odvisnost).....	24
4.3. Inhibicija privzema histamina v astrocite novorojene podgane .....	25
4.4. Vpliv tMH na sproščanje histamina iz astrocitov.....	25
4.5. Določanje količine proteinov (metoda po Bradfordu).....	26
4.6. Statistične metode.....	26
5. REZULTATI .....	27
5.1. Od koncentracije odvisen celokupni privzem histamina v astrocite novorojene podgane.....	27
5.2. Kinetika celokupnega privzema histamina v astrocite novorojene podgane.....	29
5.3. Inhibicija privzema histamina v astrocite novorojene podgane .....	29
5.4. Vpliv tMH na privzem in sproščanje histamina v (iz) astrocite novorojene podgane .....	31
6. RAZPRAVA.....	32
7. SKLEP .....	36
8. LITERATURA .....	37

## KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura histamina. ....	8
Slika 2: Shema histaminergičnega sistema v možganih.....	9
Slika 3: Nastanek histamina z dekarboskilacijo histidina .....	11
Slika 4: Prikaz zgradbe sinapse .....	12
Slika 5: Glavne metabolne poti histamina.....	14
Slika 6: Izoliran astrocit obarvan z imunokemičnimi barvili in prikazan s pomočjo konfokalne mikroskopije.....	17
Slika 7: Od koncentracije histamina odvisen privzem radioaktivno označenega histamina v astrocite novorojene podgane, v mediju brez Na <sup>+</sup> in pri 37 °C.....	27
Slika 8: Od koncentracije odvisen celokupni privzem histamina v astrocite novorojene podgane v mediju, ki vsebuje Na <sup>+</sup> ter v mediju brez Na <sup>+</sup> in pri 37 °C.....	28
Slika 9: Hitrost privzema histamina v astrocite novorojene podgane .....	29
Slika 10: Vpliv kortikosterona, estradiola in decinija-22, na privzem histamina v astrocite novorojene podgane.....	30
Slika 11: Vpliv tMH na privzem in sproščanje histamina v (iz) astrocite novorojene podgane.....	31

## KAZALO PREGLEDNIC

Tabela 1: Pregled histaminskih receptorjev.....	16
Tabela 2: Seznam opreme.....	21

## POVZETEK

Histamin ni le mediator vnetja, ampak tudi prenašalec v osrednjem živčnem sistemu. Vsak prenašalec se mora po sprostitvi v sinaptični prostor inaktivirati. Inaktivacija vključuje: difuzijo v zunajcelični prostor, encimsko razgradnjo, ponovni privzem v živčne in privzem v glijalne celice, predvsem v astrocite.

Histamin se preko celične membrane astrocitov privzema na dva načina: z aktivnim transportom in elektrodifuzijo. Aktivni transport je močno odvisen od gradienta  $\text{Na}^+$  ionov in prisotnosti molekul ATP (adenozin trifosfat), medtem ko je elektrodifuzija odvisna zgolj od elektrokemijskega gradienta, naboja molekule in prepustnosti membrane.

V diplomskem delu smo se posvetili proučevanju od natrijevih ionov neodvisnega transporta histamina v primarne kulture astrocitov novorojene podgane. Z uporabo radioaktivno označenega histamina smo določili kinetične lastnosti privzema histamina v mediju, ki ni vseboval natrijevih ionov. V nadaljnjih poskusih smo proučevali vpliv estradiola, kortikosterona in decinija-22 ter tele-metilhistamina na privzem histamina v astrocite. Rezultate smo normalizirali na mg proteinov ter jih predstavili kot srednjo vrednost  $\pm$  standardno napako aritmetične sredine. Za računanje statističnih razlik smo uporabili Studentov t-test za neodvisne vzorce.

Histamin se je v odsotnosti  $\text{Na}^+$  ionov prenašal v astrocite sorazmerno s koncentracijo histamina, kateri so bili astrociti izpostavljeni. Prenos je bil saturabilen in skladen s kinetiko po Michaelisu in Mentenovi; vrednost Michaelis-Mentenove konstante ( $K_m$ ) je znašala  $30,9 \pm 0,9 \mu\text{mol}$ ; maksimalna hitrost privzema ( $V_{\text{max}}$ ) pa  $3,3 \pm 0,05 \text{ pmol/mg proteinov/minuto}$ . V prenos histamina, ki je od natrijevih ionov neodvisen, je vključen prenašalec. Na privzem histamina niso vplivali niti inhibitorji transporterjev za organske katione (kortikosteron, estradiol in decinij-22) niti metabolit histamina tMH.

Zaključimo lahko, da v astrocitih novorojene podgane obstaja od natrijevih ionov neodvisen transport histamina, ki poteka prek prenašalca, vendar ne prek transporterja za organske katione.

## ABSTRACT

Histamine is not only a mediator of inflammation in central nervous system it also acts as a neurotransmitter. After being released into synaptic cleft, every neurotransmitter needs to be inactivated shortly afterwards. Inactivation of neurotransmitter includes the following processes: diffusion into extracellular space, enzymatic metabolism and histamine uptake into glia and re-uptake into neuronal cells, especially astrocytes.

Histamine has two different uptake pathways: active transport is ATP-driven process, while the electrodiffusion depends only on electrochemical gradient and molecule charge. In this graduation thesis we wanted to study in details of sodium ions independent transport of histamine into cultured neonatal rat astrocytes. At first we elucidated the effect of sodium deprivation on the quantity of radiolabelled histamine taken up into neonatal rat astrocytes. We also determined kinetic properties of this process ( $K_m$  and  $V_{max}$  values). Further on, we also investigated the effect of some OTC substrate/inhibitors (corticosterone, estradiol and decinium-22) on histamine uptake into neonatal rat astrocytes. In the last part of our thesis we studied the effect of histamine metabolite on passage of histamine through the membrane of astrocytes. The results normalized per mg of protein are presented as arithmetic mean  $\pm$  standard error of the mean. Student independent sample t-test was used to calculate statistical significance.

In the absence of sodium ions histamine was transported into cultured astrocytes in a concentration-dependent saturable manner and follows Michaelis-Menten kinetics. The kinetic parameters were calculated as Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) is  $30,9 \pm 0,9 \mu\text{mol}$ ; uptake rate ( $V_{max}$ ) is  $3,3 \pm 0,05 \text{ pmol/mg protein/min}$ . So, sodium-independent histamine uptake involves a transporter. Neither OCT inhibitors corticosterone, estradiol or decinium-22 nor histamine metabolite tele-methylhistamine did not affect histamine uptake into cultured neonatal rat astrocytes in the absence of sodium.

Taken together, in the absence of sodium ions histamine is carried into cultured rat astrocytes, not via organic cation transporter, respectively.



## SEZNAM OKRAJŠAV

ACTH – adenokortikotropni hormon

ATP – adenzin trifosfat

ADO – alhid-oksida

ALDH – alhid-dehidrogena

DAO – diamin-oksida

DMEM – po Dulbecu spremenjen Eaglov medij (angl. Dulbecco's modified Eagle's medium)

EDTA – etilendiamintetraoetna kislina

FBS – goveji fetalni serum (angl. Fetal Bovine Serum)

GFAP – glialna fibrilarna kislina beljakovina (angl. Glial Fibrillary Acidic Protein)

GIT – gastrointestinalni trakt

HDC – histidin-dekarboksilaza (angl. Histidine Decarboxylase)

HEB – hematoencefalna bariera

HNMT – histamin-N-metiltransferaza

MAO – monoamino-oksida

NT – nevrotansmitor

OCT – organski kationski transporter (angl. Organic Cation Transporter)

OŽ – srednje živčevje

PLP – piridoksal fosfat (angl. Pyridoxal Phosphate)

PMAT – plazemski membranski transporter za monoamine (angl. Plasma Membrane Monoamine Transporter)

PRT – fosforibozil-transferaza (angl. Phosphoribosyltransferase)

VMAT – vezikularni monoaminski transporter

tMH – tele-metilhistamin

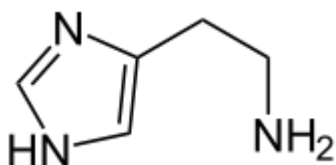
XO – ksantinska-oksida (angl. Xanthine Oxidase)

# 1. UVOD

## 1.1. Histamin

Histamin je mediator v številnih fizioloških in patoloških procesih. Nahaja se v skoraj vseh telesnih tkivih. V možganih ima vlogo nevrotansmitorja in nevromodulatorja, zunaj možganov pa učinkuje predvsem kot lokalni hormon in vnetni mediator.

Kemijsko ime za histamin je [2-(imidazol-4-il) etilamin]. Nastane z dekarboksilacijo aminokislina histidina, v večjih koncentracijah se skladišči predvsem v mastocitih in krvnih bazofilcih. Ko se sprosti, se specifično veže na histaminske receptorje in v telesu povzroči številne učinke. Poznamo štiri podtipreceptorjev za histamin, od H<sub>1</sub> do H<sub>4</sub>.



**Slika 1:** Struktura histamina.

Histamin stimulira kontrakcijo gladkih mišic uterusa, gastrointestinalnega trakta (GIT) in bronhijev, povzroča dilatacijo krvnih žil in posledično padec krvnega tlaka, stimulira izločanje želodčne kisline, pospešuje srčni utrip in poveča moč delovanja srca. Sodeluje pri vnetnih reakcijah in kot mediator učinkuje pri alergijskih reakcijah. V osrednjem živčevju ima vlogo nevrotansmitorja (NT) (1, 2, 3, 4).

## 1.2. Histamin v osrednjem živčevju (OŽ)

Histamin je prenašalec v osrednjem živčevju vretenčarjev in nevretenčarjev. Najvišje koncentracije najdemo v hipotalamusu, možganskem področju, ki je odgovorno za nadzor sproščanja hormonov.

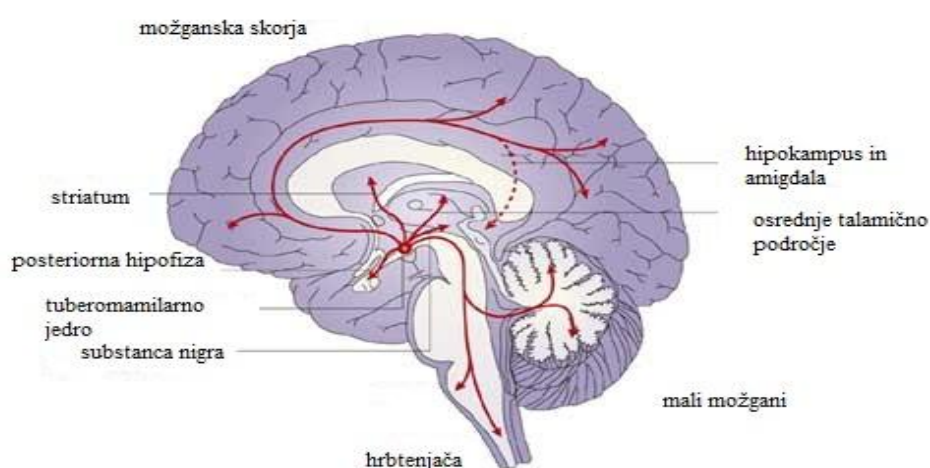
Histamin v osrednjem živčevju najdemo v več vrstah celic, največ pa ga je v histaminergičnih nevronih in mastocitih (5).

### 1.2.1. Mastociti

Mastociti so intersticijske celice, ki se nahajajo predvsem v vezivu in sluznicah večine telesnih tkiv. V možganih mastociti prevladujejo v talamusu in hipotalamusu, najdemo jih tudi v meningah. Čeprav natančna vloga mastocitov v možganih še ni popolnoma raziskana, obstajajo hipoteze o tem, da naj bi regulirali pretok krvi ter permeabilnost žil ter prispevali k imunskemu odzivu v možganih. Prav tako pa naj bi bili udeleženi pri razvoju nekaterih avtoimunih (multipla skleroza) in nevrodegenerativnih boleznih (Alzheimerjeva bolezen in Wernick-ova encefalopatija) (1).

### 1.2.2. Histaminergični nevroni

Histaminergični nevroni izvirajo iz tuberomamilarnega jedra posteriornega hipotalamusa in so sestavljeni predvsem iz magnocelularnih nevronov, ki so večinoma dolgi, divergentni in nemielizirani. Histaminergični nevroni se projicirajo v skoraj vse možganske regije, najbolj izrazite pa so te projekcije v limbični del možganov. Teh nevronov je v podganah približno 2.000, pri človeku pa okoli 64.000 (6).



**Slika 2:** Shema histaminergičnega sistema v možganih (povzeto po 11).

Histaminergični nevroni imajo podobne morfološke lastnosti kot drugi monoaminergični nevroni. Aktivnost histaminergičnih nevronov v času spontane vzdraženosti znaša okoli 2 Hz. V stanju budnosti in pozornosti sproščajo histamin v večjih količinah, v stanju počasnih valov pa se količina sproščenega histamina močno zmanjša, kar kaže na veliko povezavo histamina z ritmom budnost/spanje (1).

### **1.2.3. Funkcije osrednjega histaminergičnega sistema**

Histamin naj bi vplival na aktivnost celotnih možganov. Njegova najbolj raziskana funkcija je prav gotovo regulacija cirkadianega cikla budnost/spanje; uničenje histaminergičnih nevronov privede do podaljšanja spanja, saj so histaminergični nevroni aktivni v budnem stanju, med spanjem pa ne. Podoben učinek dosežemo tudi z uživanjem predstavnikov prve generacije antagonistov histaminskih receptorjev H<sub>1</sub> (8).

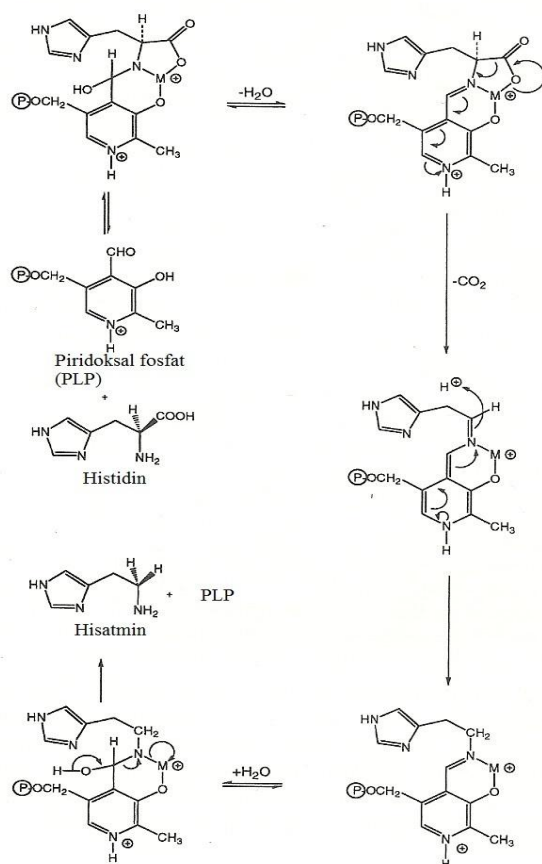
Histamin je močan regulator mnogih funkcij hipotalamusa, histaminergični nevroni uravnavajo sproščanje oksitocina, prolaktina, adenokortikotropnega hormona (ACTH),  $\beta$ -endorfina, vazopresina in kortikotropin sproščujočega hormona. Prav tako je modulator vnosa hrane, vode in termoregulacije, vpliva pa tudi na metabolizem glukoze ter lipidov in je regulator krvnega tlaka. Sodeloval naj bi v procesu pomnjenja in učenja, predvsem preko neposrednih učinkov na možgansko skorjo, hipokampus in amigdalo ter posrednih učinkov na holinergične in monoaminske nevrone (8, 9).

Osrednji histaminergični sistem naj bi bil vključen še v številne druge funkcije v OŽ: vzburjenje, tesnobo, aktivacijo simpatika, s stresom povezano sproščanje hormonov iz hipofize in ostalih centralnihaminskih prenašalcev ter v manjše odzivanje na bolečinske dražljaje. Večje količine histamina se sproščajo tudi med hipoglikemijo, dehidracijo in takrat, kadar je telo izpostavljeno drugim stresorjem. Predvidevajo torej, da je vloga osrednjega histaminergičnega sistema tudi odziv na nevarnost (10).

### 1.3. Vloga histamina v sinapsi

#### 1.3.1. Biosinteza histamina

Ker je histamin pri fiziološki vrednosti pH nabita polarna molekula, zelo slabo prehaja iz krvi v možgane. Večina histamina v možganih nastane *in situ* iz histidina. Aminokislina histidin prehaja v možgane z aktivnim transportom, od njegove biološke uporabnosti je odvisna sinteza histamina, ki poteka v možganih.



**Slika 3:** Nastanek histamina z dekarboksilacijo histidina (povzeto po 10).

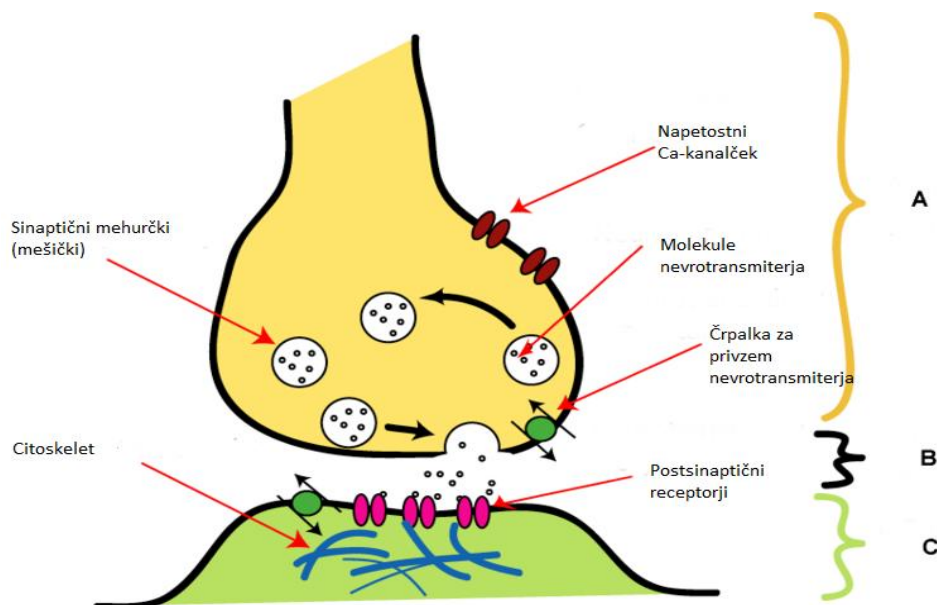
Decarboksilacijo histidina v razmerah *in vitro* katalizirata dva encima: L-histidin-dekarboksilaza (HDC) in specifična histidin-dekarboksilaza. Dokazali so, da je za sintezo histamina v možganih ključna aktivnost encima HDC (10).

Aktivnost HDC je največja v hipotalamusu, kjer se nahajajo histaminergični nevroni. Proces sinteze histamina je kataliziran s HDC, kot kofaktor sodeluje piridoksal-fosfat (PLP). Mehanizem te reakcije verjetno vključuje formacijo Schiffove baze (imina) kot intermediata, čemur sledi odcep  $\text{CO}_2$ . Takšen mehanizem je značilen za mnoge  $\alpha$ -aminokisliline. PLP ima v reakciji pomembno katalitično funkcijo, v zadnjem koraku pa poteče hidroliza encimskega kompleksa histamin – Schiffova baza (12).

Sintetiziran histamin se v histaminergičnem nevronu najprej privzame v sinaptične vezikle preko vezikularnega monoaminskega transporterja 2 (VMAT2). Sproščen je v sinaptično špranjo ob depolarizaciji, temu pa v relativno kratkem času sledi njegova odstranitev (1).

### 1.3.2. Privzem histamina

Histamin se pri fiziološkem pH pojavlja v polarni in/ali protonirani obliki, zato mora biti prenesen čez membrano s pomočjo “nosača”, čeprav njegovega specifičnega transporterja še niso odkrili (15).



**Slika 4:** Prikaz zgradbe sinapse; A – živčni končič presinaptične celice (nevrona), B – sinaptična reža, C – postsinaptična celica.

Poročila iz laboratorijev Zsuzanne Huszti in Mojce Kržan opisujejo privzem histamina v celice glije, ki so bile pripravljene iz piščančjih zarodkov in novorojenih ter odraslih

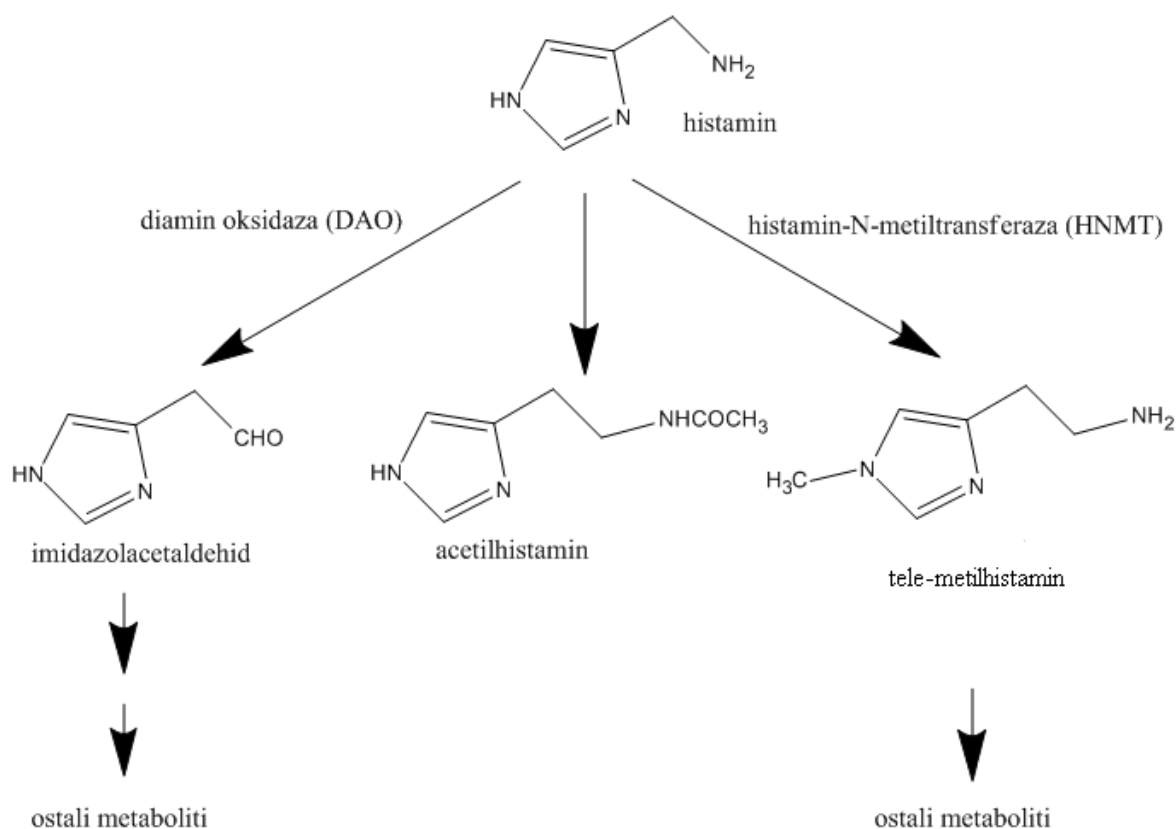
podgan. Transport histamina je potekal v dveh smereh in je bil odvisen od prisotnosti  $\text{Na}^+$  ionov, a neodvisen od  $\text{Cl}^-$  ionov (13, 14, 15).

Stuart in sodelavci (28) so opisali od  $\text{Na}^+$  odvisen privzem histamina v fotoreceptorje in okoliške glija celice členonožcev, ki uporabljajo histamin kot NT. Zanimivo je, da se je histamin privzemal v fotoreceptorje samo, kadar so bili ti izpostavljeni svetlobi, torej depolarizirani, v temi pa so histamin privzele celice glije.

Nedavno je Yanai s skupino poročal o visoko in nizko afinitetnem od  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  in  $\text{HCO}_3^-$  odvisnem transportu histamina v sinaptosome podganjih možganov (28). Prav tako so poročali o organskih kationskih transporterjih (OCT) – OCT 1, OCT 2 in OCT 3, ki so se izražali v kulturah iz kortikalnih astrocitov neonatalnih podgan, vendar OCT 2 in OCT 3 posredujeta pri nizkoafinitetnem, neselektivnem privzemu histamina, ki ni odvisen od prisotnosti  $\text{Na}^+$  in  $\text{Cl}^-$  ionov (13, 15).

### **1.3.3. Inaktivacija histamina**

Ko je histamin sproščen, se v razmerah *in vivo* zelo hitro metabolizira (dokazano s pomočjo radioaktivno označenega histamina, danega intradermalno) do neaktivnih metabolitov. Razgradnja histamina poteka po dveh glavnih poteh: N-metiliranje in oksidacija. Histamin se mora, da se lahko encimsko reciklira ali odstrani, privzeti v presinaptične nevrone ali v okoliške celice glije. Slednje predstavljajo glavno mesto za njegovo inaktivacijo v možganih (24, 12, 13).



**Slika 5:** Glavne metabolne poti histamina (povzeto po 10).

Glavni encim, ki je odgovoren za metabolizem histamina v možganih, je histamin-N-metiltransferaza (HNMT), tako da dobimo tele-metilhistamin (tMH). tMH je nato podvržen oksidativni deaminaciji z diamin-oksido (DAO) ali z monoamin-oksido (MAO). Načeloma ima večjo afiniteto do DAO, vendar pa je v možganih, kjer primankuje DAO, tMH primarno metiliran z MAO tipa B.

Histamin se z DAO oksidira do imidazolacetaldehida in nato do imidazol očetne kisline. Ker možgani sesalcev težje oksidirajo histamin, ga skoraj kvantitativno metilirajo.

Neaktivne metabolite dobimo z metilacijo S-adenozinmetionina, to reakcijo pa katalizira intracelularni HNMT. Majhen delež imidazol očetne kisline pa se pretvori v ustrezen ribonukleozid, ki predstavlja zelo nenavaden metabolit (10, 12, 13).



#### **1.3.4. Histaminski receptorji v možganih**

Do sedaj so bili odkriti štiri receptorji za histamin, poimenovani po vrstnem redu, kot so jih odkrili: od H<sub>1</sub> do H<sub>4</sub>. Vsi spadajo v naddružino receptorjev s sedmimi transmembranskimi domenami, sklopljeni pa so z na gvanilnukleotid občutljivimi protein G. Različni receptorji se sicer izražajo v različnih celicah, kjer delujejo preko različnih intracelularnih signalnih mehanizmov (10, 17). Tipe histaminskih receptorjev v možganih opisuje preglednica I.

**Tabela 1:** Podtipi histaminskih receptorjev (10, 17, 18, 19, 25, 26).

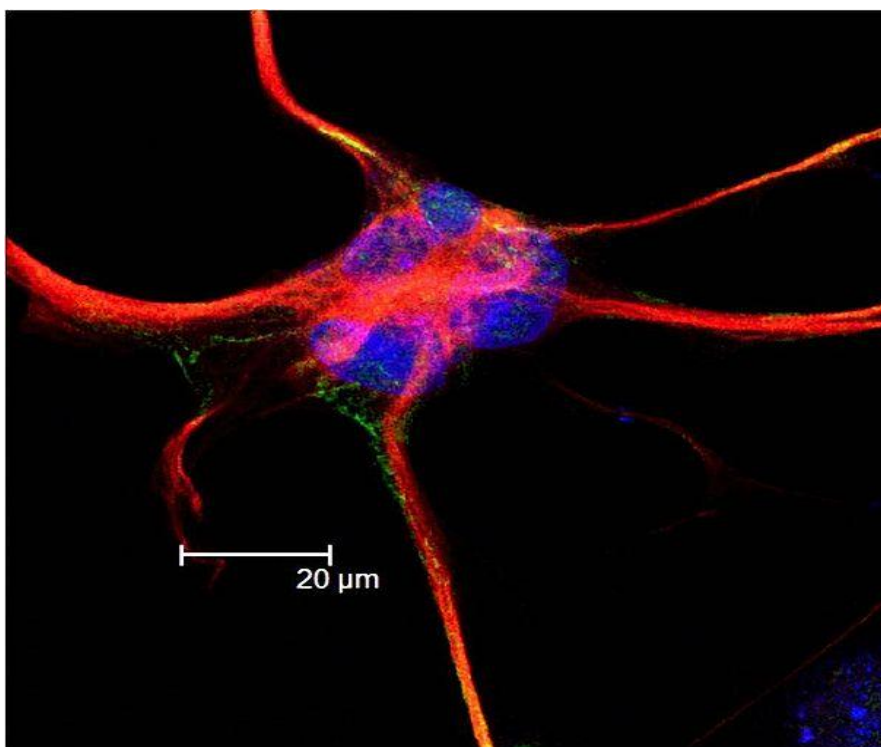
tip receptorja	signalni mehanizem	lokacija v možganih	učinek v možganih	učinek drugje v organizmu
H <sub>1</sub>	postsinaptično, IP <sub>3</sub>	hipotalamus, limbični sistem	sproščanje hormonov, glikogenoliza v možganih	alergije in vnetne bolezni, kontrakcija gladkih mišic, povečana permeabilnost kapilar, s kontrakcijo terminalnih venul
H <sub>2</sub>	postsinaptično, cAMP	hipokampus, amigdala, bazalni gangliji	zaviranje delovanja živčnih celic med hiperpolarizacijo	relaksacija gladkih mišic, sekrecija želodčne kisline, pozitivni ionotropni in kronotropni učinki na srčno mišico, zaviralni učinki na imunski sistem
H <sub>3</sub>	presinaptično, cAMP	bazalni gangliji, striatum, možganska skorja, nucleus accumbens	zaviranje sproščanja drugih monoaminov in peptidov iz presinaptičnih nevronov	zaviranje sproščanja drugih monoaminov in peptidov iz perifernih tkiv
H <sub>4</sub>	presinaptično, cAMP	možganska skorja, hipokampus, thalamus	hiperpolarizacija nevronov	regulacija imunskega sistema

#### 1.4. Astrociti

Astrociti so ena od vrst nevroglije, ime pa so dobili po svoji zvezdasti obliki (gr. astron=zvezda, kytos=celica). Pri sesalcih v OŽ so astrociti najštevilčnejše celice makroglije (po številu celo prekašajo nevrone; razmerje je 10:1), najdemo pa jih tudi v

hrbtenjači. Izločajo signalne molekule, ki jih imenujemo glijalni prenašalci oz. glijatrasmitorji (21, 22).

Astroцитi so poleg oligodendrocitov in mikroglije del makroglije v OŽ, njihova osnovna naloga pa je podpora nevronov v živčni komunikaciji. So, tako kot nevroni, ektodermalnega izvora, vendar niso vzdražni. Prav tako so edine celice, ki imajo glijalno fibrilarno kislno beljakovino (GFAP), in so del citoskeletnega sistema, ki služi kot nenadomestljiv označevalec teh celic v razmerah *in vivo* ter *in vitro* (21, 23).



**Slika 6:** Izoliran astroцит obarvan z imunokemičnimi barvili in prikazan s pomočjo konfokalne mikroskopije.

Astroцитi tvorijo številne presledkovne stike (angl. gap-junctions), ki omogočajo medcelično komunikacijo tako z drugimi astroцитi kot z nevroni, predvsem z uporabo kalcijevih tokov. Imajo edinstveno lastnost, da lahko v skladu s spremembami v neposrednem okolju spreminjajo svojo obliko in funkcijo, zato imajo popolnoma različne vloge v različnih življenjskih obdobjih. Posebej se razlikujeta njihovi oblika in funkcija v obdobju med razvojem, v odraslem obdobju in v času po poškodbi osrednjega živčevja (21, 23).

V OŽ poznamo tri tipe astrocitov: fibrilarne, protoplazmatske in radialne. Fibrilarni tip navadno najdemo v beli možganovini, protoplazmatski astrociti pa se nahajajo v sivi možganovini in imajo večje število organelov. Radialne glija celice so večinoma prisotne med razvojem, imajo pa pomembno vlogo pri migraciji nevronov (21).

#### 1.4.1. Funkcije astrocitov

Do nedavnega se je medicinska veda ukvarjala zgolj z nevroni, astrociti so predstavljali neke vrste »možgansko lepilo«. Funkcije astrocitov so nato ponovno preučili in ugotovili, da imajo številne pomembne lastnosti, kar vključuje izločanje in privzem NT ter vzdrževanje krvno-možganske pregrade. Razvit je bil tudi koncept tripartitne sinapse, ki predstavlja tesno povezanost na ravni sinapse med pre- in postsinaptičnimi živčnimi celicami ter celicami glije.

- **Funkcije v razvojnem obdobju:** Astroglija je glavni vir molekul zunajceličnega matriksa in adhezijskih molekul (živnocelične adhezijske molekule, laminina, fibronektina, taktina, molekul družine J-1 – tenascina in janusina), ki oblikujejo pot rastočim nevronom ter pomagajo pri nastanku živčnih jeder, živčnih poti in stikov med posameznimi živčnimi celicami. Njena pomembna naloga je tudi proizvodnja nevrotrofičnih dejavnikov med razvojem in regeneracijo. Najnovejši izsledki pa dokazujejo, da glija vodi in usmerja rastoče živčne celice, pa tudi aktivno sodeluje pri tvorbi in vzdrževanju sinaptičnih stikov.
- **Presnovna podpora:** Astrociti oskrbujejo nevrone s hranili, kot je na primer glukoza.
- **Krvno – možganska pregrada:** Dolgo časa so menili, da astrociti tvorijo krvno-možgansko pregrado. Ta trditev drži le za nižje organizme, za višje pa le deloma. Pri višjih organizmih tvorijo krvno-možgansko pregrado endotelijske celice, astrociti in periciti. Astrociti so odgovorni za ustvarjanje in vzdrževanje tesnih stikov med endotelijskimi celicami.
- **Nevrotransmitorji:** Astrociti izražajo številne membranske transporterje, kot so transporterji za glutamat, aspartat, glicin, GABA in biogene amine. Kljub temu da še niso identificirali posebnega transporterja, astrociti privzemajo histamin in

vsebujejo encime za njegovo razgradnjo. Na ta način astrociti intenzivno sodelujejo pri inaktivaciji različnih nevrotansmitorjev.

- **Regulacija koncentracije ionov v zunajceličnem prostoru:** Membrane astrocitov v veliki meri izražajo ionske kanalčke za  $K^+$  ter druge ione ( $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ ). Ko so nevroni aktivirani, sprostijo kalij in tako se poveča njegova koncentracija zunaj celice. Ker so astrociti močno prepustni za kalij, zelo hitro očistijo presežek le-tega zunaj celice, s čimer ščitijo nevrone pred stalno depolarizacijo.
- **Skladiščenje glikogena:** Glikogen je edina energetska rezerva v osrednjem živčevju, vendar ga je tu približno desetkrat manj kot v skeletnih mišicah oz. stokrat manj kot v jetrih. Astrocitni glikogen nastaja iz glukoze, ki jo neposredno iz možganskih žil privzamejo perivaskularni astrociti. Zaloge zadostujejo za pokrivanje izgub med fiziološkimi aktivnostmi.
- **Funkcije v patoloških procesih:** Škodljivi dejavniki, ki prizadanejo osrednje živčevje, npr. virusne okužbe, mehanske poškodbe, degenerativni procesi in nekateri nevrotoksini, povzročijo, da se mirujoči astrociti spremenijo v reaktivne celice, ki aktivno posredujejo v procesu regeneracije osrednjega živčevja oz. pri brazgotinjenju, kadar pride do večje izgube živčnih celic. Največkrat brazgotina predstavlja oviro pri regeneraciji živčevja, včasih pa tudi pripomore k zdravljenju, saj astrociti tako kot mikroglia fagocitirajo ostanke uničenih celic, hkrati pa brazgotina ščiti prizadeto tkivo pred morebitnimi sekundarnimi poškodbami, npr. škodljivimi posledicami vnetja (21, 22, 23).

## **2. NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE**

### **2.1. Namen dela**

Histamin se v astrocite privzema na dva načina: z aktivnim transportom in olajšano difuzijo ali elektrodifuzijo. Za aktivni transport histamina v astrocite, ki poteka s prenašalcem, so potrebni gradient natrijevih ionov, ustrežna količina ATP molekul in ustrežna temperatura okolja (37 °C). Olajšana difuzija vključuje neselektiven prenašalec, odvisna je predvsem od koncentracijskega gradienta molekule, ki se prenaša prek membrane. Elektrodifuzija je prenašalni proces, ki poteka brez prenašalca, odvisen je od koncentracije molekule, ki se prenaša, in je obratno sorazmeren z nabojem molekule. Olajšana difuzija in elektrodifuzija lahko potekata v okolju brez Na<sup>+</sup> ionov in sta neodvisni od prisotnosti ATP molekul. V diplomskem delu smo želeli natančneje opredeliti od Na<sup>+</sup> neodvisen transport histamina v astrocite novorojene podgane.

### **2.2. Delovne hipoteze**

V diplomskem delu smo preverili naslednje delovne hipoteze:

1. Histamin se bo privzemal v astrocite v odsotnosti natrijevih ionov, vendar bo privzeta količina manjša od količine histamina privzetega v prisotnosti Na<sup>+</sup> ionov.
2. Kinetični parametri od Na<sup>+</sup> ionov neodvisnega privzema v astrocite novorojene podgane bodo značilni za privzem z nizko afiniteto in visoko kapaciteto.
3. Snovi, ki se prenašajo prek celične membrane prek OCT, bodo vplivale na od natrijevih ionov neodvisen privzem histamina v astrocite novorojene podgane.

### 3. OPREMA IN MATERIALI

#### 3.1. Oprema

<b>vrsta aparature</b>	<b>proizvajalec</b>
analitska tehtnica	Sartorius
pH meter MA 5735	Iskra
Inkubator	Binder Inc.
polavtomatska pipeta	Gilson, Inc.
polavtomatske pipete	Eppendorf
stresalnik Vibromix 10	Tehtnica <sup>®</sup>
stresalnik Vibromix 314 EVT	Tehtnica <sup>®</sup>
mikroskop Nikon eclipse TS100	Nikon <sup>®</sup>
MicroBeta <sup>®</sup> TriLux	PerkinElmer
elektronska pipeta HandyStep <sup>®</sup>	BrandTech <sup>®</sup> scientific, Inc.
zaščitna komora z laminarnim pretokom zraka LFVP 12	Iskra Pio d. o. o.

**Tabela 2:** Seznam opreme, ki smo jo uporabljali pri eksperimentalnem delu.

#### 3.2. Materiali

Materiali za pripravo kultur:

- L-15 Leibovitz, začetni medij za izolacijo celičnih kultur – Sigma, ZDA,
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), medij za gojenje celičnih kultur – Sigma, ZDA,
- L-glutamin – GIBCO, Velika Britanija,
- natrijev piruvat – GIBCO, Velika Britanija,
- gentamicin – GIBCO, Velika Britanija,
- tripsin – EDTA, 0,05 % (1x) – GIBCO, Velika Britanija,
- goveji fetalni serum (FBS) – Cambrex, Belgija.

Materiali za pripravo raztopin za privzem:

- pufer za privzem histamina:
  - NaCl – Merck, ZDA,
  - holin klorid – Sigma, ZDA,
  - KCl – Merck, ZDA,
  - glukoza – Merck, ZDA,
  - HEPES – Sigma, ZDA,
  - MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O – Sigma, ZDA,
  - CaCl<sub>2</sub> – Sigma, ZDA,
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Merck, ZDA,
- NaOH – Merck, ZDA;
- reagent za barvanje (Bio-Rad Protein Assay) – BIORAD, ZDA;
- scintilacijska tekočina Aquasol – NEN Chemicals, Nemčija.

Učinkovine:

- [<sup>3</sup>H] histamin (histaminijev dihidroklorid) – PerkinElmer, ZDA,
- histamin – Sigma, ZDA,
- kortikosteron – Fluka, ZDA,
- estradiol – Serva, Nemčija,
- decinij 22 – Sigma, ZDA,
- tMH – Sigma, ZDA.

Potrošni material:

- poskusne plošče (Test Plates 12), za gojenje tkivnih kultur – TPP, Švica,
- steklenice za gojenje celičnih kultur 500 mL – GIBCO, Velika Britanija,
- najlonska mreža Nitrex, 0,75 μm – Tetko, ZDA,
- epice s koničastim dnom, Eppendorf – Nemčija,
- epice z okroglim dnom, Eppendorf – Nemčija,
- nastavki za pipete – Eppendorf, Nemčija,
- mikrotitrne plošče za določanje proteinov – TPP, Švica.



## 4. METODE

### 4.1. Priprava celičnih kultur

Primarne celične kulture astrocitov smo pripravili iz 2 dni starih novorojenih podgan obeh spolov, seva Wistar po metodi Schwartzove in Wilsonove (26). Astrocite smo odvzeli iz možganske skorje. Vsi postopki na živalih so bili opravljeni v skladu z dovoljenjem Veterinarske uprave Republike Slovenije za izvajanje poskusov na živalih številka 34401-1/2010/8 in smernicami za delo s poskusnimi živalmi, ki jih je izdal Komite za zaščito živali Nacionalnih inštitutov za zdravje, Bethesda (Maryland), ZDA.

Celične kulture astrocitov smo pripravili po ustaljenem postopku. Podgane so bile dekapitirane z namenom odstranitve možganov, kar je opravila tehnična sodelavka, ki ima ustrezno dovoljenje za izvajanje poskusov na živalih. Odstranili smo možganske ovojnice (meninge), ker predstavljajo vir fibroblastov, ki v kulturi predstavljajo nečistoče. Od možganov smo ločili možgansko skorjo in jo zdrobili s pomočjo sterilnih pipet, od koder smo izolirali astrocite. Možganskim skorjam smo dodali 4 ml Leibovitz L-15 začetnega medija, vzorec pa smo centrifugirali 4 minute s 1200 obrati/minuto. Odlili smo supernatant ter celice ponovno suspendirali v 4 ml medija L-15. Ponovili smo tudi centrifugiranje. Nato smo po odlitju supernatanta tkivo mehansko zdrobili s pipeto ter z injekcijskimi iglami različnih svetlin (25, 22 in 20  $\mu\text{m}$ ). Tkivni homogenat smo spustili še skozi najlonsko mrežo (Nitex, debelina por 0,75  $\mu\text{m}$ ), jim ponovno dodali 4 ml medija L-15 in jih centrifugirali (4 minute, 1200 obratov/minuto). Take celične kulture smo prenesli v tri steklenice za gojenje kultur (površina za rast 75  $\text{cm}^2$ ). Tu smo dodali 14 ml medija za gojenje kultur Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), ki vsebuje še 10 % seruma iz fetusov govedu, 1 % piruvata in glutamata ter 0,0001 % antibiotika gentamicina. Celice smo nato gojili 6 dni v inkubatorju pri 37 °C v mešanici 5 %  $\text{CO}_2$  in 95 %  $\text{O}_2$  iz ozračja.

Po šestih dneh smo najprej zamenjali medij ter jih stresali preko noči pri 150 obratih/minuto, kar smo ponavljali tri dni zapored. Nato smo odlili DMEM medij in celicam dodali 4 ml raztopine tripsina in EDTA (medij je vseboval 0,05 % liofiliziranega tripsina in 0,53 mM EDTA•4  $\text{Na}^+$ ) ter jih postavili za 20 minut v inkubator, da so

odstopile. S strgalom smo jih še postrgali s stene, dodali 10 ml DMEM medija in jih prenesli v drugo posodo. Za en dan smo jih dali v inkubator, naslednji dan pa smo zamenjali medij, da smo odstranili medij, ki je vseboval tripsin. Pustili smo jih rasti približno 1 teden.

Po 1 tednu smo ponovili zgoraj opisani postopek, le da smo tokrat celice dali na 12 poskusnih plošč. Vsaka plošča je imela 12 luknjic, v vsako luknjico pa smo dodali približno 1 ml vzorca (celice združene s tripsin medijem, čemur smo dodali še DMEM medij). Celice smo nato pustili rasti 3 tedne, pri čemer smo medij zamenjali enkrat tedensko.

#### **4.2. Privzem histamina v celične kulture astrocitov (koncentracijska odvisnost)**

Z namenom pridobitve informacij o privzemu histamina v astrocite v mediju brez  $\text{Na}^+$  smo mediju za privzem namesto NaCl dodali holin klorid. Plošče smo najprej dvakrat sprali z 1 ml medija za privzem, ki je bil segret na  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Pri tej temperaturi namreč poteka celokupni privzem. Medij smo odlili, nato pa smo celicam dodali različne koncentracije histamina in radioaktivno označenega [ $^3\text{H}$ ] histamina (koncentracijski razpon od 0,008 do  $50\text{ }\mu\text{l}$ ) ter jih inkubirali 20 minut. Po dvajsetih minutah smo plošče postavili na led, saj pri temperaturi  $4\text{ }^\circ\text{C}$  prevladuje nespecifičen privzem, ter jih štirikrat sprali z ohlajenim pufrom brez dodanega  $\text{CaCl}_2$ . Celicam smo dodali  $300\text{ }\mu\text{l}$   $0,5\text{ N NaOH}$ , da so odstopile od podlage. Plošče smo prilepili na stresalnik in jih stresali 10 minut pri 200 obratih/minuto. Del vsakega vzorca ( $250\text{ }\mu\text{l}$ ) smo dali v epice z okroglim dnom in jim dodali scintilacijsko tekočino Aquasol. Tako pripravljene smo dali v MikroBeto TriLux, da bi določili količino privzetega histamina. Preostanek vsakega vzorca ( $50\text{ }\mu\text{l}$ ) smo dali v epice za določitev proteinov in vzorce shranili v zmrzovalniku na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Nato smo spremljali koncentracijsko odvisnost privzema ter vpliv odvzema  $\text{Na}^+$  na privzem histamina v astrocite novorojene podgane.

### **4.3. Inhibicija privzema histamina v astrocite novorojene podgane**

Poskus smo začeli tako, da smo plošče dvakrat sprali z 1 ml medija za privzem, segretim na 37 °C, ki mu je bil dodan holin klorid. Celicam smo poleg medija za privzem s holin kloridom dodali še kortikosteron, tMH, decinij (D22) in estradiol (koncentracijski razpon od  $10^{-8}$  do  $10^{-4}$  M) v različnih koncentracijah. Plošče smo inkubirali 20 minut, jim dodali radioaktivno označen [ $^3$ H] histamin ter jih inkubirali še 20 minut. Nato smo plošče postavili na led, da smo prekinili reakcije, in jih štirikrat sprali z ohlajenim puform brez  $\text{CaCl}_2$ . Po dodatku 300  $\mu\text{l}$  0,5 N NaOH smo plošče stresali na stresalniku 10 minut pri 200 obratih/minuto. V 250  $\mu\text{l}$  vzorca smo dodali Aquasol in s scintilacijskim števcem izmerili količino histamina, ki se je privzel v astrocite. Preostalem 50  $\mu\text{l}$  posameznega vzorca smo določili koncentracijo proteinov. Spremljali smo inhibicijsko odvisnost privzema ter odvzema  $\text{Na}^+$  na privzem histamina v astrocite.

### **4.4. Vpliv tMH na sproščanje histamina iz astrocitov**

Pri tem poskusu smo plošče dvakrat sprali z 1 ml puфра za privzem z dodanim kalcijem. Isti pufer za privzem smo celicam ponovno dodali in inkubirali 30 minut pri 37 °C. Nato smo dodali 100  $\mu\text{l}$  [ $^3$ H] histamina in inkubirali še 20 minut. Po zaključeni inkubaciji smo vzorce štirikrat sprali s puform sobne temperature brez kalcija. Ponovno smo vzorcem dodali 540  $\mu\text{l}$  puфра brez Ca in 60  $\mu\text{l}$  tMH različnih koncentracij ter inkubirali 15 minut. 500  $\mu\text{l}$  tekočine smo dali v epice, katerim smo dodali scintilacijsko tekočino z namenom ugotovitve količine sproščenega histamina. V posamezno luknjico smo ob stresanju dodali 300  $\mu\text{l}$  0,5 N NaOH. V 250  $\mu\text{l}$  vzorca smo dodali Aquasol in s scintilacijskim števcem izmerili količino privzetega histamina. Preostanek vsakega vzorca smo dali v epice za proteine in določili količino proteinov v vzorcu. Opazovali smo vpliv dodatka različnih koncentracij tMH na sproščanje histamina iz astrocitov novorojene podgane.

#### **4.5. Določanje količine proteinov (metoda po Bradfordu)**

Koncentracijo proteinov smo določali po Bradfordu z reagentom za barvanje (Bio-Rad protein assay). Na mikrotitrski plošče smo odpipetirali 8  $\mu$ l vzorca, mu dodali 152  $\mu$ l bidestilirane vode in 40  $\mu$ l reagenta za barvanje. Kot kontrolo smo uporabili albumin v različnih koncentracijah. Raztopine smo dobro premešali in jih pustili stati 30 minut pri sobni temperaturi in normalnem tlaku. Absorbanco smo merili spektrofotometrično pri valovni dolžini 595 nm.

#### **4.6. Statistične metode**

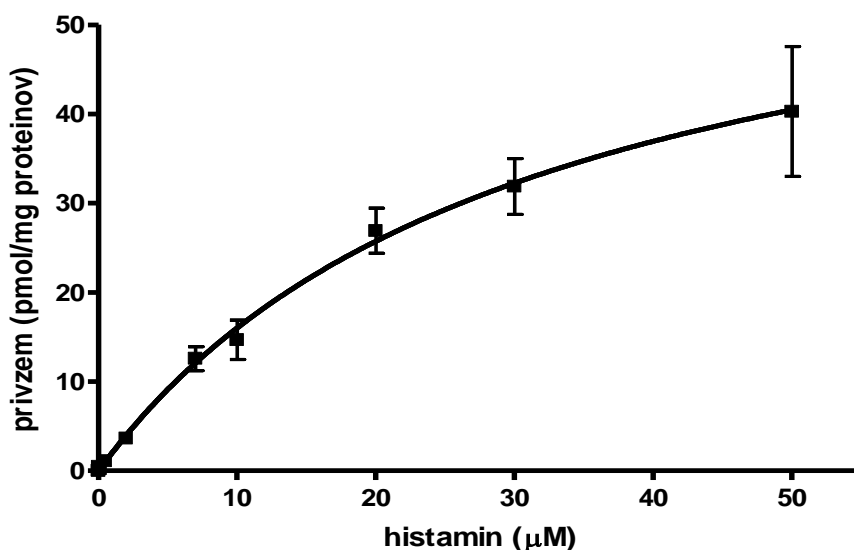
Vse meritve so rezultat dveh poskusov opravljenih v treh paralelkah. Rezultate smo prikazali kot aritmetično sredino  $\pm$  standardno napako aritmetične sredine. Statistično razliko med aritmetičnima sredinama dveh vzorcev smo računali s Studentovim t-testom. Statistično značilno razliko je predstavljala vrednost  $p < 0,05$ . Pri risanju grafov in statistiki smo uporabili program GraphPad Prism.

## 5. REZULTATI

V fizioloških razmerah se histamin v astrocite novorojene podgane privzema na dva načina: z aktivnim transportom in elektrodifuzijo ali olajšano difuzijo. V diplomskem delu smo najprej želeli izračunati kinetične parametre  $V_{max}$  (maksimalno hitrost) in  $K_m$  (Mihaelis-Mentenovo konstanto) privzema histamina, ki ni odvisen od prisotnosti  $Na^+$  ionov.

### 5.1. Od koncentracije odvisen celokupni privzem histamina v astrocite novorojene podgane

Kulture astrocitov so bile inkubirane 20 minut pri 37 °C, v mediju brez  $Na^+$ , ob dodatku različnih koncentracij histamina (koncentracijski razpon od 0,008  $\mu M$  do 50  $\mu M$ ).

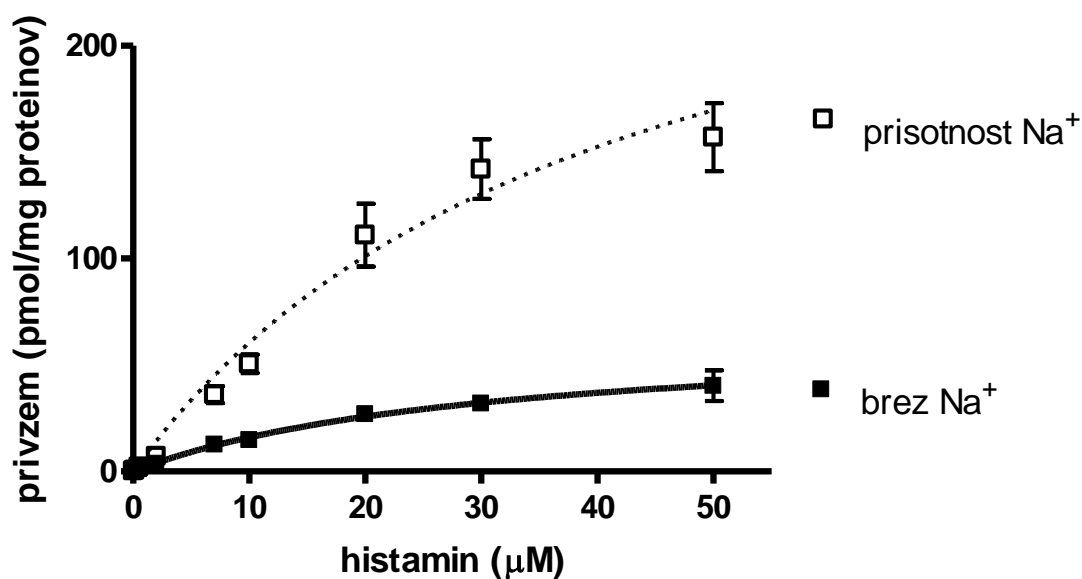


**Slika 7:** Od koncentracije histamina odvisen privzem radioaktivno označenega histamina v astrocite novorojene podgane, v mediju brez  $Na^+$  in pri 37 °C. Vsaka točka na grafu je prikazana kot srednja vrednost  $\pm$  standardna napaka aritmetične sredine treh poskusov opravljenih v treh paralelah (n=9).

Slika 7 prikazuje privzem radioaktivno označenega histamina v astrocite novorojene podgane. Pri nižjih koncentracijah (do 20  $\mu mol/l$ ) količina privzetega histamina sorazmerno narašča, pri višjih koncentracijah zunajceličnega histamina (> 20  $\mu mol/L$ ), pa

postopoma pride do nasičenja privzema, kar je še bolj izrazito prikazano na Sliki 8. Maksimalna vrednost privzema v mediju brez natrija znaša  $40,28 \pm 7,3$  pmol/mg proteinov.

Kot kontrolna vrednost, s katero smo primerjali farmakološke in kinetične parametre, so nam služili rezultati privzema histamina v astrocite novorojenih podgan v fizioloških razmerah, torej v mediju za privzem, ki je vseboval  $\text{Na}^+$  ione (Slika 8).

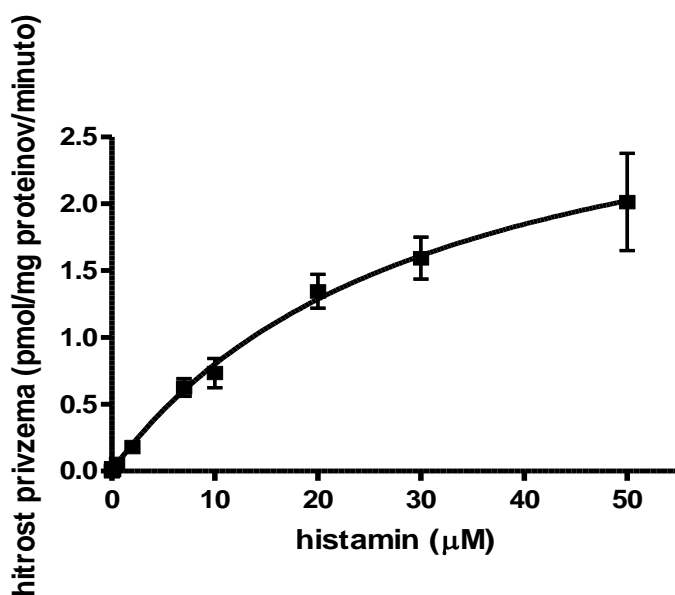


**Slika 8:** Od koncentracije odvisen celokupni privzem histamina v astrocite novorojene podgane v mediju, ki vsebuje  $\text{Na}^+$  ter v mediju brez  $\text{Na}^+$  in pri  $37^\circ\text{C}$ . Vsaka točka na grafu je prikazana kot srednja vrednost  $\pm$  standardna napaka aritmetične sredine treh poskusov v treh paralelah ( $n=9$ ).

Na Sliki 8 primerjamo od koncentracije odvisen privzem histamina v astrocite v okolju v prisotnosti in odsotnosti natrijevih ionov v inkubacijskem mediju. Obe krivulji postopoma naraščata, pri koncentracijah histamina, ki presegajo  $20 \mu\text{mol/l}$ , pa pride do nasičenja. Količina privzetega histamina je trikrat večja, kar je statistično značilno ( $P = 0,0002$ ), če je v inkubacijskem okolju prisoten gradient  $\text{Na}^+$  ionov. Maksimalni privzem histamina ob prisotnosti  $\text{Na}^+$  ionov znaša  $157 \pm 16$  pmol/mg proteinov.

## 5.2. Kinetika celokupnega privzema histamina v astrocite novorojene podgane

V nadaljevanju smo izračunali kinetične parametre od natrijevih ionov neodvisnega privzema histamina v astrocite z uporabo Michealis-Mentenove enačbe. Afinitetna konstanta privzema ( $K_m$ ) je znašala  $30,9 \pm 0,9 \mu\text{mol}$ ; maksimalna hitrost privzema ( $V_{\text{max}}$ )  $3,3 \pm 0,05 \text{ pmol/mg proteinov/minuto}$  (Slika 9).

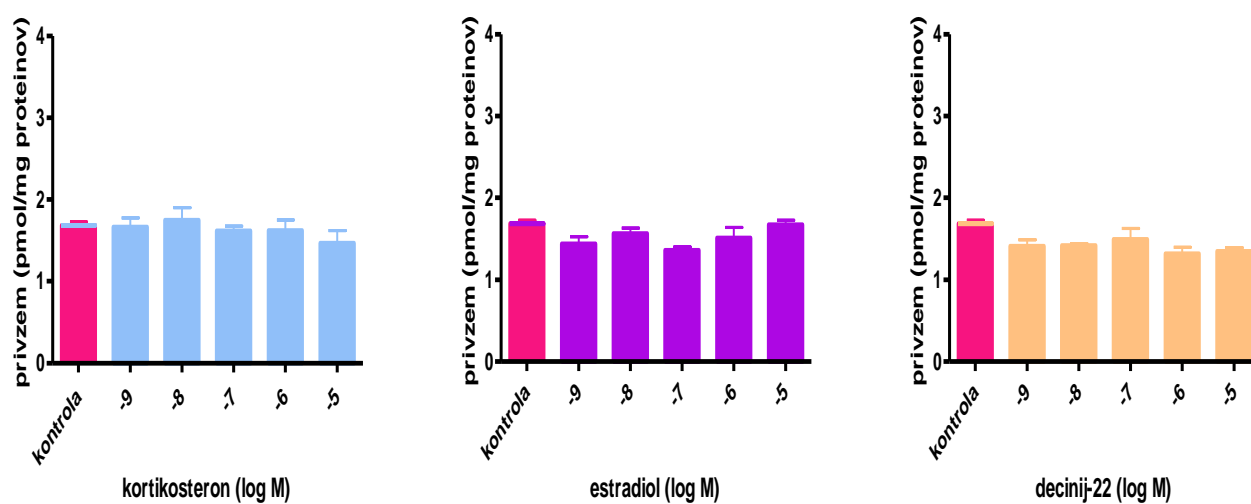


**Slika 9:** Hitrost privzema histamina v astrocite novorojene podgane. Vsaka točka na grafu je prikazana kot srednja vrednost  $\pm$  standardna napaka aritmetične sredine šestih določitev. Dobljene parametre smo izračunali po formuli:  $V = V_{\text{max}} \cdot X / (K_m + X)$ , pri čemer je  $V$  hitrost privzema histamina,  $V_{\text{max}}$  pomeni maksimalno doseženo hitrost privzema histamina,  $X$  predstavlja koncentracija histamina ter  $K_m$  afinitetno (Michaelis-Mentenovo) konstanto.

## 5.3. Inhibicija privzema histamina v astrocite novorojene podgane

V nadaljevanju diplomskega dela smo želeli preveriti, če poteka od  $\text{Na}^+$  ionov neodvisni privzem histamina v astrocite preko prenašalcev za organske katione (OCT). Zato smo preverili, kako na privzem histamina vplivajo kortikosteron, estradiol in decinij-22 v petih različnih koncentracijah. Vse omenjene snovi so znani inhibitorji transporterjev za organske katione.

Kot je razvidno iz Slike 10 nobena od navedenih snovi, tudi v najvišjih uporabljenih koncentracijah, bistveno ne vpliva na privzem 125  $\mu\text{mol/l}$  histamina. Iz tega lahko sklepamo, da od natrija neodvisni transport histamina v astrocite ne poteka preko transporterjev za organske katione.

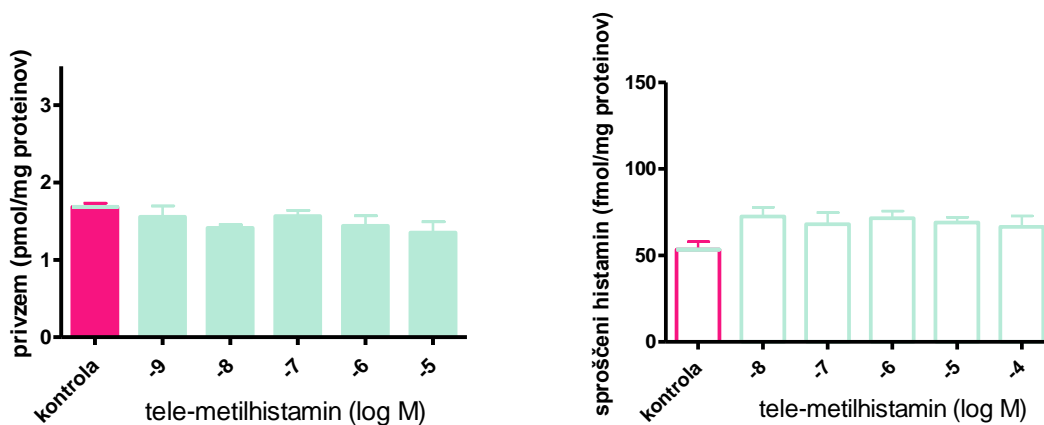


**Slika 10:** Vpliv kortikosterona, estradiola in decinija-22, na privzem histamina v astrocite novorojene podgane.



#### 5.4. Vpliv tMH na privzem in sproščanje histamina v (iz) astrocite novorojene podgane

Astrociti vsebujejo encim histamin HNMT, ki razgrajuje histamin v metabolit tele-metilhistamin (tMH), zato smo v končnem poskusu želeli preveriti, če metabolit vpliva na privzem in sproščanje histamina v astrocite. Kot je razvidno iz Slike 11, tele-metilhistamin ne vpliva niti na privzem niti na sproščanje histamina, če okolje ne vsebuje natrijevih ionov.



**Slika 11:** Vpliv tMH na privzem in sproščanje histamina v (iz) astrocite novorojene podgane.

## 6. RAZPRAVA

V možganih novorojene podgane ima histamin predvsem vlogo nevromodulatorja. Po vezavi na receptorje in delovanju se mora čimprej inaktivirati. Ker se encim HNMT, ki v osrednjem živčevju razgraja histamin, nahaja v citoplazmi različnih celic, se mora histamin privzeti v astrocite oz. ponovno privzeti v nevrone. Histamin se inaktivira malo drugače kot ostali monoaminski NT. Že Rafalowska s sodelavci (24) je ugotovila, da astrociti privzemajo bistveno večje količine histamina kot živčne celice. To ugotovitev so potrdile tudi raziskave Sakuraja in sodelavcev (1), ki so ugotovili, da se v izolirane sinaptosome podgane privzema 100–1000-krat manj histamina, kot se ga privzema v astrocite v primarni kulturi (13). Zaradi bistveno večje vloge astrocitov pri privzemu in razgradnji histamina je inaktivacija histamina v OŽ zelo podobna inaktivaciji NT glutamata.

Histamin se pri fiziološkem pH pojavlja v polarni in/ali protonirani obliki, zato ne more prosto prehajati celične membrane. Za prehod prek membrane različnih celic mora uporabiti “nosača”. V prejšnjih poskusih so v laboratoriju M. Kržan že dokazali, da histamin uporablja dva mehanizma za prenos prek membrane: aktivni transport, ki je odvisen od prisotnosti  $\text{Na}^+$  ionov in je energetsko potraten proces, ter proces, ki je od  $\text{Na}^+$  ionov neodvisen in ne porablja ATP molekul. Oba procesa sta prikaza tudi na Sliki 8.

Kljub temu da privzem histamina raziskovalce zanima že več kot dvajset let, pa specifičnega prenašalca, ki bi privzemal predvsem histamin, še niso odkrili (15). Druge monoaminske prenašalce (serotonin, dopamin in noradrenalin) prek celične membrane prenašajo serotoninski (SERT), dopaminski (DAT) in noradrenalinski (NET) prenašalec. Prenos serotonina, dopamina, noradrenalina s selektivnim prenašalcem je odvisen od prisotnosti natrijevih in kloridnih ionov, energijo za prenos pa zagotavljajo molekule ATP. Če je NT preveč, se lahko prenese tudi s pomočjo neselektivnih prenašalcev, na primer s pomočjo OCT (privzem<sub>2</sub>).

V diplomskem delu so nas zanimale kinetične in farmakološke značilnosti od natrijevih ionov neodvisnega privzema histamina v celice, t.i. privzema<sub>2</sub>. Predvidevali smo, da bi histamin lahko v odsotnosti natrijevih ionov v celice prehajal z elektrodifuzijo ali s pomočjo katerega od neselektivnih prenašalcev (OCT, PMAT). Prehajanje histamina prek

membrane s prosto difuzijo, ki je odvisna le od koncentracijskega gradienta histamina, pa lahko takoj izključimo zaradi fizikalno-kemijskih lastnosti histamina (pri fizioloških vrednostih pH je nabita molekula) in relativno majhne količine histamina, ki pride v notranjost celice tudi takrat, ko so celice izpostavljene zelo visokim koncentracijam histamina v zunajceličnem prostoru.

Naslednji možen način, s katerim lahko poteka od natrijevih ionov neodvisno prehajanje histamina v astrocite novorojene podgane, je elektrodifuzija. Elektrodifuzija je že bolj kompleksen proces, pri katerem je količina privzete snovi premosorazmerna koncentracijskemu gradientu NT, prepustnosti membrane za histamin ter obratnosorazmerna naboju molekule.

Od natrijevih ionov neodvisen transport histamina v astrocite pa lahko poteka tudi prek neselektivnega prenašalca oz. prenašalcev, ki sodelujejo pri privzemu<sub>2</sub>. Dokazi, s katerimi lahko podpremo trditev, da poteka od natrija neodvisen transport histamina v astrocite novorojene podgane prek prenašalca ali prenašalcev, so: 1. V astrocite se privzame relativno majhen del zunajceličnega histamina (Slika 7), približno 0,5 %–1,0 % zunajceličnega histamina se prenese v celice. 2. Količina privzetega histamina narašča z večanjem koncentracije zunajceličnega histamina, vendar pride pri višjih koncentracijah do nasičenja krivulje, ki ponazarja privzem histamina v odvisnosti od njegove zunajcelične koncentracije (Sliki 7 in 8). Pri koncentracijah histamina, ki so večje od 20  $\mu\text{M}$ , privzem ne poteka več premosorazmerno s koncentracijo zunajceličnega histamina.

Privzem biološke molekule s pomočjo prenašalca mora potekati skladno s kinetiko po Michaelis in Mentenovi. Kinetični parametri od natrijevih ionov neodvisnega privzema histamina v astrocite novorojene podgane znašajo: afinitetna konstanta ( $K_m$ )  $30,9 \pm 0,9 \mu\text{mol}$  in maksimalna hitrost privzema ( $V_{max}$ )  $3,3 \pm 0,05 \text{ pmol/mg proteinov/minuto}$ , kar nakazuje na **nizko afinitetni in nizko kapacitetni privzem**. Kinetični parametri od natrijevih ionov odvisnega privzema v isti modelni sistem (primarne kulture astrocitov novorojene podgane) pa znašajo: afinitetna konstanta ( $K_m$ )  $41,3 \pm 3,9 \mu\text{mol}$  in maksimalna hitrost privzema ( $V_{max}$ )  $15,5 \pm 0,9 \text{ pmol/mg proteinov/minuto}$ . Če primerjamo kinetične parametre, opazimo statistično značilno razliko v hitrosti privzema. Hitrost privzema histamina v astrocite novorojene podgane ob prisotnosti  $\text{Na}^+$  ionov je petkrat višja kot v

mediju, ki ne vsebuje natrijevih ionov, medtem ko ni statistično značilnih razlik v Michaelis-Mentenovi konstanti. Privzem histamina ni statičen proces, saj se spreminja s starostjo poskusne živali. Če pripravimo primarne kulture astrocitov iz odraslih podgan in na njih opazujemo privzem histamina, se v njih v mediju, ki vsebuje natrijeve ione, histamin privzema s  $K_m$ , ki znaša  $140 \mu\text{M}$ , hitrost privzema pa znaša  $22,5 \text{ pmol/mg proteinov/minuto}$  (30).

Od  $\text{Na}^+$  ionov neodvisen transport v astrocite novorojene podgane bi lahko potekal ali prek prenašalcev za organske katione ali prek novoodkritega plazemskega membranskega transporterja za monoamine (angl. plasma membrane monoamine transporter – PMAT).

OCT so neselektivni, nizko afinitetni prenašalci za različne organske katione z veliko kapaciteto, ki prenašajo endogene in eksogene katione. V organizmu sesalcev obstajajo 3 izooblike OCT (OCT 1, OCT 2 in OCT 3). Prek njih naj bi potekal predvsem t.i. privzem<sub>2</sub>. Prenos prek teh prenašalcev poteka neodvisno od prisotnosti in gradienta  $\text{Na}^+$  ionov. Histamin se lahko privzema z uporabo OCT 3 in OCT 2.  $K_m$  prenosa histamina prek OCT 3 je med  $180$  in  $220 \mu\text{M}$ , prek OCT 2 pa  $940 \mu\text{M}$  (28). V astrocih novorojene podgane so našli mRNA za OCT 2, ne pa za OCT 3 (30). Vključenost OCT 2 v privzem histamina v astrocite novorojene podgane izključuje bistveno manjša vrednost  $K_m$ , ki smo jo izračunali na podlagi rezultatov naših poskusov  $30,9 \pm 0,05 \mu\text{M}$  (Slika 9) ter rezultatov inhibicijskih študij privzema histamina v astrocite. Kortikosteron, estradiol in decinij-22 so znani inhibitorji OCT. Nobena od uporabljenih koncentracij kortikosterona, estradiola in decinija-22 ni spremenila količine privzetega histamina v astrocite vzgojene iz novorojene podgane (Slika 10), zato lahko izključimo OCT 2 kot prenašalec odgovoren za od natrijevih ionov neodvisen privzem histamina v astrocite.

Po privzemu v astrocite se lahko histamin metabolizira v tele-metihistamin. V laboratoriju M. Kržan so predhodno ugotovili, da astrociti izražajo mRNA za HNMT (15), ki predstavlja glavni encim, ki metabolizira histamin v tMH in predstavlja glavno metabolno pot histamina, ki poteka v OŽ. V našem poskusu smo opazovali vpliv dodatka tMH na od natrijevih ionov neodvisni privzem histamina v astrocite novorojene podgane. Ugotovili smo, da dodatek tMH ne vpliva na privzem histamina, če v mediju za privzem ni natrijevih ionov. V drugem poskusu smo opazovali vpliv dodatka tMH na sproščanje histamina iz

astrocitov. Tudi s tem poskusom smo ugotovili, da dodatek tMH ne vpliva na sproščanje histamina iz astrocitov novorojene podgane (Slika 11), ne moremo pa izključiti možnosti, da tMH vpliva na privzem in sproščanje histamina, ki zahteva prisotnost natrijevih ionov in ATP.

Zaključimo lahko, da v astrocitih novorojene podgane obstaja od natrijevih ionov neodvisen transport histamina, ki poteka prek prenašalca, vendar ne prek OCT 2.

## 7. SKLEP

Zaključimo lahko s tem, da smo potrdili dve in ovrgli eno od zastavljenih hipotez.

1. Histamin se v odsotnosti  $\text{Na}^+$  ionov privzema, vendar je količina privzetega histamina nekoliko manjša kot v prisotnosti natrijevih ionov. Pri manjših količinah zunajceličnega histamina količina privzetega histamina sorazmerno narašča, medtem ko pride pri višjih koncentracijah do nasičenja privzema. Privzem poteka preko prenašalca.

2. Kinetični parametri privzema histamina v astrocite novorojene podgane nakazujejo na privzem z nizko afiniteto. Vrednosti maksimalne hitrosti privzema so bile petkrat manjše kot v primerjavi s kontolo, medtem ko statistično značilnih razlik v Michaelis-Mentenovi konstanti ni bilo.

3. Snovi, ki se prek membrane prenašajo s pomočjo transporterjev za organske katione in metabolit histamina tMH, statistično značilno ne vplivajo na privzem histamina v astrocite novorojene podgane, če v mediju za privzem ni natrijevih ionov. Iz tega lahko sklepamo, da od  $\text{Na}^+$  neodvisni transport v astrocite ne poteka prek transporterjev za organske katione oz. njegov prenos prek le-teh poteka v zelo majhni meri.

## 8. LITERATURA

1. Siegel G, Albers RW, Brady S, Price D. Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects, 7<sup>th</sup> edition. Oxford: Elsevier; 2006: 249-65.
2. Wikipedia, the free encyclopedia. Histamine. [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Histamin\\_-\\_Histamine.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Histamin_-_Histamine.svg), html [dostop: 18.10.2011]
3. Encyclopedia Britannica. Histamine and antihistamines. Ganellin CR. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/171942/drug/10984/Histamine-and-antihistamines?anchor=ref295574>, html [dostop: 18.10.2011]
4. Dorland I, Newman WA. Dorland's illustrated medical dictionary, 30<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Saunders; 2003: 854.
5. Kandel E, Schwartz J, Jessell T. Principles of Neural Sciences, 4<sup>th</sup> edition. New York: McGraw-Hill; 2000: 166-74.
6. Schwartz JC, Arrang JM, Garbarg M. Histamine. In: Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C. Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress. Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, 2002: 179-87.
7. Haas H, Panula P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. Nat Rev Neurosci 2003; 4: 121-30.
8. National Center for Biotechnology Information, Bookshelf. Histamine Actions in the Central Nervous System. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28245/>, html [dostop: 23.10.2011]
9. Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC. Molecular Neuropharmacology, a foundation for clinical neuroscience, 2<sup>nd</sup> edition. New York: McGraw-Hill; 2008: 175-80.
10. Brown RE, Stevens DR, Haas HL. The physiology of brain Histamine. Prog Neurobiol 2001; 63: 637-72.
11. Cooper JR, Bloom FB, Roth RH. The Biochemical Basis of Neuropharmacology, 7<sup>th</sup> edition. Oxford: Oxford University Press; 1996: 391-99.
12. Williams DA, Lemke TL. Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 5<sup>th</sup> edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2002: 794-97.
13. Osredkar D, Burnik-Papler T, Pečavar B, Kralj-Iglič V, Kržan M. Kinetic and pharmacological properties of [<sup>3</sup>H]-histamine transport into cultured type 1 astrocytes from neonatal rats. Inflamm Res 2009; 58: 94-9.

14. Wikipedia, The free encyclopedia. Kemična sinapsa. [http://sl.wikipedia.org/wiki/Kemi%C4%8Dna\\_sinapsa](http://sl.wikipedia.org/wiki/Kemi%C4%8Dna_sinapsa), html, [dostop: 31.10.2011]
15. Predan-Pirkmajer K, Mavri J, Kržan M. Histamine (re)uptake by astrocytes: an experimental and computational study. *J Mol Model* 2009; 16: 1151-8.
16. Schwartz JC, Arrang JM, Garbarg M, Korner M. Properties and Roles of the three subclasses of Histamine Receptors in the brain. *J Exp Biol* 1986; 124: 203-24.
17. Histamine and Histamine Receptors. <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/otherendo/histamine.html>, html [dostop: 2.11.2011]
18. UniProtKB, Protein Knowledgebase. Histamine H<sub>4</sub> receptor. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9H3N8>, html [dostop: 2.11.2011]
19. Jones BL, Kearns GL. Histamine: New Thoughts about a Familiar Mediator. *Clin Pharmacol & Ther* 2011; 89: 189-97.
20. Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC. *Molecular Neuropharmacology, a foundation for clinical neuroscience*, 2<sup>nd</sup> edition. New York: McGraw-Hill; 2008: 18.
21. Wikipedia, The free encyclopedia. Astrocyte. <http://en.wikipedia.org/wiki/Astrocyte>, html, [dostop: 4.11.2011]
22. Kreft M, Zorec R. Astrociti – spregledane zvezde nevrobiologije. *eSinapsa*, Spletna revija za znanstvenike, strokovnjake in nevroznanstvene navdušence. <http://www.sinapsa.org/eSinapsa/clanki/20/astrociti-spregledane-zvezde-nevrobiologije>, html [dostop: 6.11.2011]
23. Kržan M. Funkcija astrocitov. *Zdr vest* 2001; 70: 553-9.
24. Rafalowska U, Waskiewicz J, Albrecht J. Is neurotransmitter histamine predominantly inactivated in astrocytes? *Neurosci Lett* 1987; 80: 106-10.
25. Stolerman IP. *Encyclopedia of Psycho-pharmacology*, 1<sup>st</sup> edition. London: Springer; 2010: 104-6.
26. Connelly WM, Shenton FC, Lethbridge N, Leurs R, Waldvogel HJ, Faull RL, Lees G, Chazot PL. The histamine H<sub>4</sub> receptor is functionally expressed on neurons in the mammalian CNS. *Br J Pharmacol* 2009; 157: 55-63.
27. Schwartz JP, Wilson DJ. Preparation and characterization of type 1 astrocytes cultured from adult rat cortex, cerebellum and striatum. *Glia* 1992; 5: 75-80.
28. Perdan K, Lipnik-Štangelj M, Kržan M. The impact of astrocytes in the clearance of neurotransmitters by uptake and inactivation. V: Ottova-Leitmannova A (ur.),



- Tien, HT. (ur.). *Advances in planar lipid bilayers and liposomes*. Vol. 9, Amsterdam Elsevier: Academic Press, 2009, 211-235.
29. Koepsell H, Lips K, Volk C. Polyspecific Organic Cation Transporters: Structure, Function, Physiological Roles, and Biopharmaceutical Implications. *Pharm Res* 2007; 24: 1227-51.
30. Perdan-Pirkmajer K, Pirkmajer S, Černe K, Kržan M. Molecular and kinetic characterization of histamine transport into adult rat cultured astrocytes. *Neurochem Int* 2012; 61: 515-22.
31. Sakurai E, Sakurai E, Oreland L, Nishiyama S, Kato M, Watanabe T, Yanai K. Evidence for the presence of histamine uptake into the synaptosomes of rat brain. *Pharmacology* 2006; 78: 72-80.