

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PATRIK MIHEVC

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PATRIK MIHEVC

**VEZAVA [³H] N-ALFA-METILHISTAMINA NA HISTAMINSKE
RECEPTORJE H₃ NA ASTROCITIH NOVOROJENIH PODGAN**

**BINDING OF [³H] N-ALPHA-METHYLHISTAMINE ON HISTAMINE
H₃ RECEPTORS IN NEWBORN RAT ASTROCYTES**

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljal na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Mojce Kržan, dr. med. in somentorstvom znan. sod. dr. Damijane Mojce Jurič, univ.dipl.kem.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mojci Kržan, ki mi je omogočila opravljanje diplomske naloge na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, kjer sem lahko поблиže spoznal čare in pasti farmakologije. Zahvaljujem se svoji somentorici znan. sod. dr. Damijani Mojci Jurič za vso strokovno pomoč in nasvete, ki mi jih je nesebično nudila tekom opravljanja naloge.

Še posebej pa se zahvaljujem Tini Mele za obilico potrpežljivosti, nudenje strokovnih nasvetov in pomoč pri eksperimentalnem delu ter nenazadnje prijetno druženje pri opravljanju diplomske naloge.

Prisrčna hvala moji družini, ki mi je stala ob strani tekom vseh vzponov in padcev, ki sem jih doživel v času študija. Še posebej hvala mami Deji, ki me je nesebično podpirala in mi zaupala. Nenazadnje pa še najlepše zahvale Kaji za vso izkazano podporo in za lektoriranje diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Mojce Kržan, dr. med. in somentorstvom znan. sod. dr. Damijane Mojce Jurič, univ.dipl.kem.

Patrik Mihevc

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
I. UVOD	1
1. Histamin	1
1.1 Biosinteza in metabolizem histamina.....	2
1.2 Histaminergični sistem v osrednjem živčevju.....	4
1.3 Histaminski receptorji	6
2. Astrociti	16
2.1 Glavne naloge astrocitov	18
2.2 Komunikacijske sposobnosti astrocitov	20
3. Histamin in astrociti	21
II. NAMEN DELA	24
III. MATERIALI IN METODE	25
1. Materiali	25
1.1 Sestava raztopin	26
1.2 Poskusne živali	27
2. Metode	27
2.1 Priprava primarnih celičnih kultur astrocitov	27
2.2 Priprava membran za vezavne študije	28
2.3 Določitev koncentracije proteinov	29
3. Metoda vezave radioliganda na receptor	29
3.1 Kvantitativni vidiki interakcije receptor-ligand	30
3.2 Določitev saturacijskih parametrov vezave [³ H] NαMH na astrocitate	31
3.3 Računanje parametrov vezavnih študij.....	32
IV. REZULTATI	36
1. Optimizacija metode vezave radioliganda na receptor.....	36
2. Določitev števila vezavnih mest receptorjev H ₃ s saturacijsko vezavo.....	38
3. Specifičnost vezave [³ H]-N-α-metilhistamina na histaminski receptor H ₃	43
V. RAZPRAVA	46

VI. SKLEP	51
VII. VIRI IN LITERATURA	52

KAZALO SLIK

Slika 1: Tautomerni obliki molekule histamina	1
Slika 2: Biosinteza in metabolizem histamina.....	4
Slika 3: Histaminergični sistem v človeških možganih.....	5
Slika 4: Vezava histamina na receptorje v osrednjem živčevju	8
Slika 5: Znotrajcelične signalne poti, ki potekajo preko aktivacije receptorjev H ₃	13
Slika 6: Celice osrednjega živčevja	17
Slika 7: Izražanje podtipov histaminskih receptorjev H ₁ , H ₂ , in H ₃ v astrocitih.....	22
Slika 8: Astrociti v primarni kulturi	28
Slika 9: Vezava [³ H] NαMH na membrane astrocitov	40
Slika 10: Specifična vezava [³ H] NαMH na histaminski receptor H ₃	41
Slika 11: Scatchardova krivulja.....	42
Slika 12: Hillova krivulja specifične vezave [³ H] NαMH.....	42
Slika 13: Inhibicija specifične vezave [³ H] NαMH.....	44
Slika 14: Hillove krivulje agonista in antagonistov.....	45

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Podtipi histaminskih receptorjev, njihovo signaliziranje in izražanje.....	4
Preglednica II: Farmakološki receptorji na astrocitih podgan.....	21
Preglednica III: Sestava DMEM medija.....	26
Preglednica IV: Sestava inkubacijskega medija.....	26
Preglednica V: Sestava EDTA 10x (50 mM)	26
Preglednica VI: Sestava Tris-HCl 10x (0,5 M)	26
Preglednica VII: Sestava DPBS/EDTA.....	26
Preglednica VIII: Sestava Tris-EDTA (TE) pufra.....	26
Preglednica IX: Sestava Tris-HCl pufra.....	27
Preglednica X: Sestava 0,25 % raztopine tripsina.....	27
Preglednica XI: Optimizacija metode za izvedbo vezavnih študij.....	38
Preglednica XII: Srednje vrednosti za celokupno, nespecifično in specifično vezavo naraščajočih koncentracij radioliganda [³ H] NαMH na membrane astrocitov.....	39
Preglednica XIII: Vrednosti IC ₅₀ , K _i in nH za posamezne inhibitorje	44

KAZALO SHEM

Shema 1: Kvantitativni vidiki interakcije receptor-ligand	30
---	----

POVZETEK

Astrociti možganske skorje podgane poleg dobro poznanih in farmakološko določenih histaminskih receptorjev H_1 in H_2 izražajo tudi histaminski receptor H_3 . Receptor se sklaplja s proteinom $G\alpha_{i/o}$ in aktivira več znotrajceličnih signalnih poti. Vezavne lastnosti astrocitnega histaminskega receptorja H_3 niso znane, zato smo želeli v diplomski nalogi potrditi prisotnost in določiti vezavne lastnosti tega receptorja.

Študija je potekala na izoliranih membranah astrocitov, ki smo jih pripravili iz možganske skorje novorojenih podgan. Vezavne lastnosti receptorja H_3 smo določili z vezavnimi študijami s [3H] N- α -metilhistaminom ([3H] N α MH), selektivnim agonistom receptorjev H_3 . Izvedli smo saturacijske in inhibicijske vezavne poskuse.

Z vezavnimi študijami smo dokazali, da je vezava [3H] N α MH na histaminski receptor saturacijski proces. Maksimalno število vezavnih mest radioliganda na receptorskih proteinih (B_{max}) je $5,63 \pm 0,21$ fmol/mg proteina. Specifična vezava [3H] N α MH je v koncentracijskem območju 0,1-20 nM nasitljiva in reverzibilna ter predstavlja 69,7 % celokupne vezave. Populacija vezavnih mest radioliganda je homogena z ravnotežno disociacijsko konstanto (K_D) $4,55 \pm 0,46$ nM in s Hillovim koeficientom specifične vezave (nH) $0,99 \pm 0,03$.

Z inhibicijskimi vezavnimi študijami smo dokazali, da vezavna mesta [3H] N α MH predstavljajo histaminske receptorje H_3 . Oba selektivna antagonist, ciproksifan ($K_i = 1,56$ nM) in tioperamid ($K_i = 8,30$ nM), kot tudi agonist histamin ($K_i = 31,4$ nM) so popolnoma izpodrinili specifično vezan radioligand. Vrednost Hillovega koeficienta za histamin je 0,88, za ciproksifan in tioperamid pa 0,70 ter 0,69, kar kaže na heterogeno naravo interakcij z vezavnimi mesti v membrani astrocitnih celic novorojene podgane.

Na podlagi dobljenih rezultatov zaključujemo, da so vezavna mesta na proteinih izolirane membrane astrocitov možganske skorje podgan, ki imajo visoko afiniteto do [3H] N α MH, histaminski receptorji H_3 .

Ključne besede: astrociti, histamin, histaminski receptor H_3 , vezavne študije

ABSTRACT

Besides well-known and pharmacologically characterized histamine H₁ and H₂ receptors, rat cortical astrocytes also express histamine H₃ receptor. H₃ receptor is coupled to G $\alpha_{i/o}$ protein and activates several intracellular signalling pathways. Because binding properties of astrocytic H₃ receptors were not determined yet, we focused our study on identification and histamine H₃ receptor-binding properties determination on cultured rat cortical astrocytes.

In our study we used isolated membranes of neonatal rat cortical astrocytes in culture. For receptor-binding properties determination we performed radioligand binding assay using selective H₃ receptor agonist [³H] N- α -methylhistamin ([³H] N α MH). We carried out saturation and inhibition studies.

Specific binding of [³H] N α MH was saturable and reversible in concentration range 0.1-20 nM and represented 69.7 % of total binding. Our results showed the existence of a homogenous population of binding sites for [³H] N α MH, with maximal binding capacity (B_{max}) of 5.63 \pm 0.21 fmol/mg protein, dissociation constant (K_D) of 4.55 \pm 0.46 nM and Hill coefficient (nH) of 0.99 \pm 0.03.

With competition binding studies, using various H₃ selective ligands, we further confirmed the binding of [³H] N α MH to the functional H₃ receptor on rat cortical astrocytes. Selective antagonists ciproxifan (K_i = 1.56 nM) and thioperamide (K_i = 8.30 nM) as well as agonist histamine (K_i = 31.4 nM) totally displaced bound radioligand. Hills coefficients for histamine, ciproxifan and thioperamide were 0.88, 0.70 and 0.69, respectively, which indicates the heterogeneity of interaction between binding sites in membranes of neonatal rat cortical astrocytes.

In conclusion, high affinity binding sites of [³H] N α MH on membranes of neonatal rat cortical astrocytes represent histamine H₃ receptor.

Key words: astrocytes, histamine, histamine H₃ receptor, binding studies

SEZNAM OKRAJŠAV

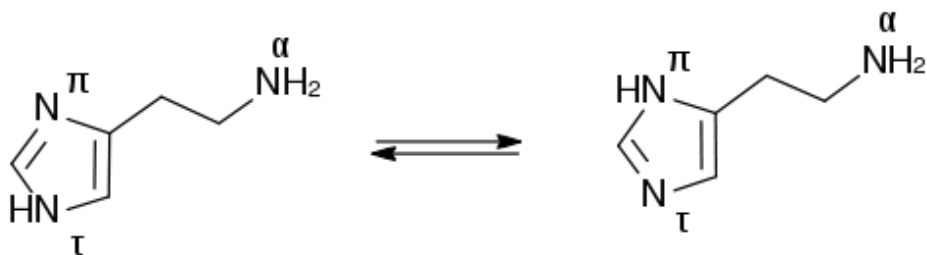
[³ H] N α MH	[³ H] N- α -metilhistamin
AC	adenilat-ciklaza
BDNF	nevrotrofični dejavnik možganskega izvora
BSA	goveji serumski albumin
cAMP	ciklični adenzin-3',5'-monofosfat
CNTF	ciliarni nevrotrofični dejavnik
cpm	število zaznav na minuto
DAG	1,2-diacilglicerol
ddH ₂ O	bidestilirana voda
DMEM/F12	Dulbeccova priredba Eaglovega medija s Hamovo hranilno mešanico F-12
DPBS	Dulbeccov fosfatni pufer z NaCl
EDTA	etilendiaminotetraoetna kislina
FBS	fetalni goveji serum
GABA	γ -aminomaslena kislina
GDNF	nevrotrofični dejavnik glialnega izvora
GFAP	glialna fibrilarna kislina beljakovina
GSK3 β	glikogen sintazna kinaza 3 β
HDC	histidin-dekarboksilaza
HNMT	histamin-N-metiltransferaza
IP ₃	inozitol-1,4,5-trifosfat
MAPK	z mitogenom aktivirana protein-kinaza
NGF	živčni rastni dejavnik
NT-3	nevrotrofin-3
P/S	penicilin-streptomycin
PBS	fosfatni pufer z NaCl
PI3K	fosfoinozimid 3-kinaza
PIP2	fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat
PKA	protein-kinaza A
PKC	protein-kinaza C
PLC	fosfolipaza C

I. UVOD

1. Histamin

Histamin je biogeni amin, ki kot lokalni hormon, živčni prenašalec in/ali nevromodulator uravnava številne fiziološke in patofiziološke procese v organizmu. Prisoten je v večini telesnih tkiv, v večjih koncentracijah pa se nahaja v koži, pljučih in v gastrointestinalnem traktu. Histamin posreduje svoje biološke učinke preko aktivacije štirih podtipov histaminskih receptorjev (H₁, H₂, H₃ in H₄).

Ime histamina po IUPACu je 2-(1*H*-imidazol-4-il)etanamin. V strukturi vsebuje alifatski primarni amin (pK_a=9,4) in imidazol (pK_a=5,8). Etanaminski »rep« je pogost pri večiniaminskih živčnih prenašalcev (dopamin, noradrenalin, adrenalin, serotonin), posebnost molekule histamina predstavlja njegova imidazolna sredica s specifičnimi kemijskimi lastnostmi. Ena od teh je tautomerija, ki mu omogoča, da se lahko nahaja v dveh različnih izomernih oblikah (Slika 1). Ta njegova lastnost je pomembna pri sposobnosti vezave na receptorje histaminergičnega sistema. Pri fiziološkem pH se nahaja v ravnotežni zmesi različnih oblik. Monokationske oblike je več kot 96%, dikationske je približno 3%, zelo majhen delež pa predstavlja neprotonirana oblika. Najverjetneje obe protonirani obliki posredujeta biološki odgovor (1, 2).



Slika 1: Tautomerni obliki molekule histamina (povzeto po 2)

Odkritje histamina sega 100 in več let v zgodovino. Sprva so ga poimenovali β -imidazolietilamin (3), kasneje pa preimenovali v histamin, izhajajoč iz korena histos-tkivo. Odkritje prvih antihistaminikov (antagonistov histaminskega receptorja H₁) leta 1936 je spodbudilo raziskave histamina, ki so pomembno prispevale k poznavanju njegove vloge

in načina delovanja v organizmu. Znanje o tem pomembnem mediatorju se je razširilo na področja želodčnih razjed, alergijskih bolezni, predvsem na patogenezo vnetja in na vloge, ki jih ima v osrednjem živčevju. V zadnjem času prihaja do ponovnega zanimanja za raziskovanje histaminskega sistema, predvsem zaradi odkritja novih histaminskih receptorjev in zaradi morebitne vloge histamina pri vnetnih in imunomodulatornih procesih (4) ter različnih boleznih, ki prizadenejo uravnavanje budnosti, energijsko homeostazo in kognitivne funkcije.

Leta 1936 podeljena Nobelova nagrada za medicino Siru Henryju Hallettu Daleu in Dr. Ottu Loewiju ter leta 1957 podeljena Nobelova nagrada farmakologu Dr. Danielu Bovetu in leta 1988 podeljena Nobelova nagrada Siru Jamesu W. Blacku je sporočilo znanosti o pomembni vlogi, ki jo ima ta »majhna molekula« v človeškem telesu. Prva sta odkrila učinek histamina, drugi je odkril prvi antihistaminik pirilamin (neoantergan), tretji pa je odkril nov podtip histaminskega receptorja – receptor H₂ (3, 5).

1.1 Biosinteza in metabolizem histamina

Histamin nastaja z dekarboksilacijo aminokislina L-histidin, ki jo katalitsko uravnava **histidin-dekarboksilaza (HDC)** (Slika 2). Reakcija poteka ob prisotnosti koencima piridoksal-5'-fosfata. Encim se nahaja v številnih celicah nevroepitelija (6).

Biosinteza histamina poteka v Golgijevem aparatu, histamin pa se takoj zatem shranjuje v granule (7). Največji del histamina je shranjen v zrnih mastocitov (tkivnih bazofilnih). V krvi se nahaja predvsem v bazofilnih granulocitih (6), v želodcu pa je prisoten v enterokromafinim celicam podobnih celicah (ECL) (7). V možganih ga najdemo v histaminergičnih nevronih, kjer deluje kot nevrotansmitor v osrednjem živčevju (6).

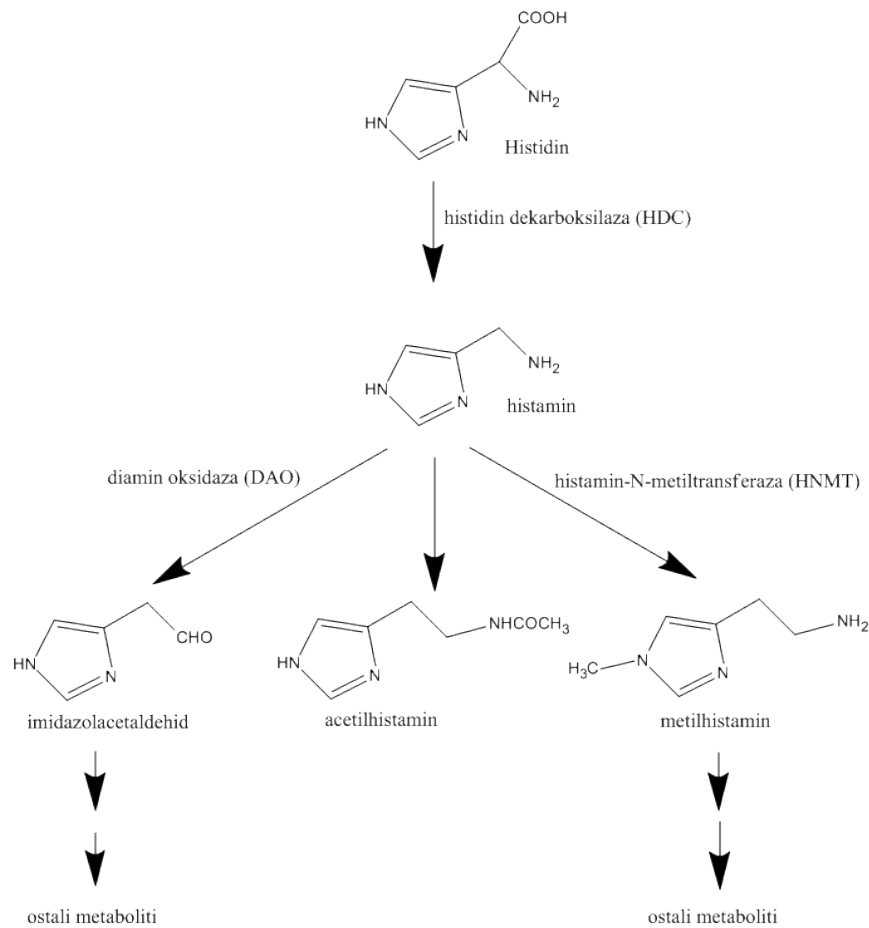
Sproščanje histamina spodbujajo različni dejavniki. Pri alergijskih reakcijah se specifičen antigen veže na imunoglobulin IgE, nastali kompleks pa se veže na številne receptorje na površini mastocitov. Preko aktivacije proteina G se sproži eksocitoza granul, v katerih so shranjeni različni mediatorji, med njimi tudi histamin (8). Izločanje histamina iz celic lahko aktivirajo tudi fragmenti komplekta (C3a, C4a, C5a), citokini (interlevkin-1, interlevkin-3), nevrotansmitorji (adrenalin, serotonin, dopamin), neuropeptidi (neuropeptid Y, substanca P), različna zdravila (tubokurarin, sukcinilholin, morfin,

vankomicin) in določene razmere v organizmu (hipoksija, hiperosmolarnost, travma, mehanske poškodbe tkiva) (6, 8).

Ko se histamin sprosti in opravi svojo nalogo v telesu, se njegov učinek prekine. Histamin se hitro metabolizira, njegov razpolovni čas je ~ 1 min. Metabolizem histamina poteka preko oksidativne deaminacije, ki jo katalizira **diaminooksidaza (DAO)** in preko metilacije s **histamin-N-metiltransferazo (HNMT)** (Slika 2). Oba metabolna encima obstajata pri ljudeh v različnih polimorfnih oblikah. Raziskave kažejo, da ima farmakogenomika metabolizma histamina pomembno vlogo pri določanju fenotipa bolezni, pri katerih je histamin ključni mediator (4).

HNMT je najpomembnejši encim, ki uravnava metabolizem histamina, saj se 50-80% histamina razgrajuje z metilacijo. Delovanje encima je odvisno od prisotnosti S-adenozil-metionina (9). HNMT katalizira prenos metilne skupine iz S-adenozil-L-metionina na histamin in tako tvori N-tele-metilhistamin. Slednji se nadalje oksidira z monoaminsko oksidazo do metilimidazolocetne kisline, ki se nato izloči v urin (10). HNMT je razporejen po različnih tkivih v telesu, najpomembnejši pa je za razgradnjo histamina v epiteliju bronhov in v osrednjem živčevju, kjer razgradnja histamina poteka samo preko te metabolne poti (11).

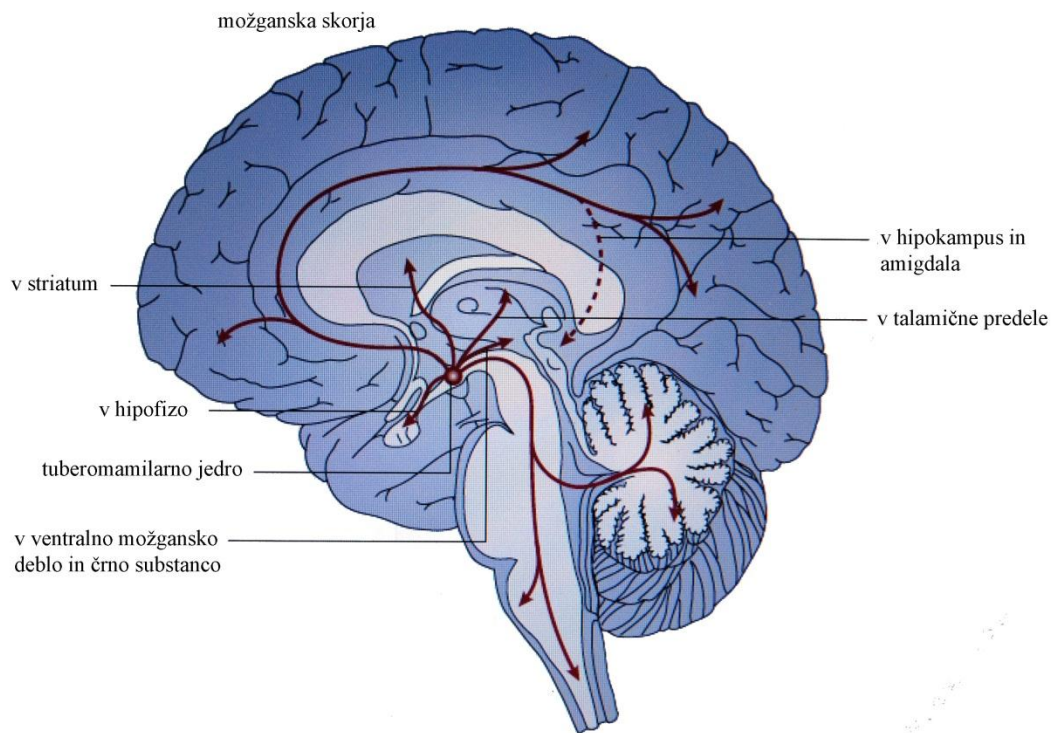
Diamino-oksidaza (DAO) je membranski glikoprotein, ki se izraža pretežno v ledvicah in debelem črevesju. Spada v skupino baker vsebujočih amino-oksidad, za katere je značilen kofaktor TOPA-kinon (2,4,5-trihidroksifenilalaninski derivat kinona) na aktivnem mestu. DAO je shranjena v veziklih na plazmalemi in se ob dražljaju sprosti (12-14). Encim je odgovoren za oksidativno deaminacijo histamina in drugih aminov. DAO katalizira pretvorbo histamina v imidazol acetaldehid in nadalje v imidazolocetno kislino, ki se konjugira z ribozo in se v bolj hidrofilni obliki izloči kot 1-ribozil-imidazol-4-očetna kislina (10).



Slika 2: Biosinteza in metabolizem histamina (povzeto po 1)

1.2 Histaminergični sistem v osrednjem živčevju

V osrednjem živčevju je histamin prisoten v nižjih koncentracijah kot v ostalih tkivih, vendar ima tu pomembno vlogo živčnega prenašalca (nevrottransmitorja). Histamin slabo prehaja krvno-možgansko pregrado, zato nastaja lokalno, v živčnih celicah, deloma pa tudi v mastocitih. V nevronih nastaja, tako kot večina nevrottransmitorjev, v citoplazmi živčnih končičev, od koder se s pomočjo prenašalca VMAT2 prenaša v sinaptične vezikle. Od nenevronske celice so najpomembnejši vir histamina v osrednjem živčevju mastociti (Slika 4; 1, 15).



Slika 3: Histaminergični sistem v človeških možganih: Približno 64000 histaminergičnih živčnih celic, ki izvirajo v tuberomamilarnem jedru hipotalamusa, oživčuje vse večje predele možganov, malih možganov, del hipofize in hrbtenjačo (povzeto po 16).

Prisotnost histaminergičnega sistema v osrednjem živčevju so potrdili leta 1984, ko so imunohistokemično, s protitelesi proti encimu L-histidin-dekarboksilazi (HDC), ki je udeležen pri sintezi histamina, in histaminu natančno določili njegovo lego in porazdelitev. V možganih vretenčarjev izhajajo telesa histaminergičnih živčnih celic samo iz tuberomamilarnega jedra posteriornega dela hipotalamusa, od koder preko ascendentnih in descendentne eferentne poti projicirajo široko skozi možgane (1). Ascendentni poti oživčujeta hipotalamus, talamus, hipokampus, amigdalo, septum, olfaktorni bulbus in rostralni del prednjih možganov, descendentna pot pa možgansko deblo in hrbtenjačo (Slika 3). Telesa histaminergičnih nevronov so bipolarne ali multipolarne celice srednje velikosti, lahko pa dosežejo premere do 30 μm . Strukturne lastnosti histaminergičnih živčnih celic so podobne noradrenergičnim in serotoninergičnim živčnim celicam (17), kar potrjuje vlogo histamina kot regulatorja aktivnosti celotnega osrednjega živčevja.

1.3 Histaminski receptorji

Histamin posreduje v telesu svoje učinke preko aktivacije histaminskih receptorjev, ki se nahajajo v večini perifernih organov ter v perifernem in osrednjem živčevju (4). Do sedaj so bili identificirani štiri podtipi histaminskih receptorjev (H₁, H₂, H₃ in H₄), ki jih uvrščamo v razred metabotropnih receptorjev, t.j. receptorjev, sklopljenih z regulatornimi proteini G (6). Histamin se na zanj specifične receptorje veže z različno afiniteto vezave (K_i). Vrednosti K_i za receptorja H₁ in H₂ sta v intervalu med 2 do 10 μ mol/L, medtem ko je afiniteta vezave na histaminska receptorja H₃ in H₄ od 5 do 10 nmol/L (18).

Za receptorje, ki se sklapljajo z regulatornimi proteini G, je značilna spontana (konstitutivna) aktivnost v odsotnosti vezanega agonista (19). Ti receptorji so v ravnotežju med neaktivno in aktivno obliko. Histamin ima večjo afiniteto vezave na aktivno obliko receptorja in stabilizira to obliko, na ta način premakne ravnotežje proti aktivnemu stanju receptorja. Spontano aktivnost lahko učinkovito zavirajo inverzni agonisti, ki se prednostno vežejo na neaktivno obliko receptorja, jo stabilizirajo in nagibajo ravnotežje v smer neaktivne oblike (20). Vsi štiri podtipi histaminskih receptorjev so spontano aktivni. Študije na možganih glodalcev so visok delež spontano aktivnih receptorjev H₃ določile tudi v razmerah in vivo in potrdile njihovo pomembno fiziološko vlogo, saj naj bi presinaptični receptor preko tega mehanizma zaviral nevronske aktivnosti (4).

1.3.1 Histaminski receptor H₁

Odkritje histaminskega receptorja H₁ sovpada z odkritjem prvega antagonista leta 1936, ki ga je odkril farmakolog Dr. Daniel Bovet (3). Histaminski receptor H₁ velja za najpomembnejši histaminski receptor, ki je vključen v alergijsko-vnetni odgovor (4, 7). Histaminski receptor H₁ je sklopljen z regulatornim proteinom G_{q/11} (21). Aktivacija tega receptorja povzroči aktivacijo fosfolipaze C (PLC), kar sproži sintezo inozitol 1,4,5-trifosfata (IP₃) in diacilglicerola (DAG). IP₃ nadalje mobilizira znotrajcelične zaloge kalcija, DAG pa aktivira protein-kinazo C (PKC) (Slika 4). To povzroči sproščanje dušikovega monoksida iz endotelija krvnih žil, ki spodbudi gvanilatno ciklazo k povečani produkciji ciklične GMP v žilnih endotelnih celicah. Ta kaskada predstavlja dobro poznan histaminergični učinek vazodilatacije, eritema, povečane žilne permeabilnosti in edema. Aktivacija receptorja H₁ povzroči stimulacijo tankih nemieliziranih aferentnih vlaken C,

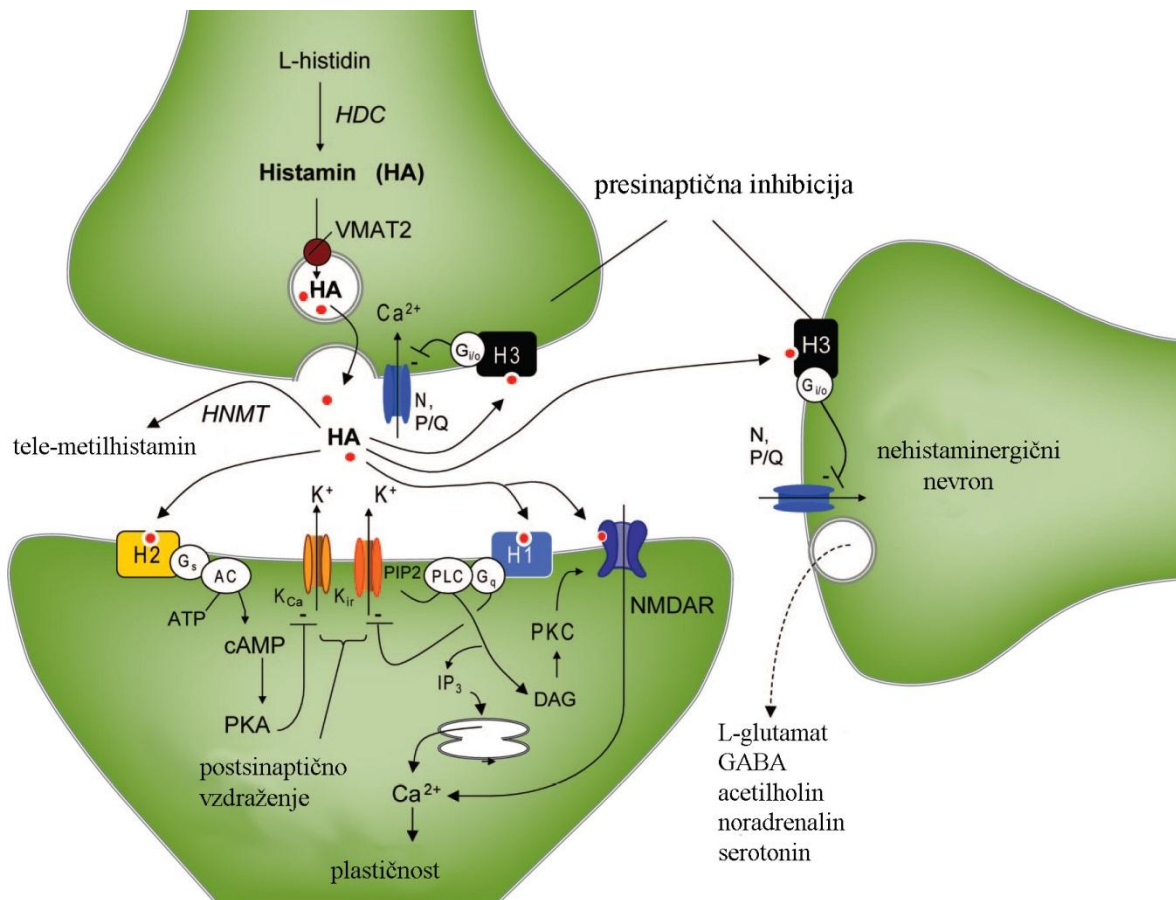
kar vodi v stimulacijo senzoričnih živcev in v občutek srbečice sluznice in kože (22). Aktivacija teh receptorjev ima tudi neposreden učinek na dihala, predvsem na gladko mišičje sapnic, in povzroči bronhokonstrikcijo (23). V kardiovaskularnem sistemu aktivacija receptorja H₁ povzroči znižanje perifernega upora in posledično hipotenzijo ter negativni inotropni in kronotropni učinek (4, 24). Aktivacija receptorja H₁ v osrednjem živčevju povzroči vzdraženje celotne možganske aktivnosti. Njegovi učinki so: zmanjšana permeabilnost kapilar, inhibicija sproženja akcijskega potenciala, vpliv na vnos hrane, posreden ali neposreden vpliv na čustvovanje in spomin, prav tako pa sodeluje v ciklu spanja-budnosti (24).

1.3.2 Histaminski receptor H₂

Leta 1966 sta Ash in Schild predlagala ločitev histaminskega receptorja na dva podtipa, in sicer na receptor H₁ in H₂ (25). Receptor H₂ se izraža na sluznici želodca, gladkih mišičah žil, možganih, maščobnih in imunskih celicah. Receptor H₂ posreduje signal preko regulatornega proteina G_s α , ki aktivira adenilat ciklazo in spodbuja nastanek cAMP (Slika 4). Obstaja tudi možnost sklapljanja receptorja s proteinom Gq α , ki aktivira fosfolipazo C (26). Aktivacija receptorja povzroči sproščanje gladkih mišic v respiratornem in krvožilnem sistemu (18). Ta receptor bi lahko bil vključen tudi v regulacijo celične proliferacije, predvsem rakavih celic. Njegov najpomembnejši fiziološki učinek zaenkrat ostaja aktivacija sproščanja želodčne kisline. Ko histamin zasede receptor H₂ na parietalnih celicah želodca, izzove izražanje gena α -podenote H⁺-K⁺-adenozin-trifosfataze in preko nje katalizo sinteze vodikovih ionov. Histaminski receptor H₂ v gastrointestinalnem sistemu bi lahko vključeval tudi nadzor krčenja želodca in izločanja bikarbonata iz črevesja izzvanega s prostaglandinom E₂. V kardiovaskularnem sistemu aktivacija receptorja H₂ povzroči pozitivni kronotropni in inotropni učinek (24, 26).

Histaminski receptor H₂ ima pomembno vlogo tudi pri regulaciji imunskega sistema. Ugotovili so, da aktivacija receptorja inhibira kemotakso nevtrofilcev, bazofilcev in eozinofilcev (27). T2 celice pomagalke (Th2), ki so vključene v alergijski odgovor, v večji meri izražajo histaminski receptor H₂. Poleg tega ima ta receptor inhibitoren učinek na oba tipa T celic pomagalk (Th1 in Th2). Zaradi tega bi lahko imel histamin po vezavi na receptor H₂ imunosupresivni učinek pri nadzoru vnetja (28). Tudi aktivacija receptorja H₂ povzroči vzdraženje osrednjega živčevja. Njegovi glavni vlogi v osrednjem živčevju sta

povečanje permeabilnosti kapilar in ohranjanje nevrnske plastičnosti. Receptor sodeluje pri pomnjenju in miselnih procesih (24, 27).



Slika 4: Vežava histamina na receptorje v osrednjem živčevju. Histamin se sintetizira iz histidina s pomočjo histidin dekarboksilaze (HDC). Shranjen je v sinaptičnih veziklih, kamor ga prenese vezikularni monoaminski transporter-2 (VMAT2), sprosti se z eksocitozo. Deaktivacijo histamina v izvenceličnem prostoru katalizira nevrnska histaminska-N-metiltransferaza (HNMT) in ga pretvori v tele-metilhistamin. Učinek histamina v osrednjem živčevju posredujejo histaminski receptorji. Receptorja H₁ in H₂ se nahajata postsinaptično. Aktivacija receptorja H₁ sproži povečanje znotrajcelične koncentracije kalcija (Ca²⁺) in znižanje prevodnosti kalija (K⁺). Aktivacija receptorja H₂ spodbudi adenilat ciklazo (AC) in sproži od cikličnega adenožil monofosfata (cAMP) odvisno aktivacijo protein-kinaze A (PKA), ki inhibira s kalcijem aktivirane K⁺ kanale (K_{Ca}). Receptor H₃ je presinaptični receptor, ki inhibira adenilat ciklazo in N- ter P- tipe Ca²⁺ kanalov in aktivira tok K⁺. Presinaptični heteroreceptor H₃ inhibira sproščanje ostalih nevrotransmitorjev, vključno z glutamatom, γ -aminobutirno kislino (GABA), acetilholinom, noradrenalinom in serotoninom (5-HT). Histamin tudi poveča dotok Ca²⁺ preko NMDA receptorjev (NMDAR). ATP – adenožil-5'-trifosfat, DAG – diacilglicerol, IP₃ – inozitol trifosfat, PIP₂ – fosfatidilinozil-4,5-difosfat, PKC – protein-kinaza C, PLC – fosfolipaza C (povzeto po 29).

1.3.3 Histaminski receptor H₄

Histaminski receptor H₄ so določili leta 1994 in klonirali leta 2000. Sklopljen je z regulatornim proteinom G_{i/o}, ki preko inhibicije adenilat-ciklaze zavira nastajanje cAMP (18). Njegovo aminokislinsko zaporedje je v ~35% homologno zaporedju receptorja H₃.

Izraža se na kostnem mozgu, eozinofilcih, T celicah, bazofilcih, monocitih, mastocitih ter živčnih celicah (30, 31). Našli so ga v vranici, priželjcu, pljučih, tankem črevesju, kolonu, srcu in v osrednjem živčevju (18, 32, 33). Vezava eozinofilcev na receptor H₄ sproži kemotakso eozinofilcev na področja vnetja, kar inhibirajo inverzni agonisti receptorja H₄. Skopi podatki študij na miših so pokazali, da histaminski receptor H₄ sproži tudi kemotakso mastocitov, kar prav tako inhibirajo selektivni inverzni agonisti tega receptorja (34). Receptor H₄ se izraža na CD4⁺ T celicah (celice T pomagalk), ker se ob prisotnosti alergij (npr. atopični dermatitis) raven njegovega izražanja močno poveča (35). V kombinaciji z receptorjem H₂ receptor H₄ spodbuja izločanje IL-16 iz CD8⁺ T celic, ki deluje kemotaktično za CD4⁺ T celice. Izražanje receptorja H₄ na človeških mastocitih ni še jasno določeno in se lahko pri vnetju spreminja (36). Lippert in sodelavci so z uporabo pretočne citometrije dokazali izražanje proteina receptorja H₄ na izoliranem humanem kožnem mastocitu. Nadalje so s pretočno citometrijo in inhibicijskimi poskusi z uporabo radioaktivno označenega histamina in receptorsko specifičnega antagonista dokazali nedvomno vezavo histamina na te receptorje (37). Pomen receptorjev H₄ pri kemotaksi mastocitov je dokazal Thurmond s sodelavci. Izvedli so študijo, v kateri so dajali laboratorijskim mišim histamin v aerosolu, kar je povzročilo prerazporeditev mastocitov na epitelij sapnika. Prerazporeditev mastocitov je preprečilo dajanje selektivnega inverznega agonista receptorjev H₄ JNJ7777120 (38). Študija je oponašala alergijski odgovor v pljučih, saj je znano, da se število mastocitov v pljučih in nosni sluznici poveča pri izpostavljanju alergenu. Te ugotovitve so osvetlile možnost udeležnosti receptorja H₄ pri etiologiji astme. H₁ antihistaminiki so namreč pokazali slabo učinkovitost pri zdravljenju astme (39).

Pri študiji na modelnem sistemu alergijskega vnetja respiratornega trakta so na glodalcih z zmanjšanim številom receptorja H₄ pokazali blažji alergijski odgovor v pljučih miši v primerjavi s kontrolno skupino brez pomanjkanja receptorja. Prisotnost inverznega agonista H₄ je značilno zmanjšala število vnetnih celic in mediatorjev (40). Pomen tega histaminskega receptorja so proučevali tudi na človeku. V študiji, kjer so preučevali otroke z astmo, so ugotovili povečano izražanje receptorja H₄ na epiteliju dihal otrok z akutnim poslabšanjem astme v primerjavi s tistimi z urejeno astmo (41). To kaže možno vlogo histaminskega receptorja H₄ pri astmi.

Histaminski receptor H₄ bi lahko bil pomemben tudi pri zdravljenju občutka srbenja, pri katerem so klasični antagonisti H₁ le delno učinkoviti. Dunford in sodelavci so dokazali, da miši brez receptorja H₄ doživljajo bistveno manj srbečice pri stiku s histaminom kot normalne miši in da zdravljenje s selektivnimi inverznimi agonisti H₄ značilno pomirja srbečico. Zdravljenje z inverznim agonistom H₄ (JNJ7777120) je bilo bolj učinkovito pri blaženju srbečice kot zdravljenje z inverznim agonistom H₁ (difenhidraminom) (42). Ker JNJ7777120 ne prehaja krvno-možganske pregrade, ni prišlo do neželenih učinkov (sedacije), ki jih povzročajo klasični antagonisti H₁. Drugi znanstveniki so prišli do podobnih odkritij na miših in dokazali tudi, da je receptor H₄ močno izražen na trnasti in zrnati plasti človeške povrhnjice (epidermisa) (43).

Preglednica I: Podtipi histaminskih receptorjev, njihovo signaliziranje in izražanje (44, 45)

receptor	s proteinom G sklopljeno znotrajcelično signaliziranje	izražanje
H ₁	G _{q/11} ↑PLC: IP ₃ - Ca ²⁺ ↑PLC: DAG - PKC ↑PLA ₂ : AA	nevroni osrednjega živčevja, gladke mišične celice, kardiovaskularni sistem, nevtrofilci, eozinofilci, monociti, makrofagi, dendriti, celice T in B, endotelijske celice, epiteljske celice
H ₂	G α_s ↑AC: cAMP – PKA ↑PLC: IP ₃ - Ca ²⁺	parietalne celice prebavnega trakta, gladke mišične celice, osrednje živčevje, kardiovaskularni sistem, nevtrofilci, eozinofilci, monociti, makrofagi, dendriti, celice T in B, endotelijske celice, epiteljske celice
H ₃	G _{i/o} ↓AC: cAMP – PKA ; ↓Ca ²⁺ ↑MAPK; ↑PLA ₂ : AA ↑PI3K: Akt/GSK3 β	osrednje živčevje, kardiovaskularni sistem, pljuča, monociti, eozinofilci, endotelijske celice
H ₄	G _{i/o} ↓AC: cAMP – PKA ↑MAPK; ↑Ca ²⁺	nevtrofilci, eozinofilci, monociti, dendriti, Langerhansove celice, celice T, bazofilci, mastociti, fibroblasti, kostni mozek, endokrine celice, osrednje živčevje

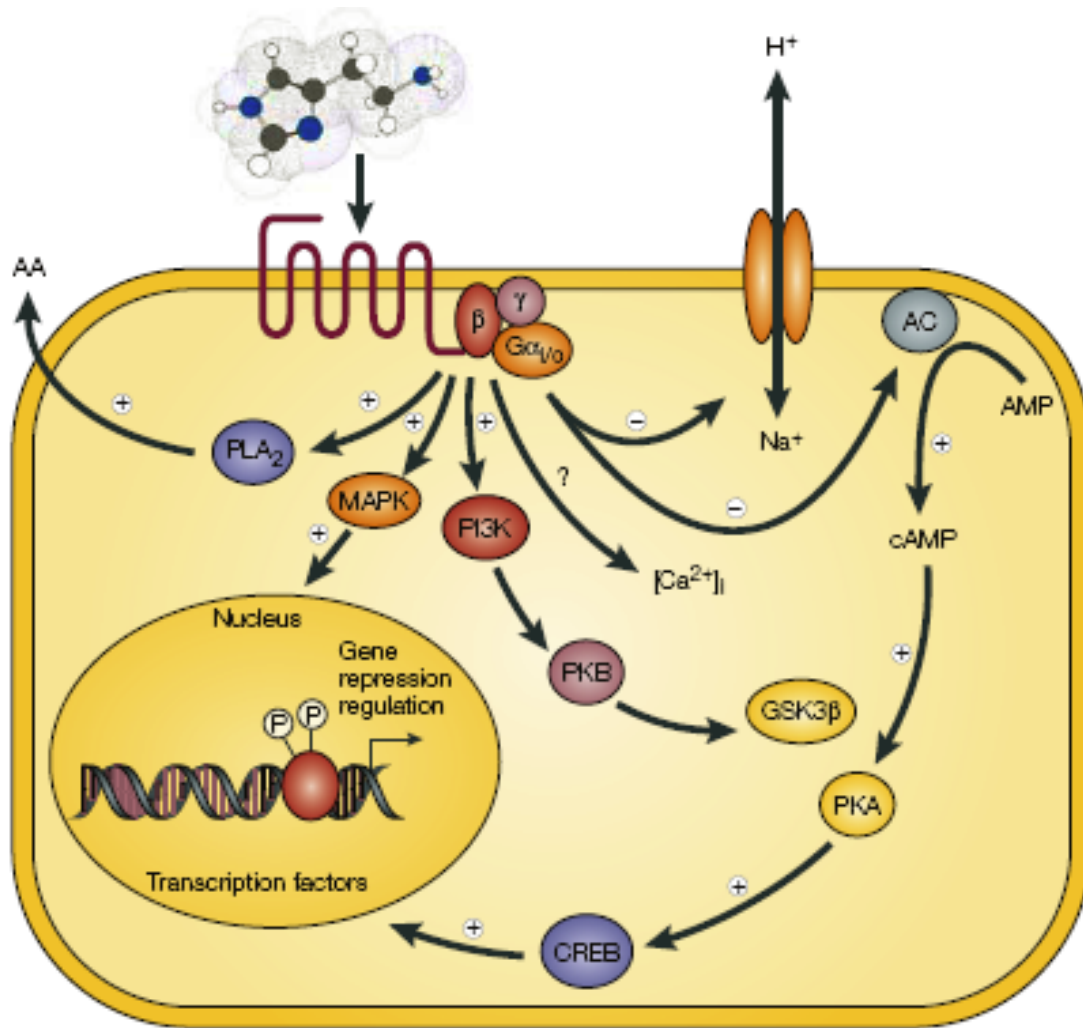
1.3.4 Histaminski receptor H₃

Histaminski receptor H₃ so odkrili leta 1983 (7). Lovenberg in sodelavci so ga leta 1999 klonirali in ugotovili, da je njegovo izražanje v veliki meri omejeno na osrednje živčevje (46). Pri glodalcih so z avtoradiografijo, imunokemijo ali hibridizacijo *in situ* odkrili izražanje receptorja H₃ v možganski skorji, hipokampusu, nukleusu akumbensu, globusu pallidusu, striatumu in hipotalamusu (46-49). Nahaja se pretežno na živčnih celicah, najdemo ga tudi na eozinofilcih, dendritih in monocitih (7). Je avtoreceptor, ki inhibira sproščanje histamina iz histaminergičnih nevronov v možganih podgan (50) (Slika 4).

Izražanje receptorja H₃ ni omejeno le na histaminergične nevrone, pač pa kot heteroreceptor na nehistaminergičnih živčnih celicah uravnava različne neurotransmitske sisteme v možganih. Vključen je pri nadzoru sproščanja neurotransmitorjev dopamina, serotonina, noradrenalina, γ -aminobutirne kisline in acetilholina (Slika 4). Opisali so vpletenost receptorja v povratno zanko med nevroni in mastociti, kjer posreduje signal za sintezo histamina in inhibira sproščanje le-tega iz histaminergičnih nevronov. Poročali so tudi o vključenosti receptorja v nevrogenih vnetjih (50).

Znotrajcelične signalne poti receptorja H₃

Za histaminski receptor H₃ je značilnih več znotrajceličnih signalnih poti (Slika 4). Pri proučevanju vezave [³⁵S]GTP γ S na možganskih tkivih podgane so v prisotnosti pertusis toksina ugotovili, da se histaminski receptor H₃ sklaplja z regulatornimi proteini G $\alpha_{i/o}$ (19). Receptor H₃ preko proteina G $\alpha_{i/o}$ inhibira adenilat-ciklazo, encim, ki je odgovoren za biosintezo ciklične AMP (cAMP). Znižanje znotrajcelične koncentracije cAMP privede do manjše aktivnosti protein-kinaze A (PKA), ki uravnava tako transkripcijo genov preko vezavnega proteina za odzivni element za cAMP (cAMP responsive element binding protein - CREB) kot tudi aktivnost številnih encimov in receptorjev (51).



Slika 4: Znotrajcelične signalne poti, ki potekajo preko aktivacije receptorjev H₃. Histaminski receptorji H₃ lahko modulirajo številne signalne poti, pomembne so predvsem inhibicija adenilat ciklaze (AC), aktivacija MAPK in PLA₂ ter vpliv na znotrajcelično koncentracijo Ca²⁺, pa tudi aktivacija PI3K in Akt/GSK3 β signalne poti in delovanje na Ca²⁺ kanalčke. AA – arahidonska kislina, AC – adenilat ciklaza, Akt – protein kinaza B, cAMP – ciklični adenozin monofosfat, GSK3 β - glikogen sintazna kinaza 3 β , MAPK – mitogen aktivirajoča proteinska kinaza, $\alpha\beta\gamma$ - podenote G-proteinov, PI3K – fosfoinozimid 3-kinaza in PLA₂ - fosfolipaza A2 (povzeto po 52).

Histaminski receptor H₃ preko proteina G $\alpha_{i/o}$ aktivira tudi druge signalne poti, kot sta fosforilacija z mitogenom aktivirane protein-kinaze (MAPK) in aktivacija fosfoinozimid 3-kinazne (PI3K) poti (53). Aktivacija proteinov G $\alpha_{i/o}$ lahko vodi tudi do vključitve fosfolipaze A₂ (PLA₂), ki sproži sproščanje arahidonske kisline ter do inhibicije Na⁺/K⁺ ionskega izmenjevalca in zmanjšanja znotrajcelične koncentracije Ca²⁺ preko mehanizma, ki lahko vključuje oslabiljen vstop kalcija skozi napetostno odvisne ionske kanale (54-57). Vključitev MAPK in PI3K poti sproži fosforilacijo zunajcelično reguliranih kinaz (ERK) in protein kinaze B (PKB ali Akt). Aktivirana PKB nadalje fosforilira in s tem inhibira

delovanje glikogen sintaze kinaze 3 β (GSK3 β), pomembne tau kinaze v možganih (58, 59). Posledice prek histaminskega receptorja H₃ posredovane aktivacije PKB/GSK3 β v možganih so zaenkrat slabo poznane. Vemo pa, da je neregulirana aktivnost GSK3 povezana z nekaterimi boleznimi, kot so diabetes, insulinska rezistenca in Alzheimerjeva bolezen (60).

Izooblike histaminskega receptorja H₃

Znano je, da obstaja več izooblik receptorja H₃, ki imajo različne farmakološke lastnosti. Izooblike receptorja H₃ se razlikujejo na štirih področjih receptorskega proteina. Pri človeku obstaja več kot 20 različnih izooblik, znane pa so tudi izooblike pri različnih živalskih vrstah (47, 52, 61). Čeprav je večina raziskav potekala na podlagi določanj mRNA za histaminski receptor H₃, so v nekaterih primerih določili tudi proteine receptorskih izooblik v možganih miši in podgan z uporabo specifičnih protiteles (49, 62). Receptorska izooblika, ki so jo določili Lovenberg in sodelavci (izooblika 455), zaenkrat ostaja najbolj okarakterizirana in raziskana. Večina izooblik se razlikuje od receptorske H₃ izooblike 455 zaradi večjih delecij nekaterih aminokislin. Najpomembnejše izooblike so tiste, ki imajo delecije na tretji znotrajcelični zanki, saj le-ta vsebuje domeno za sklapljanje s proteinom G (47, 52). Predvsem te receptorske H₃ izooblike izkazujejo različne farmakološke lastnosti: afinitete in jakosti agonistov, signalne lastnosti in drugačno konstitutivno aktivnost (47, 61, 63, 64). Za histaminski receptor H₃ človeka obstajajo dokazi o polimorfizmu gena, ki kodira receptor, a zaenkrat ni razjasnjen pomen vpliva teh polimorfizmov na funkcijske lastnosti različnih polimorfov (52).

Vloga histaminskega receptorja H₃ v osrednjem živčevju

Ideja o tem, da bi histamin lahko bil tudi nevrotansmitor, je bila potrjena v osemdesetih letih dvajsetega stoletja. Prvi pionirji na tem področju so bili Schwartz s sodelavci (65) ter dve neodvisni nevroatomski raziskavi, ki sta nedvoumno dokazali obstoj histaminergičnih nevronov (66, 67). Kasneje se je izkazalo, da ima histaminergični sistem v osrednjem živčevju izjemno pomembno vlogo, saj usklajuje senzorične, motorične, vegetativne in hormonske procese ter višje možganske funkcije (15).

Kognitivne oz. spoznavne funkcije so kompleksen fenomen zmožnosti, ki so najbolj značilne za človeka in vključujejo različne procese, med katerimi so sposobnost učenja, pomnjenja, koncentracije, motivacije, pozornosti in druge duševne sposobnosti (68). Ti procesi nastajajo v osrednjem živčevju, njihovo delovanje pa je pod nadzorom številnih živčnih prenašalcev, vključno z acetilholinom, dopaminom, serotoninom in glutamatom (69-72). Različna nevrodegenerativna obolenja in duševne motnje, kot so Alzheimerjevo bolezen (AD), shizofrenijo ter primanjkljaj pozornosti in motnja hiperaktivnosti (ADHD), spremlja upad spoznavnih funkcij.

Histaminski sistem je posredno ali neposredno vključen v nadzor kognitivnih funkciji (68). Stimulativni vplivi histamina v osrednjem živčevju povzročijo aktivacijo možganske skorje in posledično spodbujajo budnost in pozornost. Inhibicija histaminskega receptorja H₃ s selektivnimi antagonisti/inverzni agonisti lahko spodbudi sintezo in sproščanje histamina ter spodbuja eksocitozo drugih živčnih prenašalcev, ki so vključeni v uravnavanje kognitivnih procesov v osrednjem živčevju (45). Ker antagonisti/inverzni agonisti receptorjev H₃ uravnavajo sintezo neurotransmitorjev v možganih, predstavljajo ti receptorji novo možno terapevtsko tarčo, preko katere bi lahko ponovno vzpostavili ravnovesje neurotransmitorskih sistemov v okvarjenih možganih.

V cirkadianem ritmu budnosti in spanja sodelujejo poleg histaminergičnih nevronov še holinergični, adrenergični, serotoninški ter oreksinski nevroni (73). Projekcije histaminergičnih živčnih celic v predele osrednjega živčevja predstavljajo eno glavnih poti pri spodbujanju zavesti in budnosti (74). Vezava histamina na receptorje H₁ povzroči depolarizacijo holinergičnih in serotoninških nevronov ter s tem vpliva na budnost (45). Proženje teh nevronov pa je večje v budnem stanju kot v spanju (74). Antagonisti/inverzni agonisti histaminskega receptorja H₃ lahko spodbujajo sintezo in sproščanje histamina v osrednjem živčevju ter s tem ohranjajo budnost, skrajšajo REM fazo spanja in čas spanja v stanju nizke možganske aktivnosti (75). Nekateri inverzni agonisti receptorjev H₃ kot so Pitolisant, JNJ- 17216498, PF-03654746 in GSK-189254 že vstopajo v fazo II in fazo III kliničnih študij za zdravljenje narkolepsije (76).

Histamin je eden glavnih mediatorjev vnetja, s tem pa je vključen tudi v **prenos bolečine** oz. nocicepcijo tako na periferiji kot v osrednjem živčevju. Če se sprošča na periferiji, povzroča bolečino in posledično spodbuja izločanje različnih prenašalcev iz primarnih aferentnih živčnih vlaken, ki sodelujejo pri prenosu bolečine. Tudi v osrednjem živčevju

lahko povzroča bolečino, predvidoma preko vpliva na bolečinsko zaznavanje v talamusu in možganski skorji (77). Raziskave na tem področju nakazujejo, da bi lahko bili agonisti H₃ uporabni za en tip bolečinskih dražljajev, antagonist receptorja H₃ pa za drug tip bolečine (78).

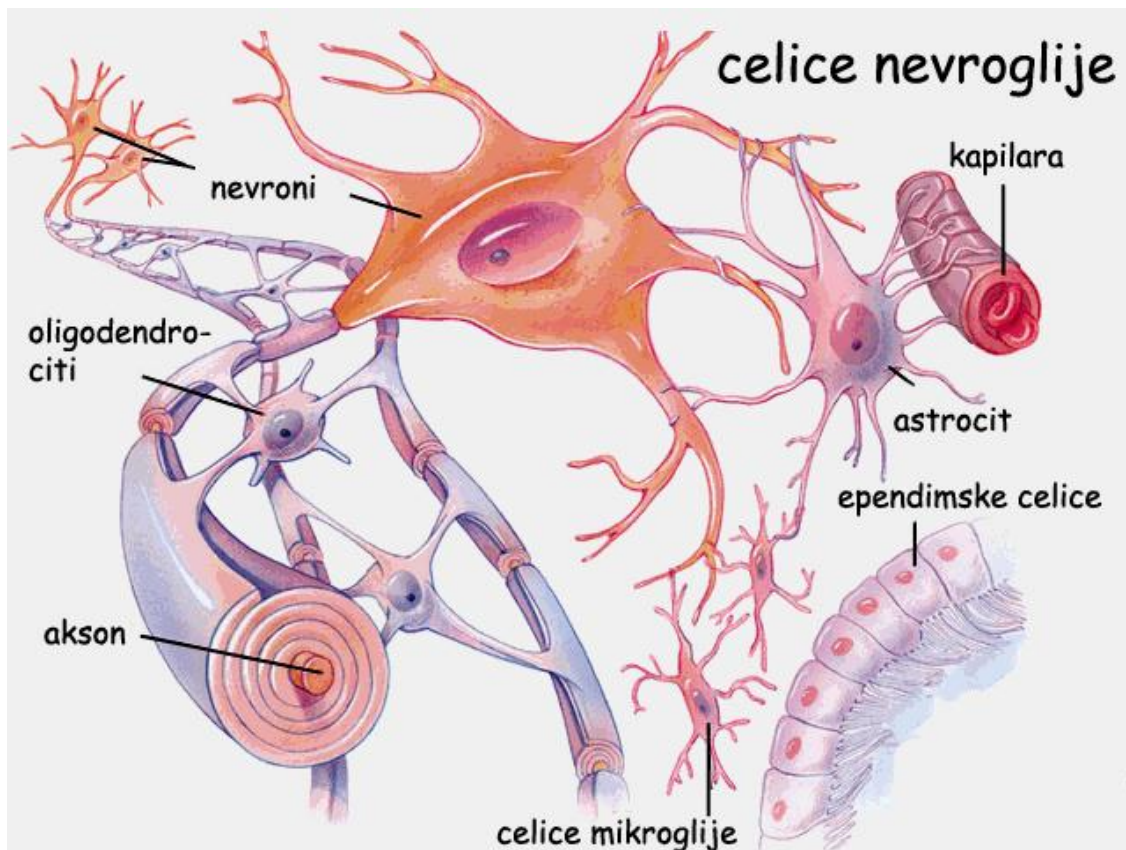
Zdravljenje bolnikov z nekaterimi antidepresivi in antipsihotiki lahko kot neželen učinek povzroča prekomerno povečanje telesne teže (79). Ta učinek lahko do neke mere zaustavi uporaba antagonistov receptorjev H₁ visoke afinitete (80). Z uporabo miši z izbitim genom za receptor H₁ so dokazali povezavo med povečanjem telesne teže in aktivacijo hipotalamične AMP-kinaze, katere aktivator je ravno receptor H₁ (81). Dokazali so tudi, da sam proces hranjenja spodbuja izločanje histamina v hipotalamusu (82). Posledično povečan nivo histamina v možganih vodi do zmanjšane želje po hrani (83), kar dokazuje regulatorno vlogo histaminergičnega sistema pri **procesu hranjenja**. Ti dokazi so vodili raziskovalce v hipotezo, da bi povišanje nivojev histamina z inhibicijo histaminskih receptorjev H₃ zmanjšalo vnos hrane. Raziskava s tioperamidom je to hipotezo ovrgla. Tioperamid je povečal apetit in vnos hrane, imetit, agonist receptorja H₃, pa je zmanjšal apetit; ta učinek je bil pri miših z izbitim genom za receptor H₃ odsoten (84). Zaenkrat ostaja to področje odprto, saj klinične študije na področju zmanjšanja vnosa hrane z uporabo antagonistov/inverznih agonistov receptorja H₃ še potekajo.

2. Astrociti

Leta 1846 je Virchow prvi odkril nenevronske celice v možganih. Mislil je, da je to tkivo, ki povezuje možgane in ga poimenoval »nerven Kitt« (nerve glue – neuroglija). Ime je ostalo, čeprav se je prvotni koncept bistveno spremenil. Prvi jasen opis astrocitov je podal Ramon y Cajal leta 1913. Pokazal je, da so te celice neodvisne od nevronov in kapilar. Leta 1928 je Rio Hortega z uporabo barvil na osnovi srebrovega karbonata, ki jih je uvedel Golgi, odkril dva nova tipa celic, jih ločil od makroglije (astrociti, oligodendrociti) in jih poimenoval mikroglija (celice enakovredne makrofagom v CZS, čigar funkcija je podobna vnetnim celicam v perifernih tkivih) (85, 86).

Astrociti so glavne nenevronske celice v centralnem živčnem sistemu in so desetkrat številčnejše od nevronov. So zvezdasto oblikovane celice, ki raztezajo svoje izrastke vse do površine pje oz. do krvnih žil. Včasih so jim pripisovali zgolj pasivno podporno vlogo, danes pa vemo, da niso zgolj ponižni hlapci nevronom, ampak imajo dobro uveljavljeno

vlogo pri nujenju strukturne, metabolne in trofične podpore nevronom. Imajo pomembno signalno funkcijo, sodelujejo pri vzdrževanju funkcionalnosti sinaps z ohranjanjem homeostaze ionov, čiščenjem sproščenih nevrotansmitorjev in z zalaganjem metabolnih substratov. Njihova okvarjenost je povezana z nevrodegenerativnimi boleznimi. (6, 85-87).



Slika 5: Celice osrednjega živčevja vključno z astrociti, oligodendrociti in celicami mikroglije (prirejeno po 88).

Pomen celic glije nakazuje njihovo naraščajoče število v povezavi z evolucijo. V možganih *Drosophila* (insekt) predstavlja glija 25% celotnega števila celic, v možganih glodalcev do 65%, pri človeku pa kar 90% vseh celic. So skoraj edine celice, ki imajo intermediarni filament, glijalno fibrilarno kislj beljakovino (GFAP). Intermediarni filamenti predstavljajo glavno komponento citoskeleta evkarionskih celic. Čeprav so našli GFAP tudi v perifernem živčevju (v nemieliniziranih Schwanovih celicah) in v necentralnoživčnem tkivu, je imunokemična določitev tega proteina glavna metoda za raziskovanje normalnega razvoja astrocitov in njihovega odziva na poškodbe (85).

2.1 Glavne naloge astrocitov

Astrociti imajo veliko različnih funkcij. Sodelujejo pri zgradbi možganov, pri energetskem metabolizmu in tudi pri tvorjenju in vzdrževanju krvno-možganske pregrade. Njihova organiziranost in posledično njihove naloge so uravnavane s cirkadianim ritmom, porodom, laktacijo in vplivom osmoze. Odzovejo se na veliko sprememb v celičnem in izvenceličnem okolju. Astrociti so tudi posredno ali neposredno vpleteni v različne bolezni (87).

Astrociti lahko tekom svojega življenjskega obdobja spreminjajo obliko in funkcijo glede na potrebe organizma oz. glede na spremembe v njihovem neposrednem okolju.

Glavne funkcije astrocitov v **razvojnem obdobju** možganov so:

- vodenje in usmerjanje rastočih nevronov na njihova ciljna mesta;
- sinteza in izločanje nevrotrofičnih dejavnikov, kot so živčni rastni dejavnik (NGF), nevrotrofični dejavnik možganskega izvora (BDNF), ciliarni nevrotrofični dejavnik (CNTF), nevrotrofični dejavnik glialnega izvora (GDNF) in nevrotrofin-3 (NT-3), ki uravnavajo preživetje nevronov in
- sodelujejo pri razvoju, zorenju in vzdrževanju sinaps (87, 89).

V **odraslem obdobju** poskrbijo za:

- ohranjanje homeostaze,
- sodelujejo v krvno-možganski pregradi,
- vplivajo na sinaptično plastičnost in
- so enakopraven člen tridelne sinapse (87).

L-glutamat je glavni ekscitatorni nevrotransmitor v osrednjem živčevju sesalcev. Visoko afinitetni glutamatni prenašalci so ključni za zaključek sinaptičnega prenosa in za vzdrževanje fiziološke zunajcelične koncentracije glutamata. Nekateri podtipi glutamatnih prenašalcev (transporterjev) (GLT-1, GLAST) so izraženi na membranah astrocitov. Ti prenašalci (transporterji) so tudi prvi prenašalci za glutamat, ki so jih odkrili na astrocitih. Astrociti so odgovorni za metabolizem glutamata v glutamin, kar določa osnovo glutamat-glutaminskega cikla. Glavni prostor sinteze glutamina v možganih je v astrocitih, kjer se nahaja glutamin-sintetaza. Za sintezo glutamina so potrebni glutamat, amoniak in ATP.

Glutamin, izločen iz astrocitov, ima zelo nizko afiniteto za glutamatne transporterje in zato ostaja na voljo nevronom za sintezo glutamata s fosfatom-aktivirano glutaminazo. Glutamin je pomemben prekursor za sintezo aminokislin, kot sta glutamat in GABA. Sinteza glutamina je pomembna tudi zaradi odstranitve amoniaka in varovanja možganov pred njegovimi toksičnimi učinki (85, 87).

Pri **možganski poškodbi** se mirujoči astrociti spremenijo v reaktivne celice, kar imenujemo reaktivna glijoza. Čeprav se temu procesu lahko pridruži proliferacija in povečana reaktivnost celic mikroglije, je izraz glijoza načeloma povezan z astrogliozo. Značilnost te reakcije je:

- nabrekanje astrocitov, tako citoplazme kot povečanje jedra s pridruženo odebelitvijo izrastkov,
- poveča se število gliofilamentov in njihova sestava,
- v nekaterih primerih lahko pride do povečanja števila (proliferacije) astrocitov v bližini akutne poškodbe, lahko pa je astroglijoza komaj zaznavna in celo nima učinka na število in velikost astrocitov,
- pride do povečanega izražanja in sproščanja molekul, ki so normalno prisotne le v manjših količinah: rastni dejavniki, citokini, encimi, citoskeletni proteini, molekule zunajceličnega matriksa in receptorji

Kaže, da je stopnja gliolize odvisna od vrste in mesta poškodbe ter od stanja razvoja možganov. Proliferacija astrocitov, ko do nje pride, lahko izvira iz multipotentnih izvornih celic ali prekursorjev glije, ki so prisotni tudi v odraslem CZS. Obstajata dva tipa reaktivnih astrocitov, izomorfični in neizomorfični gliozni, ki se razlikujeta po končni obliki, ki jo astrocit zavzame. Astrocitna reaktivnost je bolj intenzivna v sivi snovi kot v beli snovi, ki že vsebuje povečano količino GFAP. Poznamo tudi druga znamenja, ki jih izražajo reaktivni astrociti, kot sta GS in S100 beta. Aktivirani S100 beta⁺ astrociti so bistveno povečani v možganih bolnikov z Alzheimerjevo boleznijo in v nekaterih z Downovim sindromom. Glijoza je tudi sekundarni proces, opažen pri staranju in tudi pri drugih patoloških stanjih, ki vplivajo na nevrone, kot so možganska travma, ishemija, eksperimentalni avtoimuni encefalomyelitis in demielinizirana področja pri multipli sklerozi. Fiziološki učinek gliolize je dvojne narave. Po eni strani gosta mreža reaktivnih astrocitov, ki nastane v brazgotini, osami poškodovano tkivo od nepoškodovanega in ga s

tem zaščiti pred nadaljnimi poškodbami. Po drugi strani pa ta gmota reaktivnih astrocitov predstavlja inhibitorno okolje za ponoven razrast nevronov (85, 87).

2.2 Komunikacijske sposobnosti astrocitov

Astrociti izražajo pestro paleto receptorjev in prenašalcev, ki so zelo podobni nevronskim. Izločajo tudi različne mediatorje, vključno z glutamatom, lipidnimi mediatorji in rastnimi faktorji. Reagirajo na kemične signale nevronov, sosednjih astrocitov in celic mikroglije. Električno sklapljanje med astrociti pogosto povzroči združen odgovor v določenem predelu možganov in na ta način nadzor kemičnega okolja, v katerem delujejo nevroni (6).

V odraslem obdobju predstavljajo astrociti enakovreden del tridelne sinapse, sestavljene iz perisinaptične glije, presinaptičnega in posinaptičnega nevrone. Tako je omogočena hitra recipročna komunikacija med nevroni in glijo. Nekateri neurotransmitorji (glutamat, GABA, noradrenalin, acetilholin, taurin, druge aminokisliline...), ki se sproščajo ali uhajajo iz sinaptičnih špranj, delujejo na astrocite preko receptorjev. Po vezavi neurotransmitorjev na receptorje pride do mobilizacije znotrajceličnega kalcija. To lahko privede do dviga kalcija v eni sami celici (Ca oscilacije) ali pa do radialno razširjenega dviga citosolnega kalcija, ki izvira iz ene same celice in se nato preko presledkovnih stikov širi na sosednje celice (Ca valovi). Dvig znotrajceličnega kalcija sproži od kalcija odvisno sproščanje glutamata (in ostalih gliotransmitorjev) iz astrocitov, kar vpliva na dvig kalcija v nevronih. Pride do spremembe nevrone vzdražljivosti in do sprememb v sproščanju neurotransmitorjev iz presinaptičnih terminalov. Aktivnost astrocita je zelo natančno uravnavana in je odvisna od jakosti in frekvence nevrone aktivnosti, kar nakazuje na tvorno vlogo astrocita v sinapsi (85-87, 90-97)

Preglednica II: Farmakološki receptorji na astrocitih podgan. Njihova prisotnost je bila določena z vezavnimi študijami z uporabo radioligandov in z avtoradiografskimi poskusi oz. imunokemično (prirejeno po 87, 90).

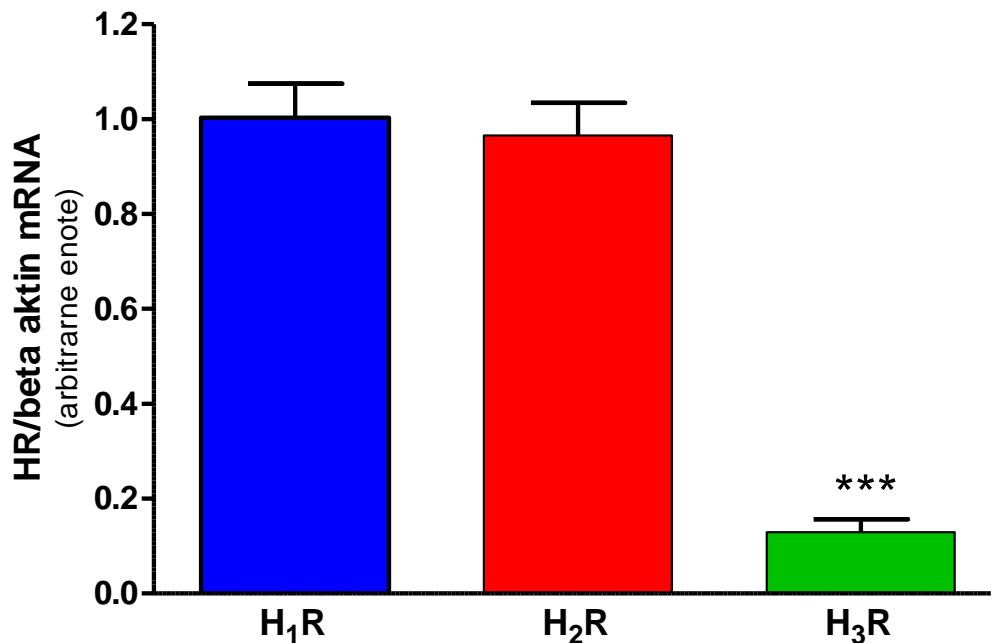
LIGAND	TIP RECEPTORJA	PODTIP RECEPTORJA
aminokislinski prenašalci	GABA	GABA _A , GABA _B , GABA _C
	glutamat	mGluR1–mGluR8, AMPA/KA
	glicin	
biogeni amini	adrenergični	α_1 , α_2 , β_1 , β_2
	dopaminski	D ₁ -D ₅
	histaminski	H ₁ , H ₂ , H ₃
	serotoninski	5-HT ₁₋₇ , 5-HT _{1A} , 5-HT _{2A} , 5-HT _{2B} , 5-HT _{5A}
holinergični	muskarinski	mAChR ₁₋₅
	nikotinski	
neuropeptidni	angiotenzin	II AT2
	atrijski natrijuretčni peptid	
	bombezin	
	bradikinin	B ₁ , B ₂
	endotelin	ET-1, ET-2, ET-3, ET _A , ET _B
	galaninski	
	holecistokinin	
	opiatni	μ , κ , δ
	nevrokinin	NK ₁ , NK ₂ , NK ₃
	neuropeptid Y	
	nevrotenzin	
	vazoaktivni intestinalni peptid (VIP)	
	vazopresin	
nevrotrofični dejavniki	trk B, p75, CNTFR, GDNFR	
nevrosteroidni	estrogenski	
purinski	adenozinski	P1, P2
drugi	interlevkin-1	
	inozitol-3-fosfat	

3. Histamin in astrociti

Astrociti so pomembne tarčne celice histaminergičnih nevronov. Študije so pokazale, da astrociti iz različnih možganskih predelov glodalcev izražajo histaminske receptorje H₁ in H₂, kar kaže na pomembno vlogo histamina v teh celicah (92, 98). Astrociti odstranjujejo in inaktivirajo zunajcelični histamin (93, 94), le-ta pa uravnava rast astrocitov in njihovo

proliferacijo (95). Preko receptorjev H₁ in H₂ histamin uravnava glikogenolizo (96), preko receptorja H₁ pa zvišuje znotrajcelično aktivnost kalcija, kar pospešuje sproščanje t.i. gliotransmitorjev. Histamin je udeležen tudi pri regulaciji sinteze in sproščanja astrocitnih citokinov in nevrotrofičnih dejavnikov (89, 92, 99, 100).

Nedavna študija na astrocitech možganske skorje podgane je pokazala, da poleg že znanih dveh podtipov histaminskih receptorjev te celice izražajo tudi histaminske receptorje H₃ (Slika 6, 89).



Slika 6: Izražanje podtipov histaminskih receptorjev H₁, H₂, in H₃ v astrocitech možganske skorje novorojenih podgan. Nivoji mRNA vseh treh receptorjev so bili določeni s pomočjo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qRT-PCR). Izražanje histaminskih receptorjev (HR) je normalizirano glede na izražanje beta-aktina in primerjano z izražanjem receptorja H₁ (89).

Astrocitni receptor H₃ se, tako kot nevronski, sklaplja s proteini G $\alpha_{i/o}$. Aktivacija le-tega torej sproži enako kaskado znotrajceličnih reakcij, in sicer preko inhibicije adenilat-ciklaze znižuje znotrajcelične koncentracije cAMP, aktivira MAP kinazno signalno pot, preko fosfolipaze C pa aktivira protein-kinazo C. Za razliko od receptorjev na živčnih celicah pa astrocitni receptor H₃ ne kaže spontane oz. konstitutivne aktivnosti, ki bi uravnala nivoje znotrajceličnega cAMP. Študija je potrdila tudi funkcionalno vlogo astrocitnega receptorja H₃. Histamin preko aktivacije vseh treh histaminskih receptorskih podtipov in njihovih

znotrajceličnih signalnih poti, ki se združijo na nivoju aktivacije MAP kinazne poti, spodbuja gensko izražanje in proteinsko sintezo nevrotrofičnega dejavnika nevrotrofina-3 (89). Zanimivo odkritje histaminskega receptorja H₃ na astrocitih prispeva k boljšemu poznavanju interakcij med histaminskim sistemom in glijalnimi celicami v osrednjem živčevju, napeljuje pa tudi k nadaljnemu proučevanju njegovih molekularno-farmakoloških lastnosti in fiziološke vloge v teh celicah.

II. NAMEN DELA

Astrociti možganske skorje podgane poleg dobro poznanih in farmakološko določenih histaminskih receptorjev H₁ in H₂ (92, 98), izražajo tudi histaminski receptor H₃ (89). Receptor se sklaplja s proteinom G $\alpha_{i/o}$ in aktivira več znotrajceličnih signalnih poti. Vezavne lastnosti astrocitnega histaminskega receptorja H₃ niso znane.

V diplomskem delu bomo preverili naslednje delovne hipoteze:

1. Metoda vezave radioliganda na receptor je primerna metoda za določitev vezavnih mest histaminskega receptorja H₃.

Metoda vezave radioliganda na receptor omogoča prepoznavanje (identifikacijo), kvantitativno opredelitev (karakterizacijo) in porazdelitev (lokalizacijo) receptorskih vezavnih mest v tkivih. S spreminjanjem parametrov vezavnega poskusa bomo dosegli najugodnejše razmere za vezavo izbranega radioliganda na receptorska vezavna mesta.

2. Na astrocitih možganske skorje podgane v primarni kulturi so prisotni histaminski receptorji H₃.

Z vezavnimi poskusi bomo proučili vezavo radioliganda [³H] N- α -metilhistamina na histaminski receptor H₃ in tako dokazali obstoj tega receptorja na astrocitih. Pričakujemo, da bo vezava radioliganda na receptorska mesta saturacijski proces. Določili bomo maksimalno število vezavnih mest na enoto proteina (B_{max}) in ravnotežno konstanto disociacije kompleksa receptor-radioligand (K_D).

3. Vezavna mesta [³H] N- α -metilhistamina so histaminski receptorji H₃.

Z inhibicijskimi vezavnimi poskusi bomo z uporabo antagonistov/inverznih agonistov (ciproksifan, tioperamid) in agonista (histamin) preverili, če se je [³H] N- α -metilhistamin vezal na histaminski receptor in izločili možnost vezave radioliganda na nereceptorska vezavna mesta. Določili bomo koncentracijo inhibitorja, ki nadomesti polovico maksimalno vezanega radioliganda (IC_{50}) in ravnotežno disociacijsko konstanto za posamezni kompleks receptor-inhibitor (K_i).

III. MATERIALI IN METODE

1. Materiali

Pri delu smo uporabljali naslednje materiale:

- [³H] N- α -metilhistamin (specifična radioaktivnost 84,4 Ci/mol) (*Perkin Elmer NEN, Whaltam ZDA*)
- 1 % mešanica proteaznih inhibitorjev (*Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA*)
- 2.5 % Tripsin (10 x) (*Gibco, Life Technologies, Carlsbad, ZDA*)
- acetatni filtri, premer por 0,8 μ m (*Millipore, Massachusetts, ZDA*)
- BIO-RAD komplet za določevanje proteinov (Bio-Rad Laboratories, München, Nemčija)
- Dulbeccov fosfatni pufer z NaCl (10x) (*Gibco, Life Technologies, Carlsbad, ZDA*)
- Dulbeccov modificiran Eaglov medij s Hamovo hranilno mešanico F-12 (1:1) (*Gibco, Life Technologies, Carlsbad, ZDA*)
- Etilendiaminotetraoacetna kislina (*Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA*)
- fetalni goveji serum (*Gibco, Life Technologies, Carlsbad, ZDA*)
- fosfatni pufer z NaCl, pH = 7,4 (10x) (*Gibco, Life Technologies, Carlsbad, ZDA*)
- goveji serumski albumin (*Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA*)
- histamin (*Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA*)
- Leibowitzev medij L-15 (*Gibco, Life Technologies, Carlsbad, ZDA*)
- ciproksifan je podaril prof. dr. Walter Schunack iz Freie Universität Berlin, Nemčija
- natrijev hidrogenkarbonat za celične kulture (NaHCO₃) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA*)
- natrijev klorid (*Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA*)
- penicilin-streptomicin (10.000 IU/ml – 10.000 UG/ml) (*Gibco, Life Technologies, Carlsbad, ZDA*)
- scintilacijska tekočina Aquasol (*New England Nuclear, ZDA*)
- steklenice in petrijevke za gojenje celičnih kultur (*NUNC, Roskilde, Danska*)
- Tris base (*Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA*)
- tioperamid (*Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA*)

Uporabljali smo tudi druge kemikalije proizvajalcev *Sigma-Aldrich (ZDA)* in *Merck KGaA (Nemčija)*.

1.1 Sestava raztopin

Preglednica III: Sestava DMEM medija.

DMEM medij 500 mL	
6 g	DMEM/F-12
1,219 g	NaHCO ₃
500 mL	ddH ₂ O

Preglednica IV: Sestava inkubacijskega medija.

Inkubacijski medij 120 mL	
106,8 mL	DMEM medija
12 mL	FBS
1,2 mL	P/S

Preglednica V: Sestava EDTA 10x (50 mM).

EDTA 10x (50 mM) 100mL, pH = 8,0	
1,86 g	EDTA
100 mL	ddH ₂ O

Preglednica VI: Sestava Tris-HCl 10x (0,5 M).

Tris-HCl 10x 0,5 M 1000 mL	
60,75 g	Tris base
do 1000 mL	ddH ₂ O

Preglednica VII: Sestava DPBS/EDTA.

DPBS/EDTA 160 mL	
16 mL	10x EDTA
144 mL	DPBS

Preglednica VIII: Sestava Tris-EDTA (TE) pufera.

Tris-EDTA (TE) pufer pH = 7,4	
10 mL	EDTA 10x
90 mL	Tris-HCl

Preglednica IX: Sestava Tris-HCl pufra.

Tris-HCl pufer 500 mL	
50 mL	Tris-HCl 10x
450 mL	ddH ₂ O

Preglednica X: Sestava 0,25 % raztopine tripsina.

0,25 % raztopina tripsina 40 mL	
4 mL	2,5 % tripsina
36 mL	DPBS/EDTA

1.2 Poskusne živali

Za pripravo celičnih kultur astrocitov smo uporabili možganske skorje novorojenih podgan (do tri dni stare) seva Wistar, vzgojene na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Usmrtimev živali je bila priglašena Veterinarski upravi Republike Slovenije (potrdilo št. 34401-87/2008/3).

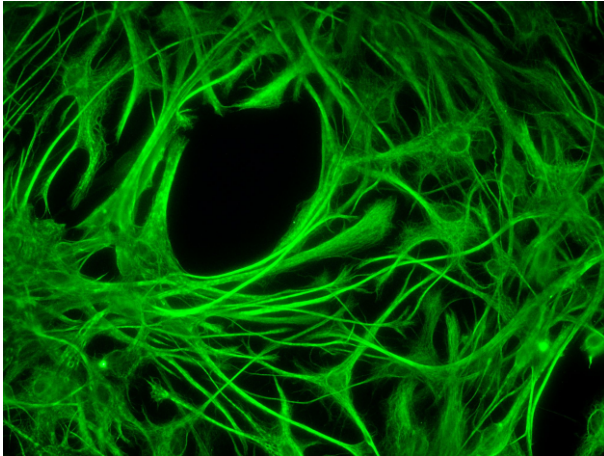
2. Metode

2.1 Priprava primarnih celičnih kultur astrocitov

Primarne celične kulture je pripravila mlada raziskovalka, ki ima dovoljenje za izvajanje evtanazije na poskusnih živalih. Uporabila je metodo, opisano v Čarman-Kržan s sodelavci (1991) z nekaterimi spremembami. Novorojene podgane je evtanazirala z dekapitacijo in jim v aseptičnih razmerah odvzela možgane. Odstranila jim je možganske ovojnice, možgansko skorjo pa mehansko razdružila skozi sterilno najlonsko mrežico s premerom por 75 μ m. Celično suspenzijo je ustrezno razredčila. Tako smo dobili posamezne astrocitne celice.

Razredčeno celično suspenzijo (polovica možganske skorje/15 mL medija) je prenesla v steklenice za gojenje celičnih kultur in jih postavila v inkubator ter jih tako gojila do stanja 70-80% konfluentnosti v vlažni atmosferi s 95% zraka in 5% CO₂ pri temperaturi 37°C. Ustrezno razredčene celice je presadila: zamenjala je medij in jih dala čez noč na stresalnik pri 200 obratih/minuto in stalni temperaturi 37°C. Naslednji dan je celice sprala s 15 mL DPBS/EDTA in jim dodala 5 mL 0,25 % tripsina v DPBS/EDTA. Po 15-30 s je odstranila

tripsin in celice inkubirala 10-15 min v istih razmerah kot za gojenje. Nato je dodala ustrezno količino inkubacijskega medija, razredčene celice alikvotirala in prenesla v steklenice za gojenje celičnih kultur. Celice je gojila 7-10 dni do stanja konfluentnosti. Inkubacijski medij je menjavala na približno 3 dni ob stalnem spremljanju delitve oz. rasti celičnih kultur pod mikroskopom (Slika 7).



Slika 7: Astrociti v primarni kulturi. Celična kultura astrocitov je označena s protitelesi proti GFAP (izvedla Klara Bulc Rozman z Inštituta za patološko fiziologijo Medicinske fakultete v Ljubljani).

2.2 Priprava membran za vezavne študije

Konfluentne celične kulture astrocitov mladih podgan smo sprali s DPBS/EDTA in jim dodali 0,25% tripsina v DPBS/EDTA, da so odstopile od podlage. Tiste, ki niso odstopile, smo postrgali s strgalom. Tripsin smo inaktivirali z dodatkom 4 mL medija s serumom. Suspenzijo celic smo centrifugirali 7 minut pri 12000 obratih/minuto pri temperaturi 4°C. Supernatant smo odlili in celični usedlini dodali 1 mL ledeno mrzlega Tris-EDTA (TE) pufru s proteaznimi inhibitorji (1:100). S pomočjo ultrazvočnega razbijalca (sonikatorja) smo razbili celice tako, da smo jih sonicirali 10 s, dali na led in ponovno sonicirali 10 s. Nato smo jih centrifugirali 20 min pri 21000 obratih/min pri 4°C. Supernatant smo odlili, ponovno dodali pufer, sonicirali in centrifugirali. Tako smo dobili membrane astrocitov, ki smo jih bodisi uporabili takoj bodisi zamrznili pri -70°C za kasnejšo uporabo. Pred pričetkom posameznega poskusa smo usedlino celic štirih centrifugirnih epruvet resuspendirali v ledeno hladnem TE pufru in določili količino celokupnih proteinov.

2.3 Določitev koncentracije proteinov

Celokupne proteine smo določili z metodo po Bradfordu (1976). Metoda temelji na reakciji proteinov z barvilom Coomassie Brilliant Blue G-250. Rdeče barvilo se ob stiku s proteini v kislem obarva modro in ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 595 nm.

Proteine smo določevali na mikrotiterski plošči s kompletom BIO-RAD. Komplet vsebuje reagent za barvanje (*Bio-Rad Protein Assay*) in standard (*Bio-Rad Protein Assay Standard I*) z liofiliziranimi govejimi plazemskimi gama globulini. Absorbanco smo merili s čitalcem za mikrotiterske plošče (*SynergyHT*, *Bio Tek*, ZDA).

Zamrznjene astrocite smo odtalili in jim dodali ledeno hladni TE pufer. Suspenzijo smo homogenizirali z električnim mešalom in jo postavili na led. Del vzorca smo uporabili za določitev koncentracije proteinov.

Za pripravo umeritvene krivulje smo odpipetirali 300,8 μ L standarda *Bio-Rad Protein Assay Standard I* in 99,2 μ L bidestilirane vode. Tako smo dobili koncentracijo standarda 1 mg/mL, ki smo ga odpipetirali v epruvete (5 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 30 μ L, 40 μ L, 50 μ L, 60 μ L, 75 μ L). Pripravili smo slepo raztopino (brez standarda) in epruvete dopolnili z bidestilirano vodo do 800 μ L ter dodali 200 μ L reagenta (*Bio-Rad Protein Assay*). Iz vsake epruvete smo odpipetirali 200 μ L na mikrotitersko ploščo. Na ploščo smo nanegli tudi 8 μ L ter 4 μ L vzorca (152 μ L, 156 μ L ddH₂O in 40 μ L reagenta). Povečanje absorbance, ki je premosorazmerno količini proteinov v vzorcu, smo določili spektrofotometrično. Meritev smo izvedli v dveh paralelkah.

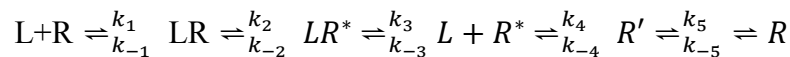
3. Metoda vezave radioliganda na receptor

Za študij vezavnih lastnosti histaminskega receptorja H₃ na astrocitih možganske skorje podgane smo uporabili metodo vezave radioaktivno označenega liganda [³H] N α MH na receptor (101). Metoda omogoča kvantitativno identifikacijo (prepoznavanje), karakterizacijo (opredelitev) in lokalizacijo (porazdelitev) specifičnih vezavnih mest v tkivih in je zato primerna metoda za potrditev prisotnosti histaminskega receptorja H₃ na membranah podganjih astrocitov.

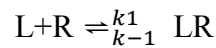
3.1 Kvantitativni vidiki interakcije receptor-ligand

Prvi dogodek v zaporedju reakcij aktivacije receptorja – vezava liganda na receptorsko makromolekulo – je natančna fizikalno-kemijska interakcija. Pri tem predpostavljamo, da je to enostaven biomolekularni proces, da so vezavna mesta na receptorju enakovredna in da velja zakon o vplivu mas. Interakcija med receptorjem in ligandom poteka po naslednji shemi (101).

a) interakcija agonista



b) interakcija antagonist



c) afinitetna ali ravnotežna konstanta reakcije

$$K_A = \frac{[LR]}{[L][R]} \quad \text{ali} \quad K_D = \frac{1}{K_A}$$

d) biološki učinek: končni biološki učinek (E) je neposredno povezan z močjo signala, z nastalim številom [LR] kompleksov ali, upoštevajoč enačbo c), na K, [L], [R]:

$$E = (f)[LR] \quad \text{ali} \quad E = (f)K_A[L][R]$$

Shema 1: Kvantitativni vidiki interakcije receptor-ligand. L-prosti ligand, R-prosti receptor, LR-kompleks ligand-receptor, K_A-ravnotežna asociacijska konstanta, K_D-ravnotežna disociacijska konstanta, k_n-hitrostna konstanta asociacije, k_{-n}-hitrostna konstanta disociacije, LR*-aktiviran kompleks, R'-receptor v vmesni stopnji (101).

Osnovni princip metode vezavnih študij je spremljanje prvega koraka aktivacije receptorja, t.j. vezava liganda na receptor v celičnem homogenatu in določitev kvantitativnih parametrov (termodinamičnih in kinetičnih), ki opredeljujejo receptor, ligand in interakcijo receptor-ligand. Glavni pogoj pri tem je nedvoumna ločitev specifične in nespecifične

vezave liganda na receptor (101). Pri izvedbi poskusov je potrebno upoštevati naslednje kriterije, po katerih specifična vezava radioliganda na receptor predstavlja interakcijo med receptorjem in ligandom:

1. radioligand mora biti farmakološko aktiven, kemično čist in stabilen ter z visoko specifično radioaktivnostjo
2. vezava radioliganda na receptor mora biti reverzibilna in hitra
3. vezava radioliganda mora zaradi omejenega števila receptorskih mest doseči nasičenje, kar omogoča določitev maksimalnega števila receptorskih vezavnih mest (B_{\max})
4. radioligand mora imeti visoko afiniteto do receptorskih vezavnih mest, ki jo opredelimo z ravnotežno disociacijsko konstanto kompleksa receptor-radioligand (K_D)
5. hladni agonisti in antagonisti zavirajo vezavo radioliganda na receptor, kar določa ravnotežna disociacijska konstanta kompleksa receptor-inhibitor (K_i)
6. receptorji, ki jih opredelimo z vezavnimi študijami, morajo imeti v preiskovanem tkivu fiziološko vlogo.

Če so izpolnjeni naštetih pogoji dela, lahko s precejšnjo verjetnostjo trdimo, da je vezava radioliganda na izolirane membrane ali na podcelično frakcijo tarčnega tkiva vezava na receptorni protein (101).

3.2 Določitev saturacijskih parametrov vezave [³H] N α MH na astrocite

3.2.1 Določitev celokupne vezave [³H] N α MH

100 μ L alikvotne celičnih membran astrocitov (~ 300 μ g) smo inkubirali v 125 μ L TE pufru 3 minute pri 25°C. Čez 3 minute smo dodali 25 μ L raztopine [³H] N α MH v koncentracijskem območju od 0,1 do 20 nM in dosegli celoten inkubacijski volumen 250 μ L. Po 30 minutni inkubaciji smo vezavo [³H] N α MH na receptor prekinili z vakuumsko filtracijo prebitnega radioliganda skozi acetatne filtre z velikostjo por 0,8 μ m. Filtre smo sprali s 5 mL ledeno hladnega Tris-HCl pufru in jih prenesli v epruvete za merjenje beta sevanja v scintilacijskem števcu. V vsako epruveto smo dodali 1,5 mL scintilacijske

tekočine Aquasol in v tekočinskem scintilacijskem števcu (MicroBeta Trilux, Perkin Elmer, ZDA) izmerili število razpadov izotopa na minuto (*cpm – counts per minute*).

3.2.2 Določitev nespecifične vezave [³H] N α MH

100 μ L alikvote celičnih membran astrocitov (~ 300 μ g) smo inkubirali v 100 μ L TE pufra pod enakimi pogoji kot za določitev celokupne vezave s tem, da smo alikvotom celičnih membran 9 min pred dodatkom [³H] N α MH dodali 25 μ L 10⁻⁴ M raztopino tioperamida, ki je selektivni antagonist histaminskih receptorjev H₃ in ima večjo afiniteto vezave nanje kot radioligand. Po 30 minutah inkubacije smo vezavo prekinili, kot je že opisano pri določitvi celokupne vezave in vzorcem izmerili radioaktivnost.

3.2.3 Inhibicija specifične vezave [³H] N α MH na astrocite

Za inhibicijske vezavne poskuse smo uporabili en agonist in dva antagonist histaminskega receptorja H₃:

- histamin (agonist histaminskih receptorjev),
- ciproksifan (selektivni H₃ antagonist)
- tioperamid (H₃ antagonist)

Najprej smo določili celokupno in nespecifično vezavo. Nato smo 100 μ L alikvote celičnih membran astrocitov (~ 300 μ g) inkubirali v 125 μ L TE pufra. Po treh minutah smo dodali 25 μ L raztopine inhibitorja v koncentracijskem območju 10⁻¹¹ - 10⁻⁶ M in 25 μ L 5 nM raztopine [³H] N α MH ter po prej že opisanem postopku prekinili vezavo in izmerili radioaktivnost. S prisotnostjo različnih koncentracij posameznega inhibitorja smo lahko določili delež inhibicije specifične vezave [³H] N α MH.

3.3 Računanje parametrov vezavnih študij

3.3.1 Določitev parametrov specifične vezave [³H] N α MH

Specifično vezavo [³H] N α MH na histaminski receptor H₃ smo določili računsko. Za vsako koncentracijo [³H] N α MH smo iz razlike med celokupno in nespecifično vezavo izračunali vrednost specifične vezave radioliganda (B), ki je znašala 69,7 % celokupne vezave radioliganda na receptor.

Iz pridobljenih podatkov iz tekočinskega scintilacijskega števca (radioaktivni razpad izotopa – cpm in učinkovitost števca) ter vsebnosti proteinov v vzorcih celičnih membran astrocitov smo s pomočjo spletne aplikacije GraphPad Radioactivity calculator (*GraphPad Software, San Diego, ZDA*) izračunali vrednosti vezanega [³H] NaMH v fmol/mg proteina za celokupno, nespecifično in specifično vezavo, za vsako posamezno koncentracijo radioliganda. Izračunane podatke smo uporabili za nadaljno obdelavo. Grafično smo prikazali specifično, nespecifično in celokupno vezavno radioliganda [³H] NaMH na receptor H₃ v odvisnosti od koncentracije radioliganda. Odvisnost razmerja specifično vezanega in prostega radioliganda (B/F) od koncentracije specifično vezanega [³H] NaMH (B) smo predstavili s Scatchardovim diagramom.

Merilo afinitete receptorja do radioliganda (K_D - ravnotežna konstanta disociacije kompleksa receptor-radioligand) in maksimalno število vezavnih mest na mg proteina (B_{max} - presečišče premice z absciso) smo določili z nelinearno regresijo.

Specifična vezava radioliganda eksponentno narašča do stanja ravnotežja, t.j. do nasičenja vezavnih mest na receptorjih. Stanje ravnotežja opisuje Langmuirova izoterma:

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

B.....specifična vezava radioliganda

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

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

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

3.3.2 Določitev parametrov inhibicije vezave [³H] NaMH

Za vsak vezavni poskus smo najprej določili specifično vezavo (razlika med celokupno in nespecifično). Nato smo za vsako uporabljeno koncentracijo inhibitorja izračunali odstotek inhibicije specifične vezave [³H] NaMH in narisali inhibicijsko krivuljo (inhibicija specifične vezava radioliganda v odvisnosti od logaritma koncentracije uporabljenega radioliganda). Za vsak posamezen inhibitor smo določili IC₅₀ (koncentracija hladnega liganda, ki povzroči 50% inhibicijo maksimalne specifične vezave) in ravnotežno

disociacijsko konstanto K_i za kompleks receptor – inhibitor, ki določa afiniteto receptorja do inhibitorja. Pri tem smo uporabili Cheng-Prusoffovo enačbo:

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

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

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

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

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

3.3.3 Določitev Hill-ovega koeficienta

Rezultate saturacijskih in inhibicijskih poskusov smo prikazali tudi s Hill-ovim grafom, ki prikazuje logaritem zasedenosti receptorja ($\log [B/(B_{\max} - B)]$) v odvisnosti od logaritma koncentracije radioliganda. Naklon premice je Hillov koeficient (n_H), ki smo ga izračunali s pomočjo Hillove enačbe:

$$n_H = \frac{\log[B/(B_{\max}-B)]}{\log[L]-\log IC_{50}}$$

B.....% inhibicije specifične vezave radioliganda

B_{max}.....100 % inhibicija specifične vezave radioliganda

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

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

Hillov koeficient je merilo kooperativnosti vezavnih mest. Vrednost n_H je enaka 1, ko se ligand kompetitivno in reverzibilno veže na homogeno populacijo vezavnih mest. Naklon premice, ki je >1, kaže na pozitivno kooperativnost vezave liganda na receptor, n_H < 1 pa nakazuje negativno kooperativnost ali prisotnost heterogenih vezavnih mest.

3.3.4 Obdelava podatkov

Za vsako koncentracijo uporabljenega radioliganda oz. inhibitorja smo pripravili tri do pet paralelnih vzorcev (membran astrocitov). Vse poskuse smo ponovili vsaj trikrat. Tako smo dobili podatke, ki so rezultat najmanj šestih meritev. Podatke smo obdelali z računalniškim programom GraphPad Prism, verzija 5.0 (GraphPad Software Inc., ZDA). Rezultate smo predstavili kot aritmetično sredino in določili standardno napako. Večina eksperimentalnih podatkov ni veliko odstopala od aritmetične sredine.

IV. REZULTATI

V prvem delu diplomske naloge smo optimizirali metodo vezave radioliganda na receptor. Pripravili smo ustrezen modelni sistem ter s spreminjanjem parametrov dosegli najugodnejše razmere za vezavo radioliganda na receptor. V drugem delu naloge smo z vezavnimi študijami določili vezavna mesta histaminskega receptorja H₃ v membranah astrocitov. Za označevanje vezavnih mest smo uporabili radioaktivno (s tricijem) označen [³H] N- α -metilhistamin ([³H] N α MH), agonist receptorjev H₃. Izvedli smo saturacijske in inhibicijske vezavne študije.

1. Optimizacija metode vezave radioliganda na receptor

Metoda vezave radioliganda na receptor (101) je na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo v uporabi že vrsto let. Za določitev vezavnih mest histaminskega receptorja H₃ s to metodo smo se odločili na podlagi rezultatov izražanja gena. Vezavni poskusi so predstavljali poseben izziv, saj smo na osnovi nizke stopnje izražanja pričakovali majhno število vezanih mest. Za osnovo so nam služile dolgoletne izkušnje z vezavnimi študijami ter podatki iz literature. Tako smo pri optimizaciji spreminjali naslednje parametre vezavnega poskusa: pripravo vzorcev (celični homogenat, izolirane membrane), koncentracijo proteinov, sestavo inkubacijskega medija, volumen inkubacijskega medija, inkubacijski čas, inkubacijsko temperaturo, volumen in koncentracijo radioliganda, vrsto filtrov, čas merjenja radioaktivnosti (Preglednica XI).

Začetni poskusi so potekali, kot sledi:

1. V prvem poskusu smo uporabili suspenzijo celih astrocitnih celic v raztopini fosfatnega pufra. Inkubirali smo jih 15 min z raztopino radioliganda.
2. V drugem poskusu smo zamenjali fosfatni pufer s pufrom Tris-EDTA. Uporabili smo 2 mg/mL celih astrocitnih celic, ki smo jih inkubirali 15 min s 25 μ L 1 nM radioliganda. Končni volumen inkubacijskega medija je bil 250 μ L. V paralelnem poskusu smo uporabljali membrane astrocitov koncentracije 1 mg/mL in jih inkubirali pri enakih pogojih kot cele celice.
3. V tretjem poskusu smo se odločili nadaljevati eksperimente z membranami astrocitov. Povečali smo inkubacijski volumen radioliganda na 50 μ L in čas inkubacije na 30 min. Končni volumen raztopine je znašal 500 μ L. Poleg tega smo

pri dveh slepih vzorcih poskusili uporabiti filtre s steklenimi vlakni. Izbrali smo koncentraciji radioliganda 0,5 nM in 2 nM.

4. V četrtem poskusu smo ovrgli uporabo steklenih filtrov, ker so adsorbirali celoten radioligand in posledično ni bilo nobenih rezultatov. Ker tudi večji volumen ni izkazal nikakršnih sprememb, smo ponovno zmanjšali volumen inkubacijskega medija na 250 μ L, kot tudi volumen radioliganda na 25 μ L. Nadaljevali smo s koncentracijo membran astrocitov 1 mg/mL.
5. V petem poskusu smo dvignili temperaturo inkubacije iz 25°C na 30°C in ponovno skrajšali čas inkubacije na 15 min. Pred dodatkom scintilacijske tekočine Aquasol smo posušili filtre. Po dodatku Aquasola smo filtre dobro premešali in jih pustili v temi 1h namesto običajnih 30 min.
6. V šestem poskusu smo ponovno znižali temperaturo inkubacije na 25°C in podaljšali čas inkubacije na 30 min. Povečali smo koncentracijo membran na 3 mg/mL. Čas raztapljanja filtrov v Aquasolu smo ponovno skrajšali na 30 min.
7. V sedmem poskusu smo uvedli dodatno stresanje vzorca z inkubiranim radioligandom. Poleg običajnega stresanja inkubacijskega medija smo neposredno po dodatku radioliganda oz. antagonista uvedli dodatno stresanje (vorteksiranje).
8. V osmem poskusu smo se odločili, da neuporabljenega vzorca ne zamrznemo suspendiranega v pufri, ampak ga prej centrifugiramo, supernatant odlijemo in usedlino zamrznemo na -70°C. Nadaljevali smo z relativno visokimi koncentracijami vzorca (~ 3 mg/mL) po metodi opisani v poglavju Materiali in metode.

Po vseh teh optimizacijskih poskusih smo se odločili, da v nadaljnjih poskusih uporabimo zgolj membrane astrocitov in ne celih celic. Nadaljevali smo z relativno visokimi koncentracijami le-teh (~ 3 mg/mL). Določili smo, da je optimalen volumen alikvotov glede na razmerje cena reagentov - učinkovitost vezave 250 μ L. Izbrali smo pufer, ki je bil največkrat uporabljen v literaturi za določanje histaminskega receptorja H₃ v različnih tkivih, t.j. Tris-EDTA. Določili smo okvirno koncentracijsko območje radioliganda od 0,1-20 nM, ki smo ga inkubirali z alikvoti vzorcev pri konstantni temperaturi 25°C in konstantnem času 30 min. Pri vseh nadaljnjih saturacijskih in inhibicijskih vezavnih študijah smo zagotovili enak modelni sistem za vse poskuse.

Preglednica XI: Optimizacija metode za izvedbo vezavnih študij na astrociatih novorojenih podgan. Prikazuje spreminjanje določenih parametrov, kot so volumen inkubacijskega medija (V), temperatura, čas inkubacije, filtri (A = acetatni, S = filtri iz steklenih vlaken), vzorec (C = celični homogenat, M = izolirane membrane) in puferske raztopine.

poskus	V (μ L)	temp. ($^{\circ}$ C)	čas inkubacije (min)	filtri	vzorec	pufer
1.	250	25	15	A	C	fosfatni
2.	250	25	15	A	C in M	Tris-EDTA
3.	500	25	30	A	M	Tris-EDTA
4.	250	25	30	S	M	Tris-EDTA
5.	250	30	15	A	M	Tris-EDTA
6.	250	25	30	A	M	Tris-EDTA
7.	250	25	30	A	M	Tris-EDTA
8.	250	25	30	A	M	Tris-EDTA

2. Določitev števila vezavnih mest receptorjev H₃ s saturacijsko vezavo [³H] N α MH

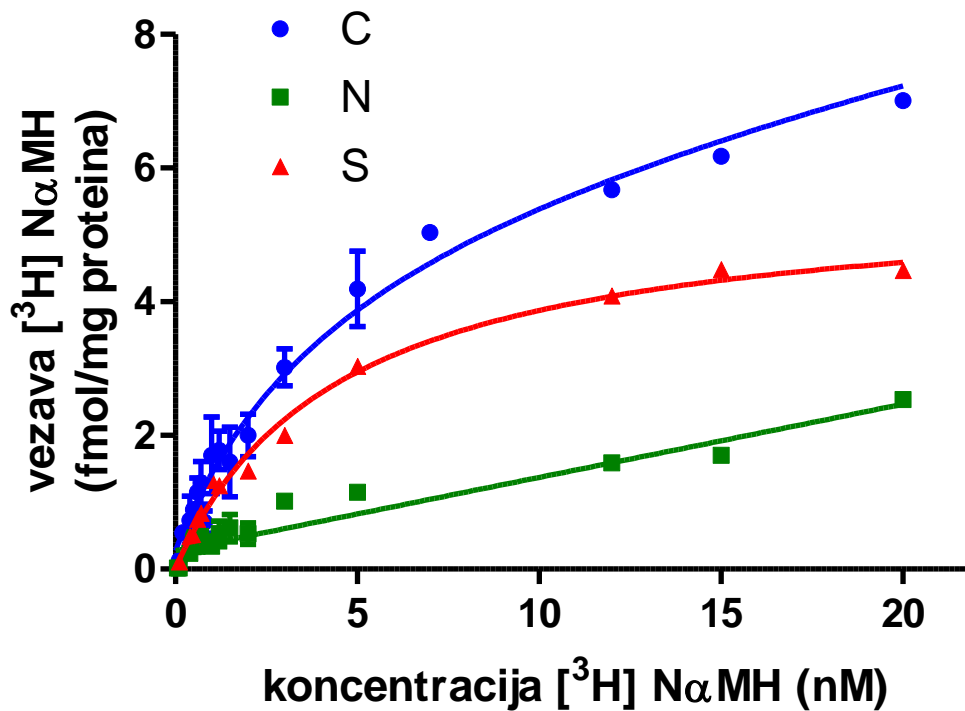
Z vezavnimi študijami na membranah astrocitov smo določali farmakološke lastnosti receptorja. Najprej smo inkubirali naraščajoče koncentracije radioliganda [³H] N α MH v koncentracijskem območju od 0,1 nM do 20 nM in tako dobili podatke o celokupni vezavi, saj ima [³H] N α MH visoko afiniteto do receptorja in zasede receptorska in nereceptorska vezavna mesta. Nespecifično vezavo oz. vezavo [³H] N α MH na nereceptorska vezavna mesta smo dobili z dodatkom prebitne raztopine hladnega antagonista receptorjev H₃ tioperamida (10⁻⁴ M). Iz razlike med celokupno in nespecifično vezavo smo izračunali specifično (receptorsko) vezavo, ki znaša 69,7 % celokupne vezave radioliganda na receptor.

V preglednici XII so podane srednje vrednosti za celokupno, nespecifično in specifično vezavo naraščajočih koncentracij [³H] N α MH na membrane astrocitov novorojenih podgan. Na podlagi specifične radioaktivnosti radioliganda ter učinkovitosti števca smo pretvorili vse vrednosti iz cpm (counts per minute) v fmol/mg proteina.

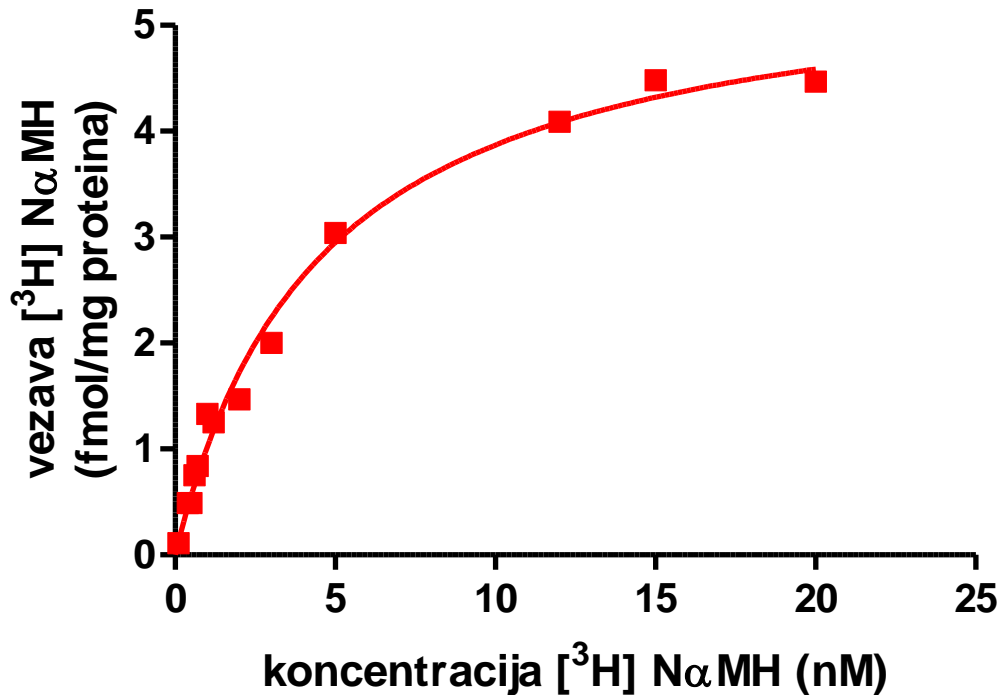
Preglednica XII: Srednje vrednosti za celokupno, nespecifično in specifično vezavo naraščajočih koncentracij radioliganda [³H] N α MH na membrane astrocitov novorojenih podgan v fmol/mg. Vrednosti specifično vezanega radioliganda (B) v fmol/mg proteina in razmerje med specifično vezanim in prostim radioligandom (B/F).

c (nM)	celokupna vezava (fmol/mg prot.)	nespecifična vezava (fmol/mg prot.)	specifična vezava (B) (fmol/mg prot.)	B/F
0,1	0,13000	0,02000	0,110	0,100
0,4	0,73000	0,24000	0,490	1,225
0,5	0,89250	0,403333	0,490	0,980
0,6	1,14667	0,39500	0,752	1,253
0,7	1,29000	0,45000	0,840	1,200
1,0	1,70500	0,34000	1,330	1,330
1,2	1,77667	0,53000	1,250	1,042
2,0	2,00000	0,53000	1,470	0,735
3,0	3,02000	1,02000	2,000	0,667
5,0	4,19333	1,15000	3,040	0,608
12,0	5,68000	1,59000	4,090	0,341
15,0	6,18000	1,70000	4,480	0,229
20,0	7,01000	2,54000	4,470	0,223

Rezultate meritev, zbrane v preglednici, prikazujemo tudi grafično. Narisali smo graf celokupne, specifične in nespecifične vezave [³H] N α MH v odvisnosti od njegove naraščajoče koncentracije v vzorcu (Slika 8 in Preglednica XII). Specifična vezava [³H] N α MH v koncentracijskem območju od 0,1-20 nM je dosegla plato pri približno 15 nM (nasičenje vezavnih mest). Vezava je torej nasitljiva in reverzibilna. Omejeno število vezavnih mest na receptorju dokazuje, da so na astrocitih možganske skorje prisotna receptorska vezavna mesta. Na račun nespecifične vezave celokupna in nespecifična vezava naraščata linearno z naraščanjem koncentracije radioliganda (Slika 9). Specifično vezavo [³H] N α MH prikazujemo še ločeno (Slika 9).



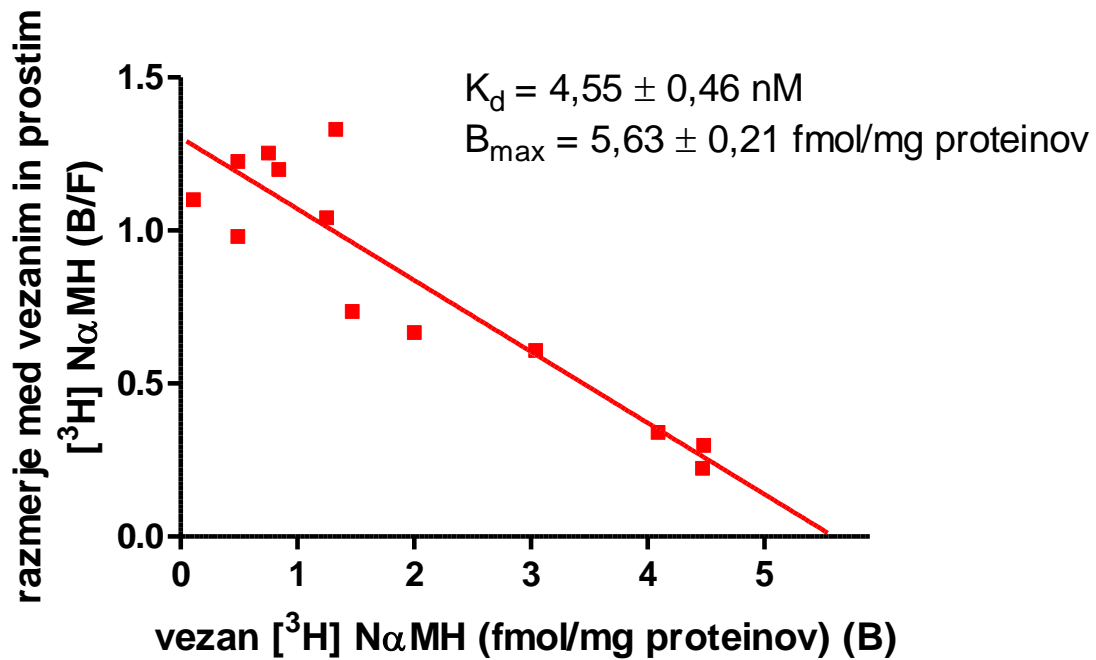
Slika 8: Vežava [³H] N α MH na membrane astrocitov v odvisnosti od njegove koncentracije. Membrane astrocitov smo inkubirali z [³H] N α MH (0,1-20 nM) v pufru Tris-EDTA, pH = 7,4, v odsotnosti (celokupna vezava) ali prisotnosti (nespecifična vezava) 10⁻⁴ M tioperamida. Vrednosti specifične vezave predstavljajo razliko med celokupno in nespecifično vezavo radioliganda. Podatke o vezavi smo dobili iz meritve v scintilacijskem števcu v cpm proteina. Na podlagi specifične radioaktivnosti radioliganda ter učinkovitosti števca smo jih pretvorili v fmol/mg proteina. Rezultati so statistično obdelani in prikazani kot aritmetična sredina \pm standardna napaka aritmetične sredine najmanj šestih neodvisnih poskusov, narejenih v treh paralelkah. C: celokupna vezava, N: nespecifična vezava, S: specifična vezava.



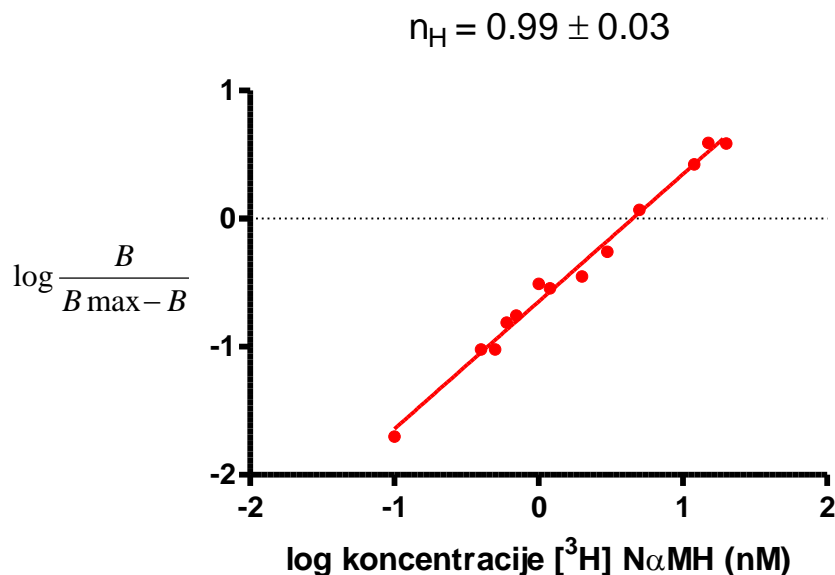
Slika 9: Specifična vezava [³H] N α MH na histaminski receptor H₃ membran astrocitov v odvisnosti od koncentracije radioliganda v raztopini Tris-EDTA pufru, pH = 7,4. Rezultati so statistično obdelani in prikazani kot aritmetična sredina \pm standardna napaka aritmetične sredine najmanj šestih neodvisnih poskusov, narejenih v treh paralelkah.

Scatchardova analiza podatkov specifične vezave [³H] N α MH na membrane astrocitov, ki predstavlja razmerje med specifično vezanim in prostim radioligandom (B/F) v odvisnosti od vezanega radioliganda (B), je prikazana v preglednici XII. Iz podatkov je razvidno, da je prisotna homogena populacija vezavnih mest z visoko afiniteto za [³H] N α MH. Maksimalno število vezavnih mest (B_{\max}) je $5,63 \pm 0,21$ fmol/mg proteina (sečišče premice z absciso), ravnotežna disociacijska konstanta kompleksa receptor-radioligand (K_D) pa je $4,55 \pm 0,46$ nM (naklon premice) (Slika 10 in Preglednica XII).

Iz podatkov saturacijskih poskusov smo narisali tudi Hillov graf in izračunali Hillov koeficient specifične vezave [³H] N α MH (nH), ki znaša $0,99 \pm 0,03$ in potrjuje prisotnost homogene populacije vezavnih mest (Slika 11).



Slika 10: Scatchardova krivulja prikazuje razmerje med specifično vezanim in prostim [³H] N α MH (B/F) v odvisnosti od specifično vezanega radioliganda (B). K_D : ravnotežna konstanta disociacije kompleksa receptor-radioligand (naklon premice), B_{max} : maksimalno število specifičnih vezavnih mest vezave [³H] N α MH na enoto proteina membrane (sečišče premice z absciso). Točke predstavljajo vrednosti najmanj šestih neodvisnih poskusov, narejenih v treh paralelakah.



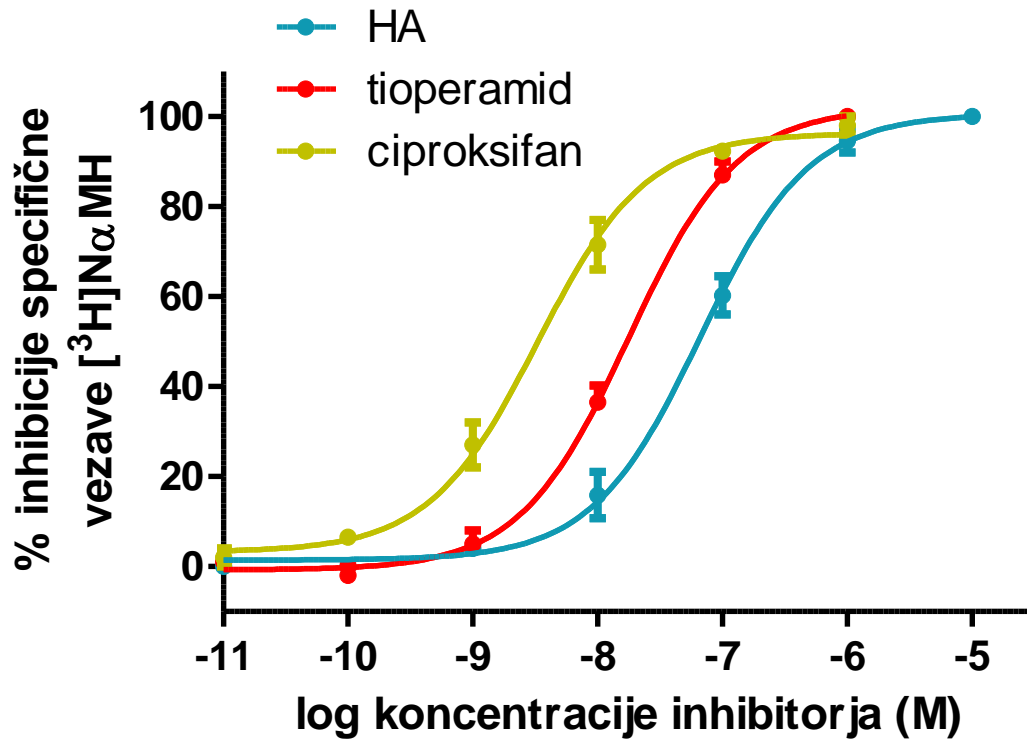
Slika 11: Hillova krivulja specifične vezave [³H] N α MH na membrane astrocitov, ki prikazuje logaritem zasedenosti receptorjev v odvisnosti od logaritma koncentracije liganda. Vrednost B predstavlja specifično vezan [³H] N α MH, B_{max} pa maksimalno število vezavnih mest za [³H] N α MH. Naklon premice predstavlja Hillov koeficient (n_H), ki je izračunan s pomočjo Hillove enačbe.

3. Specifičnost vezave [³H] N- α -metilhistamina na histaminski receptor H₃

Z uporabo antagonistov oz. inverznih agonistov (ciproksifan, tioperamid) in agonista (histamin) smo v inhibicijskih vezavnih študijah potrdili nedvoumnost vezave [³H] N α MH na funkcionalne histaminske receptorje H₃ na membranah astrocitov podgan (Slika 12). Tako smo dokazali identičnost vezavnih mest na receptorju. 5 nM [³H] N α MH smo dodali serijo specifičnih inhibitorjev histaminskega receptorja H₃ v koncentracijskem intervalu od 10⁻¹¹ M do 10⁻⁶ M in opazovali izpodrinjanje radioliganda z receptorja.

Inhibitor ima večjo afiniteto vezave na receptor in tako izpodriva specifično vezani radioligand. Od koncentracije dodanega inhibitorja je odvisen delež vezave radioliganda na receptor. Iz dobljenih podatkov o vezavi smo narisali delež specifične vezave [³H] N α MH v odvisnosti od koncentracije inhibitorja. Za vsak inhibitor smo odčitali IC₅₀ (molarna koncentracija hladnega liganda, ki izpodrine 50 % specifično vezanega radioliganda). S pomočjo Cheng-Prusoffove enačbe smo izračunali ravnotežno disociacijsko konstanto kompleksa receptor-inhibitor (K_i), ki predstavlja merilo afinitete inhibitorja do vezavnih mest na receptorju. (Slika 13 in Preglednica XIII).

Iz inhibicijskih krivulj agonista histamina in antagonistov/inverznih agonistov H₃ tioperamida in ciproksifana smo odčitali vrstni red sposobnosti zaviranja specifične vezave. Najmočnejši uporabljen inhibitor histaminskega receptorja H₃ na membranah astrocitov je ciproksifan, saj pri določeni koncentraciji izpodrine največji delež specifično vezanega [³H] N α MH (K_i = 1,56 nM), sledita mu tioperamid (K_i = 8,30 nM) in z najmanjšo afiniteto do receptorskih vezavnih mest, histamin (K_i = 31,4 nM).

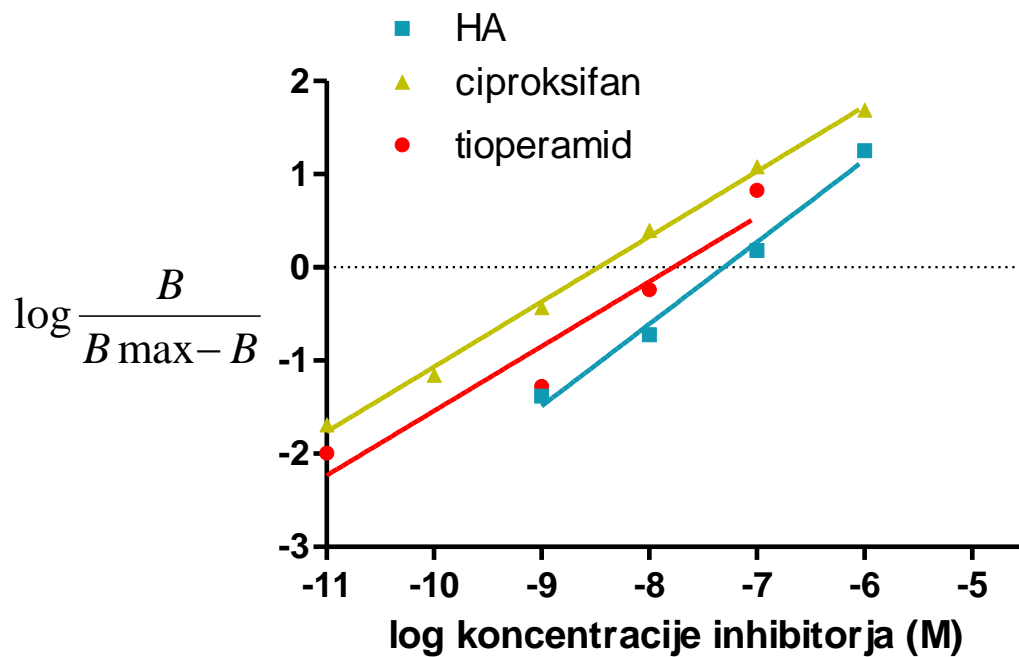


Slika 12: Inhibicija specifične vezave [³H] N α MH na membranah astrocitov v odvisnosti od različnih koncentracij agonista (histamin) in antagonistov (tioperamid, ciproksifan) histaminskih receptorjev v raztopini Tris-EDTA pufru, pH = 7,4. Rezultati so statistično obdelani in prikazani kot aritmetična sredina \pm standardna napaka aritmetične sredine najmanj šestih meritev.

Preglednica XIII: Vrednosti IC₅₀ (molarna koncentracija hladnega liganda, ki izpodrine 50 % specifično vezanega radioliganda), pK_i (- log ravnotežne disociacijske konstante K_i kompleksa receptor-inhibitor) in n_H (Hillov koeficient) za posamezne inhibitorje v puferski raztopini Tris-EDTA pri koncentraciji [³H] N α MH 5 nM.

inhibitor	IC ₅₀ (nM)	pK _i	n _H
tioperamid	17,5	8,08	0.69 \pm 0.14
histamin	66,4	7,50	0.88 \pm 0.07
ciproksifan	3,3	8,81	0.70 \pm 0.02

Za vsak uporabljen agonist in antagonist smo s programom narisali tudi Hillovo krivuljo, kjer smo nanašali $\log(B/B_{\max}-B)$ v odvisnosti od \log koncentracije inhibitorja. S pomočjo psevdo Hillove enačbe smo izračunali Hillove koeficiente (n_H) za vsak uporabljen inhibitor. Vrednosti Hillovih koeficientov so za agonista histamin 0,88, za antagonist ciproksifan in tioperamid pa 0,70 in 0,69. (Slika 13 in Preglednica XIII). Vrednosti Hillovih koeficientov agonista in antagonistov kažejo na heterogeno naravo interakcij z vezavnimi mesti v membrani astrocitnih celic novorojene podgane.



Slika 13: Hillove krivulje agonista (histamin) in antagonistov (tioperamid in ciproksifan), uporabljenih pri inhibicijskih poskusih. Naklon premic predstavlja Hillov koeficient (n_H), ki je za vsak inhibitor izračunan s pomočjo psevdo Hillove enačbe. n_H podajamo v Preglednici XIV.

V. RAZPRAVA

Histaminergični sistem v osrednjem živčevju uravnava številne procese v telesu, kot so cikel spanja-budnosti, energetska in endokrino homeostazo, sinaptično plastičnost in učenje (16). Ta širok spekter učinkov v telesu prenaša histamin preko štirih specifičnih histaminskih receptorjev, na katere se veže z različno afiniteto (18). Histaminski receptorji spadajo v družino 7-transmembranskih receptorjev, ki se sklapljajo z regulatornimi proteini G. Aktivacija receptorjev preko specifičnih proteinov G sproži številne znotrajcelične signalne poti in kaskado reakcij, ki pripeljejo do učinka histamina (102).

Poleg živčnih celic predstavljajo pomembne tarčne celice histaminergičnega sistema tudi astrociti – najštevilnejše celice glije. Kulture astrocitov iz možganov glodalcev izražajo histaminske receptorje H₁ in H₂ (89, 92), kar nakazuje funkcionalno vlogo histamina v teh celicah. Histamin uravnava rast in proliferacijo astrocitov, aktivira glikogenolizo in aktivira znotrajcelični kalcij, ki spodbuja izločanje gliotransmitorjev. Udeležen je pri regulaciji nekaterih astrocitnih citokinov in nevrotrofičnih dejavnikov, astrociti pa skrbijo za deaktivacijo in odstranjevanje zunajceličnega histamina (89, 100).

Prisotnost histaminskega receptorja H₃ na astrociilih je bila dokazana šele nedavno. Rezultati kvantitativne reakcije verižnega pomnoževanja (PCR), izvedene na astrociilih novorojenih podgan, so potrdili izražanje sporočilne RNA ne samo za podtipe histaminskih receptorjev H₁ in H₂, pač pa tudi za podtip H₃. Analiza PCR je pokazala, da je delež izražene receptorja H₁ in H₂ približno enak, receptorja H₃ pa je sedem do osemkrat manj. (89). V pričujoči nalogi smo z vezavnimi študijami nadaljevali analizo tega receptorja in mu določili pomembne molekularno-farmakološke lastnosti. Želeli smo identificirati in karakterizirati vezavna mesta histaminskega receptorja H₃ na membranah astrocitov tri dni starih podgan. Kot ligand pri študiji smo uporabili specifični agonist, s tricijem označen N- α -metilhistamin, ki se selektivno veže na receptorje H₃.

V prvem delu diplomske naloge smo optimizirali metodo vezave radioliganda na receptor. Pri tem so nam bile v pomoč dolgoletne izkušnje z vezavnimi študijami ter podatki iz literature. Pri optimizaciji smo spreminjali različne parametre vezavnega poskusa, kot so priprava vzorcev in koncentracija proteina, sestava inkubacijskega medija, inkubacijski čas in temperatura ter volumen in koncentracija radioliganda (Preglednica XI). Uspeli smo

pripraviti ustrezen modelni sistem ter doseči optimalno vezavo radioliganda na receptor, kar nam je v nadaljevanju omogočilo doseči zastavljen cilj.

Rezultati saturacijskih poskusov so pokazali, da je vezava [³H] N α MH na membrane astrocitov v koncentracijskem območju od 0,1 nM do 20 nM reverzibilna in specifična (Slika 8 in Slika 9). Nasičenje vezavnih mest smo dosegli pri koncentraciji radioliganda 15 nM. S pomočjo linearne Scatchardove krivulje, kjer je zveza med razmerjem specifično vezanega in prostega radioliganda ter specifično vezanim radioligandom premica in z uporabo metode nelinearne regresije specifične vezave radioliganda, smo potrdili prisotnost homogene populacije vezavnih mest z maksimalno gostoto vezavnih mest (B_{\max}) $5,63 \pm 0,21$ fmol/mg proteinov. Nizka vrednost B_{\max} v primerjavi z B_{\max} receptorja H₁ (281 53 fmol/mg proteina) in H₂ (59 ± 5 fmol/mg proteina) (92) se deloma sklada z rezultati kvantitativne PCR analize, izvedene na astrociilih (89). Vrednost ravnotežne disociacijske konstante (K_D) je $4,55 \pm 0,46$ nM, kar kaže na relativno visoko afiniteto [³H] N α MH do receptorskih vezavnih mest (Slika 10). Hillov koeficient specifične vezave [³H] N α MH se značilno ne razlikuje od 1, kar potrjuje prisotnost homogene populacije receptorskih mest (Slika 11).

Raziskave, ki omogočajo boljše poznavanje histaminskega receptorja H₃ v možganih, večinoma potekajo na receptorjih, izraženih v različnih celicah ali celičnih linijah s pomočjo transfekcije. Podatkov o vezavnih lastnostih nativnega receptorja je v literaturi malo, kar otežuje primerjavo naših rezultatov. Tako je Korte s sodelavci s pomočjo [³H] N α MH potrdil prisotnost homogene populacije visoko afinitetnih vezavnih mest receptorja H₃ v membranah možganskih tkiv morskega prašička. Maksimalno število vezavnih mest (B_{\max}) je bilo 41 fmol/mg proteina, ravnotežna disociacijska konstanta (K_D) pa je bila 0,4 nM (103). V študiji, kjer so primerjali izražanje histaminskega receptorja H₃ v možganih miši in morskih prašičkov z uporabo [³H] N α MH, so prav tako ugotovili prisotnost homogene populacije vezavnih mest na receptorju. Z uporabo metode nelinearne regresije so pri miših določili vrednost $K_D = 0,75$ nM, pri morskih prašičkih pa 1,2 nM. Konstanti sta približno petkrat nižji od tistih, ki smo jih določili v naši študiji. B_{\max} pri obeh živalskih vrstah je bil blizu 60 fmol/mg proteina (104). Cumming in Vincent (105) sta s pomočjo kvantitativne avtoradiografije in Scatchardove analize določala vezavo [³H] N α MH po različnih področjih možganov podgane. Najvišjo vrednost B_{\max} sta določila v nukleusu akumbensu (107 fmol/mg proteina) in v striatumu (58 fmol/mg), afiniteta vezave

radioliganda pa je znašala okoli 4 nM. Tudi študija Kathmana in sodelavcev je v homogenatih možganske skorje podgane potrdila prisotnost vezavnih mest proučevanega receptorja s $K_D = 0,7$ nmol/l in $B_{max} = 98$ fmol/mg proteina (106). V homogenatih možganov je torej desetkrat več vezavnih mest kot v izoliranih membranah astrocitov, afiniteta vezave radioaktivno označenega liganda pa je odvisna od uporabljenega modelnega sistema in je primerljiva z našimi rezultati. V primerjalni študiji, izvedeni na rekombinantnih celicah insektov Sf9, so na izoliranih membranah izmerili K_D za humani receptor H₃, ki je znašal $0,62 \pm 0,21$ nM in $B_{max} 0,62 \pm 0,02$ pmol/mg. K_D za podganji receptor H₃ je bil $1,37 \pm 0,36$ nM, B_{max} pa $0,48 \pm 0,03$ pmol/mg. V naši študiji smo na membranah astrocitov ugotovili približno stokrat nižjo maksimalno število vezavnih mest ($B_{max} = 0,0056 \pm 0,0002$ nM), vendar pa je potrebno poudariti, da so ti receptorji prisotni na izoliranih membranah celic, ki smo jih gojili v primarni kulturi brez manipulacij (107). V drugi študiji so primerjali značilnosti rekombinatnega humanega in podganjega histaminskega receptorja H₃. S pomočjo radioliganda [¹²⁵I] iodoproksifana so na rekombinantnih celicah HEK293 določili vrednost K_D humanega histaminskega receptorja H₃, ki je znašala $60 \pm 9,9$ pM, medtem ko je bila vrednost $B_{max} 950 \pm 160$ fmol/mg proteina. Iodoproksifan je zelo močan selektivni histaminski antagonist H₃, njegova afiniteta do receptorja je bistveno višja od afinitete, ki jo izkazuje N α MH, kar lahko razložimo s preferenčno vezavo antagonista na receptor (108). Kljub višji afiniteti z jodom označenega liganda do histaminskega receptorja H₃ na nekaterih modelnih sistemih, smo se mi odločili za uporabo [³H] N α MH, saj substanca predstavlja zlati standard pri določevanju tega receptorja, hkrati pa je optimizacija in izvedba poskusov s tem ligandom lažja.

V drugem delu diplome smo z inhibicijskimi vezavnimi študijami nedvoumno dokazali prisotnost vezavnih mest histaminskega receptorja H₃ na membranah astrocitov. Specifično vezan [³H] N α MH smo izpodrivali s selektivnimi inhibitorji - z agonistom histaminom in dvema antagonistoma (tioperamid in ciproksifan). Tioperamid je močan antagonist histaminskih receptorjev H₃ in inverzni agonist histaminskega receptorja H₄ (109), ciproksifan pa je ekstremno močan antagonist/inverzni agonist histaminskega receptorja H₃ (110). Tioperamid smo uporabili kot selektivni antagonist receptorja H₃, saj je študija na astrocitih pokazala odsotnost receptorja H₄, prav tako je ciproksifan v tej študiji deloval kot zelo selektiven in močan antagonist in ne kot inverzni agonist receptorja H₃ (89). Oba

antagonista namreč nista imela (stimulatornega) vpliva na s forskolinom spodbujeno sintezo cAMP, hkrati pa sta popolnoma zavrla delovanje imetita, selektivnega agonista proučevanega receptorja.

Vse tri substance so delovale inhibitorno in kompetitivno (Slika 12), kar smo ugotavljali na podlagi ravnotežne disociacijske konstante za posamezen kompleks receptor-inhibitor (K_i), ki je merilo afinitete vezavnih mest do inhibitorja (Preglednica XIII). Pri višjih koncentracijah (10^{-6} M) so vsi trije uporabljeni inhibitorji stoddstotno izpodrinili specifično vezan radioligand z receptorskih vezavnih mest. Moč izpodrivanja specifično vezanega [³H] N α MH z membran astrocitov pada v naslednjem vrstem redu: ciproksifan > tioperamid > histamin. Vrstni red izpodrivanja specifično vezanega radioliganda, kjer je imel največjo moč specifičen antagonist, je dokaz, da se je [³H] N α MH res vezal na funkcionalni histaminski receptor H₃.

Antagonisti se na receptorska vezavna mesta vežejo z večjo afiniteto kot agonisti. Večina receptorjev se nahaja v ravnotežju med dvema stanjema – med aktivno in neaktivno obliko, ki lahko prehajata ena v drugo. Receptor v aktivnem stanju je sklopljen s proteinom G, medtem ko pri neaktivni obliki receptor še ni sklopljen in pri vezavi agonista potrebuje še en korak – sklopitev. Antagonisti se velikokrat vežejo z enako afiniteto na neaktivno in aktivno obliko, ker ne prepoznajo različnih stanj receptorja, medtem ko se agonisti preferenčno vežejo na aktivno, s proteinom G sklopljeno obliko receptorja. To potrjujejo tudi rezultati inhibicijskih poskusov, saj imata oba antagonista (ciproksifan in tioperamid) večjo afiniteto vezave kot agonist (histamin) (Slika 12). Inhibicijska krivulja antagonist receptorjev H₃ ciproksifana je rahlo položnejša, kljub temu da ima največjo afiniteto do vezavnih mest na receptorju. Položnejša krivulja pomeni heterogeno naravo interakcij z vezavnimi mesti na receptorju, kar pomeni, da ima histaminski receptor H₃ mesta z različnimi afinitetnimi stanji, kamor se lahko vežejo nekateri ligandi. Različna afinitetna stanja receptorskih vezavnih mest sicer ustrezajo različnim molekularnim oblikam ali konformacijam receptorja.

Za vse uporabljene inhibitorje specifične vezave radioliganda smo narisali Hillove krivulje in izračunali Hillove koeficiente (n_H) (Slika 13). Vrednost Hillovih koeficientov agonista je blizu 1 (0,88), iz česar sklepamo na interakcijo agonista s homogenimi vezavnimi mesti (mesta, ki imajo do liganda enako afiniteto). Vrednosti n_H antagonistov so manjše od 1 (0,69 in 0,70), iz česar lahko sklepamo, da se antagonisti vežejo na mesta z različnimi

afinitetami do ligandov. Na konformacijske oblike receptorja H₃ lahko vpliva ionska sestava inkubacijskega medija. Tako sta Clark in Hill (111) na homogenatih možganske skorje podgane ugotovila, da se tioperamid veže na heterogeno populacijo vezavnih mest samo v Tris-HCl pufri, medtem ko heterogenosti vezave nista določila v 50 mM Na/K fosfatnem pufri. Za razjasnitev omenjene lastnosti antagonistov so potrebne nadaljne študije.

Ker so vsi navedeni kriteriji za identifikacijo in karakterizacijo receptorskih mest izpolnjeni, lahko nedvoumno trdimo, da so vezavna mesta [³H] N α MH v membrani astrocitov novorojenih podgan histaminski receptorji podtipa H₃.

VI. SKLEP

Rezultate diplomskega dela lahko povzamemo z naslednjimi trditvami:

1. Metoda vezave radioliganda na receptor je primerna metoda za določitev vezavnih mest histaminskega receptorja H₃. S spreminjanjem parametrov vezavnega poskusa smo dosegli optimalne pogoje za specifično vezavo izbranega radioliganda na receptorska vezavna mesta. Študija je potekala na izoliranih membranah astrocitov možganske skorje novorojenih podgan pri koncentraciji od 1-3 mg proteina/mL membranskega homogenata. Alikvote membran (250 μ L) smo inkubirali 30 minut pri 25°C v Tris-EDTA pufru skupaj z različnimi koncentracijami radioliganda [³H] N- α -metilhistamina in hladnih ligandov.
2. Na astrocitih možganske skorje podgane v primarni kulturi so prisotni histaminski receptorji H₃. Z vezavnimi študijami z uporabo radioliganda [³H] N- α -metilhistamina, agonista histaminskih receptorjev H₃, smo potrdili prisotnost vezavnih mest tega receptorja na astrocitih. Vezava radioliganda na receptor je saturacijski in reverzibilen proces. Dokazali smo prisotnost homogene populacije vezavnih mest z ravnotežno disociacijsko konstanto (K_D) $4,55 \pm 0,46$ nM in maksimalnim številom vezavnih mest (B_{max}) $5,63 \pm 0,21$ fmol/mg proteina. Hillov koeficient specifične vezave (nH) znaša $0,99 \pm 0,03$ in potrjuje homogenost vezavnih mest.
3. Z inhibicijskimi vezavnimi poskusi smo dokazali, da so vezavna mesta [³H] N- α -metilhistamina identična s histaminskimi receptorji H₃. Selektivna antagonist (ciproksifan, tioperamid) in agonist (histamin) so v inhibicijskih poskusih zavirali vezavo radioliganda na specifična vezavna mesta. Najmočnejši inhibitor je bil ciproksifan ($K_i = 1,56$ nM), sledila sta mu tioperamid ($K_i = 8,30$ nM) in histamin ($K_i = 31,4$ nM). Hillov koeficient agonista je blizu 1 (0,88), kar potrjuje interakcije agonista s homogenimi vezavnimi mesti, medtem ko nizke vrednosti Hillovega koeficienta antagonistov (0,69 in 0,70) nakazujejo vezavo na mesta z različnimi afinitetami do ligandov.

VII. VIRI IN LITERATURA

1. Lindsay BH, Leurs R: Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 2006; 14 (Histamine): 249-265.
2. Lemke TM, Williams DA, Roche VF, Zito SW: Foye's Principles of Medical Chemistry, 6th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore 2008: 1004-27.
3. Emanuel MB: Histamine and the antiallergic antihistamines: a history of their discoveries. Clin. Exp. Allergy 1999; 29 (suppl. 3), 1-11; (discussion 12).
4. Jones BL, Kearns GL: Histamine: New Thoughts About a Familiar Mediator. Clinical Pharmacology & Therapeutics 2011; 89 (2): 189-97.
5. Nobelprize.org, http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/ (9.1.2012)
6. Rang HP, Dale MM, Flower RJ: Rang & Dale's Pharmacology, 6th Edition, Churchill Livingstone, Oxford, 2007: 8-53, 213-4.
7. MacGlashan D Jr.: Histamine: a mediator of inflammation. J. Allergy Clin. Immunol. 2003; 112: 53-9.
8. Guyton AC, Hall JE: Textbook of Medical Physiology, 11th Edition, Elsevier Saunders, Philadelphia, 2006: 57-71, 555-71.
9. Maslinski C: Histamine and its metabolism in mammals. Part II: Catabolism of histamine and histamine liberation. Agents Actions 1975; 5: 183-225.
10. Rangachari PK: The fate of released histamine: reception, response and termination. Yale J. Biol. Med. 1998; 71: 173-82.
11. Yan L, Galinsky RE, Bernstein JA, Liggett SB, Weinshilboum RM: Histamine N-methyltransferase pharmacogenetics: association of a common functional polymorphism with asthma. Pharmacogenetics 2000; 10: 261-6.
12. Janes SM, Palcic MM, Scaman CH, Smith AJ, Brown DE, Dooley DM, Mure M, Klinman JP: Identification of topaquinone and its consensus sequence in copper amine oxidases. Biochemistry 1992; 31 (48): 12147-54.
13. Mu D, Janes SM, Smith AJ, Brown DE, Dooley DM, Klinman JP: Tyrosine codon corresponds to topa quinone at the active site of copper amine oxidases. J. Biol. Chem. 1992; 267 (12): 7979-82.
14. Schwelberger HG, Bodner E: Purification and characterization of diamine oxidase from porcine kidney and intestine. Biochim Biophys Acta 1997; 1340: 152-64.
15. Lipnik-Štangelj M: Vpliv histamina na sproščanje živčnega rastnega dejavnika iz astrocitov možganske skorje. Doktorska disertacija, Medicinska fakulteta, 1999.
16. Haas H, Panula P: The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. Nat. Rev. Neurosci. 2003; 4: 121-30.
17. Schwartz JC, Arrang JM, Garbarg M, Pollard H, Ruat M: Histaminergic transmission in the mammalian brain. Physiol. Rev. 1991; 71: 1-51.
18. Akdis CA, Simons FE: Histamine receptors are hot in immunopharmacology. Eur. J. Pharmacol. 2006; 533, 69-76.
19. Milligan G, Bond RA, Lee M: Inverse agonism: pharmacological curiosity or potential therapeutic strategy? Trends Pharmacol. Sci. 1995; 16: 10-3.

20. Simons F: Advances in H₁-antihistamines. *N Engl J Med* 2004; 351: 2203-17.
21. Hill S et al.: International Union of Pharmacology. XIII. Classification of Histamine Receptors. *Pharmacological Review* 1997; 49: 253-78.
22. Schmelz M, Schmidt R, Bickel A, Handwerker HO, Torebjörk HE: Specific C-receptors for itch in human skin. *J. Neurosci.* 1997; 17: 8003-8.
23. O'Bryne P, Inman M: Airway Hyperresponsiveness. *Chest* 2003; 123: 411-6.
24. Peters LJ, DVM, Kovacic JP: Histamine: metabolism, physiology, and pathophysiology with applications in veterinary medicine. *J. of Veterinary Emergency and Critical Care* 2009; 19(4): 311–328.
25. Black JW et al. *Nature* 1972; 236: 385.
26. Del Valle J, Gantz I: Novel insights into histamine H₂ receptor biology. *Am. J. Physiol.* 1997; 273: 987-96.
27. Seligmann BE, Fletcher MP, Gallin JI: Histamine modulation of human neutrophil oxidative metabolism, locomotion, degranulation, and membrane potential changes. *J. Immunol.* 1983; 130: 1902-09.
28. Jutel M et al.: Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H₁ and H₂ receptors. *Nature* 2001; 413: 420-5.
29. Benarroch EE: Histamine in the CNS: Multiple functions and potential neurologic implications. *Neurology* 2010; 75 (16): 1472-9.
30. Nakaya N, Takeuchi N, Kondo K: Immunohistochemical localization of histamine receptor subtypes in human inferior turbinates. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004; 113: 552–7.
31. Morse K et al.: Cloning and Characterization of Novel Human Histamine Receptor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2001; 296: 1058-66.
32. Akdis CA, Blaser K: Histamin in the immune regulation of allergic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 112: 15-22.
33. Strakhova MI et al.: Localization of histamine H₄ receptors in the central nervous system of human and rat. *Brain Res.* 2009; 1250: 41-48.
34. Hofstra CL, Desai PJ, Thurmond RL, Fung-Leung WP: Histamine H₄ receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 305 (3): 1212-21.
35. Gutzmer R, Mommert S, Gschwandtner M, Zwingmann K, Stark H, Werfel T: The histamine H₄ receptor is functionally expressed on T(H)₂ cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009; 123: 619-25.
36. de Esch IJ, Thurmond RL, Jongejan A, Leurs R: The histamine H₄ receptor as a new therapeutic target for inflammation. *Trends Pharmacol. Sci.* 2005; 26: 462-9.
37. Lipper U et al.: Human skin mast cells express H₂ and H₄, but not H₃ receptors. *J. Invest. Dermatol.* 2004; 123: 116-23.
38. Thurmond RL et al.: A potent and selective histamine H₄ receptor antagonist with anti-inflammatory properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004; 309: 404-13.
39. Van Ganse E, Kaufman L, Derde MP, Yernault JC, Delaunois L, Vincken W: Effects of antihistamines in adult asthma: a meta-analysis of clinical trials. *Eur Respir J* 1997; 10: 2216-24.

40. Dunford PJ, O'Donnell N, Riley JP, Williams KN, Karlsson L, Thurmond RL: The histamine H₄ receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* 2006; 176: 7062-70.
41. Gujardo JR et al.: Altered gene expression profiles in nasal respiratory epithelium reflect stable versus acute childhood asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115: 243-51.
42. Dunford PJ, Williams KN, Desai PJ, Karlsson L, McQueen D, Thurmond RL: Histamine H₄ receptor antagonists are superior to traditional antihistamines in the attenuation of experimental pruritus. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007; 119: 176-183.
43. Yamaura K, Oda M, Suwa E, Suzuki M, Sato H, Ueno K: Expression of histamine H₄ receptor in human epidermal tissues and attenuation of experimental pruritus using H₄ receptor antagonist. *J. Toxicol. Sci.* 2009; 34: 427-31.
44. Estelle F, Simons R, Simons KJ: Histamine and H₁-antihistamines: Celebrating a century of progress, *J. of Allergy and Clin. Immun.* 2011; 128 (6): 1139-50.
45. Haas HL Sergeva OA, Selbach O: Histamine in the nervous system. *Physiol. Rev.* 2008; 88 (3): 1183-1241.
46. Lovenberg TW et al.: Cloning and functional expression of the human histamine H₃ receptor. *Mol. Pharmacol.* 1999; 55: 1101-7.
47. Drutel G et al.: Identification of rat H₃ receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. *Mol. Pharmacol.* 2001; 59: 1-8.
48. Pollard H et al.: A detailed autoradiographic mapping of histamine H₃ receptors in rat brain areas. *Neuroscience* 1993; 52: 169-89.
49. Chazot PL et al.: Immunological identification of the mammalian H₃ histamine receptor in the mouse brain. *Neuroreport* 2001; 12: 259-62.
50. Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC: Autoinhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H₃) of histamine receptor. *Nature* 1983; 302: 832-7.
51. Brandon EP, Idzerda RL, McKnight GS: PKA isoforms, neural pathways, and behaviour: making connection. *Curr Opin Neurobiol.* 1997; 7(3): 397-403.
52. Leurs R, Bakker RA, Timmerman H, de Esch IJ: The histamine H₃ receptor: from gene cloning to H₃ receptor drugs. *Nature Reviews* 2005; 4 (2): 107-20.
53. Bongers G, Bakker RA, Leurs R. Molecular aspects of the histamine H₃ receptor. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73(8): 1195-204.
54. Rouleau A et al.: Histamine H₃-receptor-mediated [³⁵S]GTP γ S binding: evidence for constitutive activity of the recombinant and native rat and human H₃ receptors. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 135: 383-92.
55. Silver RB et al.: Coupling of histamine H₃ receptors to neuronal Na⁺/H⁺ exchange: a novel protective mechanism in myocardial ischemia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2001; 98: 2855-9.
56. Silver RB et al.: Decreased intracellular calcium mediates the histamine H₃-receptor-induced attenuation of noradrenaline exocytosis from cardiac sympathetic nerve endings. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2002; 99: 501-6.
57. Molina-Hernandez A et al.: Histamine H₃ receptor activation inhibits glutamate release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology* 2001; 41: 928-34.

58. Bongers G et al.: Modulation of Akt/GSK3- β axis as new signaling properties of the histamine H₃ receptor. XXXIII Ann. Meet. Eur. Histamine Res. Soc. Abs. 2004; 25.
59. Sun W et al.: Glycogen synthase kinase-3 β is complexed with tau protein in brain microtubules. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 11933–40.
60. Jope RS, Johnson GV: The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* 2004; 29: 95–102.
61. Shenton F et al.: Human H₃ receptor isoforms can form homooligomers. XXXIII Ann. Meet. Eur. Histamine Res. Soc. Abs. 2004: 104.
62. Hancock AA et al.: Genetic and pharmacological aspects of histamine H₃ receptor heterogeneity. *Life Sci.* 2003; 73: 3043–72.
63. Wellendorph P et al.: Molecular cloning and pharmacology of functionally distinct isoforms of the human histamine H₃ receptor. *Neuropharmacology* 2002; 42: 929–40.
64. Morisset S et al.: High constitutive activity of native H₃ receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature* 2000; 408: 860–4.
65. Schwartz JC et al.: Histamine as a neurotransmitter in mammalian brain: neurochemical evidence. *J. Neurochem* 1980; 35: 26–33.
66. Panula P et al.: Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1984; 81: 2572–76.
67. Watanabe T et al.: Evidence for the presence of a histaminergic neuron system in the rat brain: an immunohistochemical analysis. *Neurosci. Lett.* 1983; 39: 249–54.
68. Esbenshade TA, Browman KE, Bitner RS, et al. The histamine H₃ receptor: an attractive target for the treatment of cognitive disorders. *Br J Pharmacol.* 2008; 154(6): 1166-81.
69. Schlicker E et al. Histamine H₃ receptor-mediated inhibition of serotonin release in the rat brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1988; 337: 588-90.
70. Schlicker E et al. Inhibition of noradrenaline release in the rat brain cortex via presynaptic H₃ receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1989; 340: 633-38.
71. Schlicker E et al. Histamine inhibits dopamine release in the mouse striatum via presynaptic H₃ receptors. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* 1993; 93: 1–10.
72. Clapham J, Kilpatrick GJ: Histamine H₃ receptors modulate the release of [³H]-acetylcholine from slices of rat entorhinal cortex: evidence of the possible existence for H₃ receptor subtypes. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 107: 919-23.
73. Nestler JE, Hyman SE, Malenka RC. *Molecular Neuropharmacology. A Foundation For Clinical Neuroscience.* 2nd ed. McGraw-Hill, New York, 2008.
74. Lin JS, Sergeeva OA, Haas HL. Histamine H₃ receptors and sleep-wake regulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 336 (1): 17-23.
75. Parmentier R, Anaclet C, Guhenec C, et al. The brain H₃ receptor as a novel therapeutic target for vigilance and sleep-wake disorders. *Biochem Pharmacol* 2007; 73(8): 1157-71.
76. U. S. National Institutes Of Health, <http://clinicaltrials.gov> (15.1.2012)
77. Hough LB, Rice FL. H₃ receptors and pain modulation: peripheral, spinal, and brain interactions. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 336(1): 30-7.
78. Cannon KE, Hough LB: Inhibition of chemical and low-intensity mechanical nociception by activation of histamine H-3 receptors. *J. Pain.* 2005; 6: 193–200.

79. Schwartz TL et al. Psychiatric medication-induced obesity: a review. *Obes. Rev.* 2004; 5: 115–21.
80. Richelson E: Tricyclic antidepressants block histamine H1 receptors of mouse neuroblastoma cells. *Nature* 1978; 274: 176–77.
81. Kim SF et al.: Antipsychotic drug-induced weight gain mediated by histamine H1 receptor-linked activation of hypothalamic AMP-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104: 3456–59.
82. Itoh Y et al.: Feeding-induced increase in the extracellular concentration of histamine in rat hypothalamus as measured by in vivo microdialysis. *Neurosci. Lett.* 1991; 125: 235–7.
83. Ookuma K et al.: Neuronal histamine in the hypothalamus suppresses food intake in rats. *Brain Res* 1993; 628: 235–42.
84. Yoshimoto R et al.: Therapeutic potential of histamine H3 receptor agonist for the treatment of obesity and diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006; 103: 13866–71.
85. Landau B: *Encyclopedia of the human brain*. San Diego, CA: Academic Press, 2002: 251-68.
86. Vesce S, Bezzi P, Volterra A: Synaptic Transmission with the Glia. *News Physiol. Sci.* 2001; 16: 178-84.
87. Kržan M: Funkcija astrocitov. *Zdrav. Vestn.* 2001; 70: 553-9.
88. Becker et al. 6th edition. The McGraw-Hill Companies. Chapter 13, <http://course1.winona.edu/sberg/ILLUST/neuroglialCellFunctions.gif> (18.1.2012)
89. Jurič DM, Mele T, Čarman-Kržan M: Involvement of histaminergic receptor mechanisms in the stimulation of NT-3 synthesis in astrocytes. *Neuropharmacology* 2011; 60 (7-8): 1309-17.
90. Hansson E, Rönnbäck L: Astrocytic receptors and second messenger systems. *Advances in Molecular and Cell Biology* 2003; 31: 475-501.
91. Fellin T, Carmignoto G: Neuron to astrocyte signaling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J. Physiol.* 2004; 559: 3-15.
92. Lipnik-Štangelj M, Čarman-Kržan M: Activation of histamine H1-receptor enhances neurotrophic factor secretion from cultured astrocytes. *Inflamm Res.* 2004; 53: 245-52.
93. Rafałowska U, Waśkiewicz J, Albrecht J. Is neurotransmitter histamine predominantly inactivated in astrocytes? *Neurosci Lett.* 1987; 80: 106-10.
94. Osredkar D, Burnik-Papler T, Pečavar B, et al.: Kinetic and pharmacological properties of [(3)H]-histamine transport into cultured type 1 astrocytes from neonatal rats. *Inflamm Res.* 2009; 58: 94-102.
95. Rodriguez J, Moran J, Blanco I, et al.: Effect of histamine on the development of astroglial cells in culture. *Neurochem Res.* 1989; 14: 693-700.
96. Arbonés L, Picatoste F, García A. Histamine stimulates glycogen breakdown and increases 45Ca²⁺ permeability in rat astrocytes in primary culture. *Mol. Pharmacol.* 1990; 37: 921-27.
97. Bezzi P et al.: Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 1998; 391: 281–5.

98. Čarman-Kržan M, Lipnik-Štangelj M: Molecular properties of central and peripheral histamine H1 and H2 receptors. *Pflugers Arch.* 2000; 439 (Suppl. 3): 131-32.
99. Miklič Š, Jurič DM, Čarman-Kržan M: Differences in the regulation of BDNF and NGF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes. *Int J Devl Neurosci.* 2004; 22: 119-30.
100. Lipnik-Štangelj M: Multiple role of histamine H1-receptor-PKC-MAPK signaling pathway in histamine-stimulated nerve growth factor synthesis and secretion. *Biochem Pharmacol.* 2006; 72: 1375-81.
101. Čarman-Kržan M: Radioligand-Receptor Binding in Membrane Receptor Research, *Progress in Medicinal Chemistry* 1986; 23: 42-89.
102. Langlais PJ, McRee RC, Nalwalk JA, Hough LB: Depletion of brain histamine produces regionally selective protection against thiamine deficiency-induced lesions in the rat. *Metab. Brain Dis.* 2002; 17: 199-210.
103. Korte A, Myers J, Shih NY, Egan RW, Clark MA: Characterization and tissue distribution of H3 histamine receptors in guinea pigs by N alpha-methylhistamine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990; 168: 979-86.
104. Cumming P, Laliberté C, Gjedde A: Distribution of histamine H3 binding in forebrain of mouse and guinea pig. *Brain Research* 1994; 664: 276-279.
105. Cumming P, Vincent SR: Altered histamine H3 binding in rat forebrain after reserpine treatment. *Brain Res.* 1993; 602: 53-6.
106. Kathmann M, Schlicker E, Detzner M, Timmerman H: Nordimaprit, homodimaprit, clobenpropit and imetit: affinities for H3 binding sites and potencies in a functional H3 receptor model. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1993; 348: 498-503.
107. Schnell D, Strasser A, Seifert R: Comparison of the pharmacological properties of human and rat histamine H3-receptors. *Biochemical Pharmacology* 2010; 80: 1437-49.
108. Wulffa BS, Hastrup S, Rimvall K: Characteristics of recombinantly expressed rat and human histamine H3 receptors. *European Journal of Pharmacology* 2002; 453: 33-41.
109. Schwartz JC: The histamine H3 receptor: from discovery to clinical trials with pitolisant. *British Journal of Pharmacology* 2011; 163 (4): 713-21.
110. Stark H, Ligneau X, Sadek B, Ganellin CR, Arrang JM, Schwartz JC, Schunack W: Analogues and derivatives of ciproxifan, a novel prototype for generating potent histamine H3-receptor antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2000; 10 (20): 2379-82.
111. Clark EA, Hill SJ: Differential effect of sodium ions and guanine nucleotides on the binding of thioperamide and clobenpropit to histamine H3-receptors in rat cerebral cortical membranes. *Br J Pharmacol.* 1995 114 (2): 357-62.