

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VESNA TERBUC

KINETIKA PRIVZEMA HISTAMINA V ASTROCITE
NOVOROJENE PODGANE IN VPLIV BIOGENIH AMINOV NA
TA PROCES

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VESNA TERBUC

**KINETIKA PRIVZEMA HISTAMINA V ASTROCITE
NOVOROJENE PODGANE IN VPLIV BIOGENIH AMINOV
NA TA PROCES**

**UPTAKE OF HISTAMINE INTO NEONATAL RAT
ASTROCYTES: KINETICS AND THE INFLUENCE OF
BIOGENIC AMINES**

Ljubljana, 2012

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

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici, prof. dr. Mojci Kržan, dr. med., za vse strokovne nasvete, vzpodbudo, potrežljivost in prilagodljivost ter pomoč pri raziskovalnem delu in izdelavi diplomske naloge.

Posebna zahvala gre tudi tehnični sodelavki Jožici Košir za pomoč in koristne napotke pri izvajanju laboratorijskih poskusov ter popestritev dni v laboratoriju.

Izjava

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

Vesna Terbuc

Vsebina

Povzetek	V
Abstract.....	VI
Okrajšave in simboli.....	VII
Uvod	1
Histamin in osrednji živčni sistem.....	1
1. Osrednji živčni sistem	1
1.1. Astrocyti	1
1.2. Nevrotransmisorji	4
1.3. Sinaptični prenos	5
1.4. Inaktivacija nevrotransmitorjev	6
1.5. Prenašalni proteini v OŽS	8
2. Histamin	11
2.1. Kemikske značilnosti histamina.....	12
2.2. Biosinteza in metabolizem histamina.....	12
2.3. Histamin v OŽS	14
3. Biogeni amini v osrednjem živčnem sistemu.....	15
3.1. Noradrenalin	15
3.2. Dopamin	17
3.3. Serotonin (5-hidroksitriptamin).....	17
Namen dela	19
Materiali in metode.....	20
1. Priprava celičnih kultur astrocitov	20
2. Privzem histamina v celične kulture astrocitov	22
3. Določanje privzetega histamina	23
4. Določanje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi.....	23
5. Analiza podatkov	24
Rezultati.....	25
1. Kinetika privzema histamina	25
1.1. Koncentracijska odvisnost celokupnega privzema histamina	25
1.2. Koncentracijska odvisnost nespecifičnega privzema histamina.....	27
1.3. Hitrost privzema histamina.....	29
2. Vpliv biogenih aminov na privzem histamina	30
Razprava	33
Sklep	37
Literatura	38

Kazalo slik

Slika 1: Prikaz različnih celic osrednjega živčevja	3
Slika 2: Tripartidna sinapsa	7
Slika 3: Shematski prikaz molekule OCT prenašalnega proteina	10
Slika 4: Histamin v obliki monokationa/dikationa in tautomerni oblici histamina v vodnih raztopinah	12
Slika 5: Sinteza in metabolizem histamina.....	13
Slika 6: Histaminergične poti v osrednjem živčnem sistemu.....	14
Slika 7: Strukturne formule biogenih aminov (noradrenalin, dopamin, serotonin in histamin) ter nevrotoksina 6-hidroksidopamina s pripadajočimi pKa vrednostmi.....	15
Slika 8: Noradrenalin in dopamin se sintetizirata iz istega prekurzorja (tirozina)	16
Slika 9: Privzem ^3H -histamina v astrocite novorojene podgane v odvisnosti od koncentracije ^3H -histamina pri fiziološkem pH	26
Slika 10: Primerjava privzema ^3H -histamina v astrocite novorojene podgane pri pH 7,4 in pH 6,6 po 10-minutni inkubaciji	28
Slika 11: Primerjava privzema ^3H -histamina v astrocite novorojene podgane pri pH 7,4 in pH 6,6 po 20-minutni inkubaciji	28
Slika 12: Hitrost privzema ^3H -histamina v astrocite novorojene podgane pri pH 7,4 in pH 6,6 pri 10 minutah.....	29
Slika 13: Hitrost privzema ^3H -histamina v astrocite novorojene podgane pri pH 7,4 in pH 6,6 pri 20 minutah.....	30
Slika 14: Inhibicija privzema ^3H -histamina v astrocite novorojene podgane z dopaminom, 6-hidroksidopaminom, L-noradrenalinom in serotoninom	31
Slika 15: Shematski prikaz prenašalcev privzema 1 in privzema 2	34

Kazalo preglednic

Preglednica I: Nevrotransmitorji z majhno molekulsko maso	4
Preglednica II: Peptidni nevrotransmitorji	5
Preglednica III: Karakteristike privzema nevrotransmitorjev preko različnih prenašalcev	11
Preglednica IV: Prenašalci za nevrotransmitorje.....	11
Preglednica V: Materiali, ki smo jih uporabljali v laboratoriju, in njihovi proizvajalci	20
Preglednica VI: Sestava pufra za privzem histamina	22
Preglednica VII: Kinetični parametri privzema histamina v astrocite	30
Preglednica VIII: Vrednosti logIC ₅₀ in odstotek največje inhibicije celokupnega privzema histamina v astrocite novorojene podgane	32

Povzetek

Astrociti imajo pomembno vlogo pri odstranjevanju in inaktivaciji histamina v osrednjem živčnem sistemu, a prenašalnih proteinov za privzem histamina še ne poznamo.

V diplomskem delu smo zato proučevali kinetiko in lastnosti privzema histamina v astrocite novorojene podgane. Astrociti so ^3H -histamin privzemali različno v odvisnosti od časa, koncentracije histamina in pH inkubacijskega medija. Specifični privzem ^3H -histamina smo izračunali kot razliko med privzemom pri pH 7,4 in pH 6,6, pri temperaturi 37 °C. Privzem je sledil saturacijski kinetiki, vrednost Michaelis-Mentenove konstante (K_m) je znašala $104,0 \pm 28,85 \mu\text{M}$, vrednost največje hitrosti privzema (V_{max}) pa $34,26 \pm 5,67 \text{ pmol/mg proteinov/min}$. Rezultati kažejo, da se histamin privzema v astrocite preko prenašalnega proteina.

Ugotavljali smo tudi vpliv različnih biogenih aminov na privzem histamina v astrocite novorojene podgane. Rezultati so pokazali, da je dopamin najmočnejši inhibitor privzema histamina, sledijo mu serotonin, 6-hidroksidopamin in L-noradrenalin.

Zaključimo lahko, da privzem histamina v astrocite novorojene podgane poteka preko učinkovitega visokokapacitetnega nizkoafinitetnega prenašalnega proteina, ki lahko prenaša tudi druge biogene amine.

Abstract

Astrocytes have a key role in the clearance and inactivation of histamine in central nervous system, but transporters which mediate histamine uptake into astrocytes have not been fully characterized.

We therefore investigated the kinetic and molecular characteristics of histamine uptake into cultured neonatal rat astrocytes. [3H]-histamine was taken up by astrocytes in a time-, concentration, and pH-dependent manner. Specific [3H]-histamine uptake, determined as the difference between transport occurring at 37 °C at pH 7,4 and pH 6,6, displayed saturation kinetics with the apparent Michaelis-Menten constant (K_m) of 104,0 ± 28,85 µM and the apparent maximal uptake rate (V_{max}) of 34,26 ± 5,67 pmol/mg protein/min. Our data suggested the presence of a carrier-operated histamine uptake system.

When assessing the influence of different biogenic amines on histamine uptake into neonatal rat astrocytes, dopamine was found to be the most potent inhibitor of histamine uptake, followed by serotonin, 6-hydroxydopamine and noradrenaline.

Thus, our data indicate that neonatal rat astrocytes possess efficient high-capacity, low-affinity carrier-operated histamine uptake system, which can carry also other biogenic amines.

Okrajšave in simboli

- ATP – adenozintrifosfat (*adenosine triphosphate*)
BGT-1 – prenašalec za betain/GABA (*betaine/GABA transporter 1*)
cAMP – ciklični adenozinmonofosfat (*cyclic adenosine monophosphate*)
COMT – katehol-O-metil transferaza (*catechol-O-methyl transferase*)
DAO – diaminooksidaza (*diamine oxidase*)
DAT – prenašalec za dopamin (*dopamine transporter*)
DMEM – po Dulbeccu modificiran Eaglov medij (*angl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)
EAAT – prenašalec za ekscitatorne amino kisline (*angl. excitatory amino acid prenašalec*)
GABA – γ -aminomaslena kislina (*γ -aminobutyric acid*)
GAT – prenašalec za GABA (*GABA transporter*)
GFAP – glialna fibrilarna kislina beljakovina (*glial fibrillary acidic protein*)
GLYT – prenašalec za glicin (*glycine transporter*)
MAO – monoaminoooksidaza (*monoamine oxidase*)
NET – prenašalec za noradrenalin (*norepinephrine transporter*)
OCT – prenašalec za organske katione (*organic cation transporter*)
OCTN – prenašalec za organske katione in carnitin (*organic cation/carnitine transporter*)
PMAT – membranski prenašalec za monoamine (*plasma membrane monoamine transporter*)
PROT – prenašalec za L-prolin (*L-proline transporter*)
SERT – prenašalec za serotonin (*serotonin transporter*)
SLC – prenašalci za topljence (*solute carrier transporters*)
VGAT – vezikularni prenašalec za inhibitorne aminokisline (*vesicular GABA transporter*)
VGLUT – vezikularni prenašalec za glutamat (*vesicular glutamate transporter*)
VMAT – vezikularni monoaminski prenašalec (*vesicular monoamine transporter*)

Uvod

Histamin in osrednji živčni sistem

1. Osrednji živčni sistem

Osrednji živčni sistem (OŽS) je najbolj kompleksen organ. Glavnino celic OŽS predstavlja dva osnovna tipa celic: živčne celice in nevroglij. Celice glije so najštevilčnejše celice osrednjega živčnega sistema. Delimo jih na mikroglijo in makroglijo. V celicah glije ne vznikne akcijski potencial, vendar kljub temu komunicirajo med seboj, lahko se aktivirajo, množijo in delijo (1). Njihove glavne naloge so:

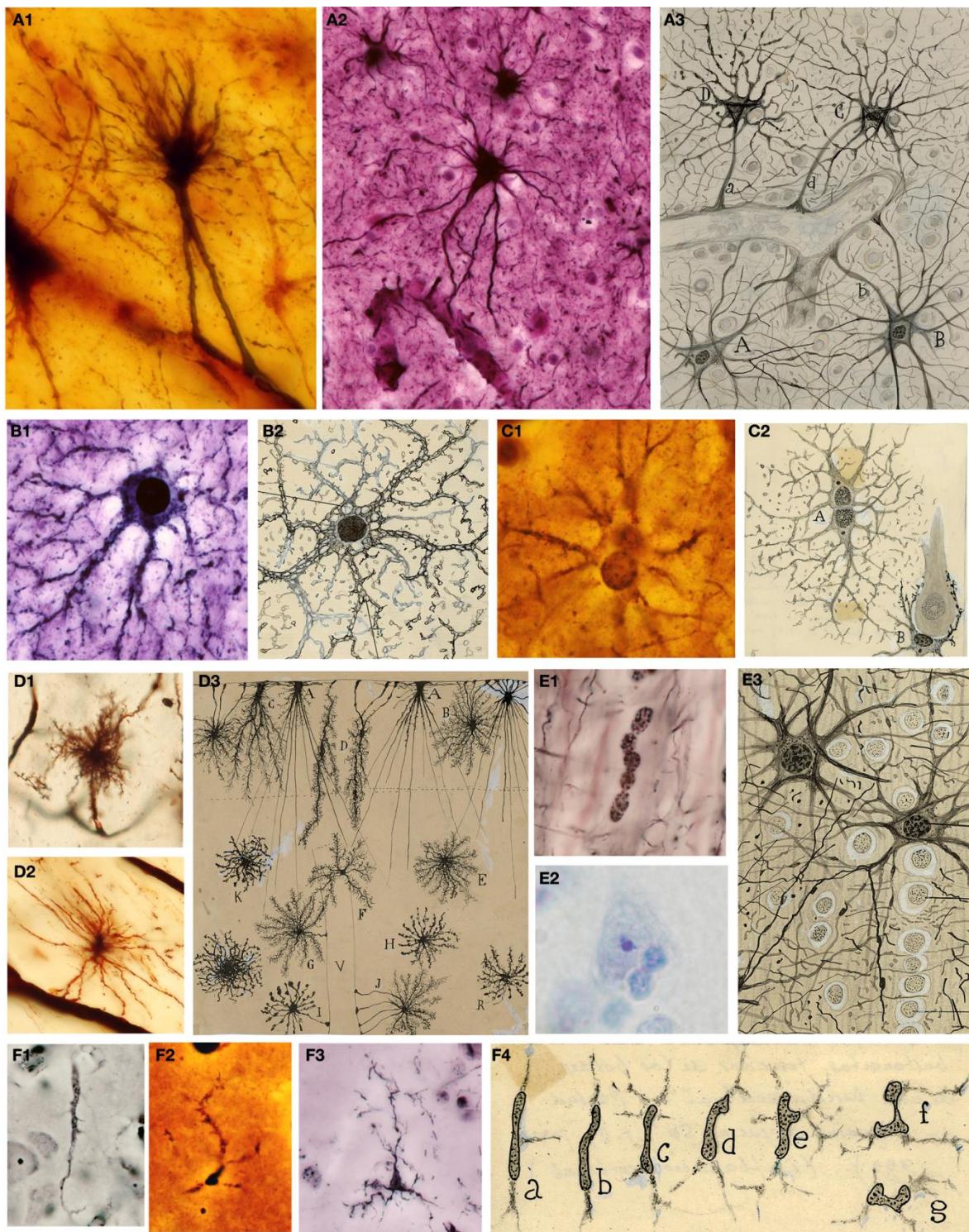
- podpora nevronov (pomembne za strukturo in funkcijo možganov);
- odstranjevanje kalijevih ionov in nekaterih nevrotransmitorjev (glutamat) iz osrednjega živčevja;
- proizvajanje mielina, ki obdaja aksone nevronov;
- odstranjevanje odmrlih celic po poškodbi ali nevronske smrti;
- podpora pri regeneraciji možganskega tkiva po poškodbi;
- signaliziranje med nevroni;
- migracija nevronov in nadzor rasti aksonov med razvojem možganov;
- astrociti gradijo krvno-možgansko pregrado (pri nižjih živalskih vrstah) (2).

Mikroglijo sestavljajo fagociti, ki se aktivirajo ob poškodbi, bolezni ali infekciji in fagocitirajo mikrobe ter poškodovano živčno tkivo (1,3). Makroglijo v OŽS sestavlja dva tipa celic: astrociti in oligodendrocyti.

1.1. Astrociti

Astrociti so največje in najštevilčnejše celice nevroglij (3). So ektodermalnega izvora in v nasprotju z nevroni niso vzdražni. Telo celice je neenakomerne, zvezdaste oblike, z dolgimi izrastki (1,3). Nekateri izrastki se stikajo z nevroni, drugi s kapilarami, tretji z možgansko ovojnico pio mater. Njihov citoskeletalni sistem gradi glialna kisla fibrilarna beljakovina (GFAP, angl. *glial fibrillary acidic protein*), ki daje celicam obliko in nam

služi kot označevalec teh celic v razmerah *in vivo* ter *in vitro*. Dolgo časa so astrocitem pripisovali le podporno vlogo, ki poskrbi za homeostazo in vzdrževanje primernega mikrookolja za delovanje nevronov (4). Astrociti prinašajo hranila nevronom v možganih in hrbtnični ter omogočajo, da endotelijalne celice žil tvorijo tesne stike (angl.: *tight junctions*) in tako skupaj s periciti tvorijo zaščitno krvno-možgansko pregrado (3). Tvorijo tudi presledkovne stike (angl. *gap junctions*), ki omogočajo medcelično komunikacijo med astrociți ter med astrociți in nevroni. Ta komunikacija poteka predvsem preko kalcijevih tokov (4). Astrociți preko presledkovnih stikov, prenašalnega proteina za K^+ in Cl^- ter kanalov za K^+ in Cl^- privzemajo prebitek zunajceličnega K^+ , ki nastane ob nevrotransmisiji in po njej. Na svojih membranah izražajo receptorje za številne nevrotransmitorce v OŽS, kot so GABA, aspartat/glutamat, glicin in biogeni amini. Na ta način intenzivno sodelujejo pri inaktivaciji različnih nevrotransmitorcev in s tem regulirajo sinaptično aktivnost (4). Perivaskularni astrociți skupaj z nevroni sodelujejo pri regulaciji možganskega krvnega pretoka (5). Astrociți lahko glede na spremembe v neposrednem okolju spreminja svojo obliko in funkcijo ter imajo v različnih življenjskih obdobjih različne vloge. V razvojnem obdobju celice radialne glije vodijo in usmerjajo rastoče nevrone ter sintetizirajo in izločajo nevrotrofične dejavnike, ki uravnavajo morfologijo, rast, diferenciacijo in preživetje določenih nevronskih podskupin. V odraslem obdobju astrociți s privzemanjem prebitnega K^+ in nevrotransmitorcev preprečujejo ekscitacijsko poškodbo nevronov. Ob poškodbi ali bolezni osrednjega živčevja se mirujoči astrociți preobrazijo v aktivne celice, ki sodelujejo pri regeneraciji osrednjega živčevja oziroma brazgotinjenju v primeru večje izgube živčnih celic (4).



Slika 1: Prikaz različnih celic osrednjega živčevja

Avtor histoloških preparatov in risb je Santiago Ramon y Cajal (Nobelov nagrjenec za medicino leta 1906) (A) Fibrilarni astrocit iz bele substance možganov (formalin-uranov nitrat in zlato); (B) Protoplazmatski astrocit v možganih (srebrov karbonat in formalin-uranov nitrat); (C) Dva astrocita iz hipokampa (formalin-uranov nitrat); (D) Fibrilarni astrocit iz bele substance možganov (barvanje po Golgiju); (E) Oligodendrociti (barvanje po Nisslu); (F) Mikroglija (srebrov oksid in srebrov karbonat).

1.2. Nevrotransmitorji

Nevrotransmitorji so endogene molekule, ki prenašajo informacije med nevroni preko sinaps ali med nevroni in drugimi tarčnimi celicami. Sintetizirajo se v presinaptičnem nevronu in hranijo v sinaptičnih veziklih. Ob vzbujenju živčnega končiča se sprostijo v sinaptično špranjo, z difuzijo preko sinapse dosežejo postsinaptično membrano, kjer po vezavi na receptor stimulirajo ali inhibirajo postsinaptično celico (6).

Za klasične nevrotransmitorje velja:

- sintetizirajo se v nevronu, iz katerega se sproščajo;
- shranjujejo se v sinaptičnih veziklih in se po aktivaciji presinaptičnih nevronov sprostijo v sinaptično špranjo v zadostni količini, da sprožijo odziv na postinaptičnem nevronu ali efektornem organu;
- eksogeno vnešen prenašalec povzroči enak odziv tarčne celice kot bi ga endogeni prenašalec;
- obstajati mora specifičen mehanizem za odstranitev nevrotransmitorjev iz sinaptične špranje;
- ne prehajajo krvno-možganske pregrade (3).

Učinek nevrotransmitorja na postsinaptičnem nevronu ni odvisen od kemijskih lastnosti nevrotransmitorja, ampak od lastnosti receptorja, na katerega se veže. Acetylholin je lahko inhibitorni ali ekscitatorni nevrotransmitor, na nekaterih celicah pa lahko povzroči oboje, ekscitacijo in inhibicijo.

Preglednica I: Nevrotransmitorji z majhno molekulsko maso [prirejeno po (2)]

NEVROTRANSMITORJI Z MAJHNO MOLEKULSKO MASO		
Acetylholin	BIOGENI AMINI	PLINI
AMINOKISLINE		
Aspartat	Dopamin	NO
Gaba	Histamin	CO
Glicin	Noradrenalin	
Glutamat	Serotonin	

Preglednica II: Peptidni nevrotransmitorji [prirejeno po (2)]

PEPTIDNI NEVROTRANSMITORJI
enkefalini
endorfini
nevrotenzin
substanca P
somatostatin

1.3. Sinaptični prenos

Povprečen nevron tvori približno 1000 sinaptičnih povezav in jih prejema še več, približno 10 000, Purkynjeve celice malih možganov pa celo 100 000. Sinapso gradijo presinaptični nevron, postsinaptični nevron in sinaptična špranja, ki oba nevrona ločuje (3). Sinaptični prenos je lahko kemičen ali električen. V električni sinapsi se vzburenje prevaja z električnim tokom skozi presledkovne stike, ki povezujejo presinaptično in postsinaptično membrano, v kemični sinapsi pa se vzburenje prevaja s sodelovanjem kemičnih nevrotransmitorjev (6).

Akcijski potencial potuje vzdolž aksona do sinapse ter povzroči odprtje napetostno odvisnih kalcijevih kanalčkov in kalcijevi ioni (Ca^{2+}) vstopijo v presinaptični nevron. Povišana koncentracija Ca^{2+} v celici povzroči zlivanje veziklov z membrano in sproščanje nevrotransmitorjev v sinaptično šprango z eksocitozo. Molekule nevrotransmitorjev difundirajo skozi sinaptično šprango, ki meri 20–40 nm, in se vežejo na receptorje na postsinaptični membrani (3). Ti receptorji so lahko ionotropni ali metabotropni. Ionotropni receptorji so integralni del makromolekule, ki tvori ionski kanalček. Ob vezavi liganda (neurotransmitorja) se kanalček odpre in ioni lahko potujejo skozi membrano. Metabotropni receptorji so makromolekule, ki posredno delujejo na ionske kanalčke preko aktivacije G-proteinov. Najpogosteje aktivacija teh receptorjev stimulira sintezo sekundarnih prenašalcev, kot sta cAMP in diacilglicerol. Sekundarni prenašalci aktivirajo protein kinazo, encim, ki fosforilira različne proteine. Pogosto fosforilira direktno ionske kanale, ki se posledično odprejo ali zaprejo (3).

1.4. Inaktivacija nevrotransmitorjev

Za sinaptični prenos je zelo pomemben časovni okvir, v katerem se nevrotransmitor odstrani iz sinaptične špranje. Poznamo štiri mehanizme inaktivacije nevrotransmitorjev: difuzija, encimska razgradnja, ponovni privzem v presinaptični nevron in privzem v celice glije.

1.4.1. Difuzija

Vsi nevrotransmitorji se vsaj delno odstranijo iz sinaptične špranje z difuzijo v okoliški medij. S tem koncentracija nevrotransmitorja pade pod mejno koncentracijo, ki je potrebna za vzbujenje postsinaptične membrane.

1.4.2. Encimska razgradnja

Encimska razgradnja je najbolj značilna za holinergične sinapse, saj se encim acetilholin-esteraza nahaja znotraj sinaptične špranje. Encimi monoaminoooksidaza (MAO) in katehol-O-metiltransferaza (KOMT), ki inaktivirajo monoaminske nevrotransmitorje (dopamin, histamin, serotonin in noradrenalin) ter histamin-N-metiltransferaza, ki razgrajuje histamin, se nahajajo v znotrajceličnem prostoru. Metaboliti, ki nastanejo, so neaktivni in nesposobni vezave na receptorje. Encimske poti razgradnje so pomembne tudi v klinični praksi, saj predstavljajo mesto delovanja zdravilnih učinkovin.

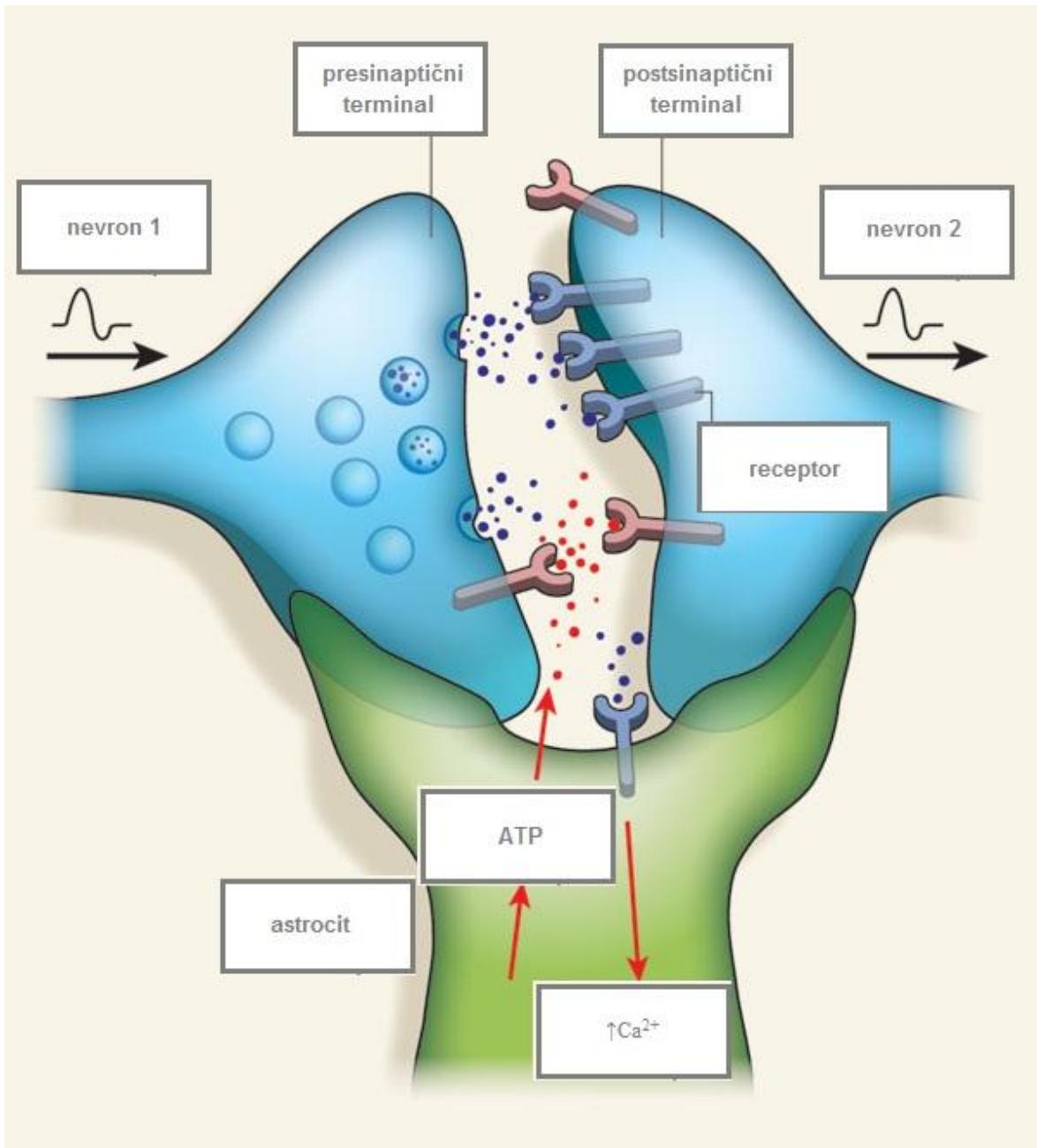
1.4.3. Ponovni privzem (facilitirana difuzija, aktivni transport)

Ponovni privzem nevrotransmitorjev v presinaptični nevron preko prenašalnih proteinov je najpogosteji mehanizem inaktivacije. V presinaptičnem nevronu se lahko nevrotransmitor ponovno uskladišči v sinaptičnih veziklih in je tako na voljo pri naslednjem prenosu vzbujenja, ali pa ga encimi razgradijo.

1.4.4. Privzem v celice glije

Astrociti imajo na svojih membranah izražene specifične transportne proteine za številne nevrotransmitorje. Encimi, ki se nahajajo znotraj astrocitov, nevrotransmitor razgradijo, metabolit pa preide nazaj v nevron, kjer se lahko ponovno uporabi (3). V največji meri se v astrocite privzema prenašalec glutamat. Astrociti sesalcev izražajo pet različnih prenašalcev za glutamat. V astrocitih se privzeti glutamat razgradi v glutamin, ki se sprosti

iz astrocitov, prenese v živčne celice, kjer se pretvori v glutamat, in se ponovno uporabi za sinaptični prenos (7).



Slika 1: Tripartidna sinapsa

Astrociti so prikazani kot enakovreden člen v sinapsi [prirejeno po (8)].

1.5. Prenašalni proteini v OŽS

Majhne, neionizirane, lipidotopne molekule brez težav prehajajo krvno-možgansko pregrado, večje, ionizirane, vodotopne molekule pa za prenos preko membrane izkoriščajo prenašalne proteine (9).

Prenašalni proteini so membranski proteini, katerih glavna funkcija je prenos molekul v celico in iz nje. Prenašajo hranila in endogene snovi, kot so glukoza, aminokisline, nukleotidi in vitamini, skozi celične membrane ter ščitijo telo pred toksičnimi spojinami. Prenašalni proteini ne prenašajo le snovi, ki so fiziološko prisotne v telesu, ampak tudi eksogene spojine, ki so podobne endogenim snovem, ko so na primer zdravila in nevrotoksični. Na ta način prenašalni proteini določajo biološko uporabnost, terapevtsko učinkovitost in farmakokinetiko določenih zdravilnih učinkovin (2).

Substrati se vežejo na prenašalne proteine na eni strani membrane, kar povzroči konformacijsko spremembo proteina in prehod substrata skozi membrano. Nekateri prenašalci prenašajo le substrate z zelo podobno strukturo (oligospecifični prenašalci), drugi pa substrate različnih velikosti in struktur (polispecifični prenašalci). Zdravilne učinkovine in toksini se največkrat prenašajo preko polispecifičnih prenašalcev (10).

Prenašalce lahko razdelimo na znotrajcelične vezikularne prenašalce in prenašalce na membranah celic (11).

1.5.1. Vezikularni prenašalci

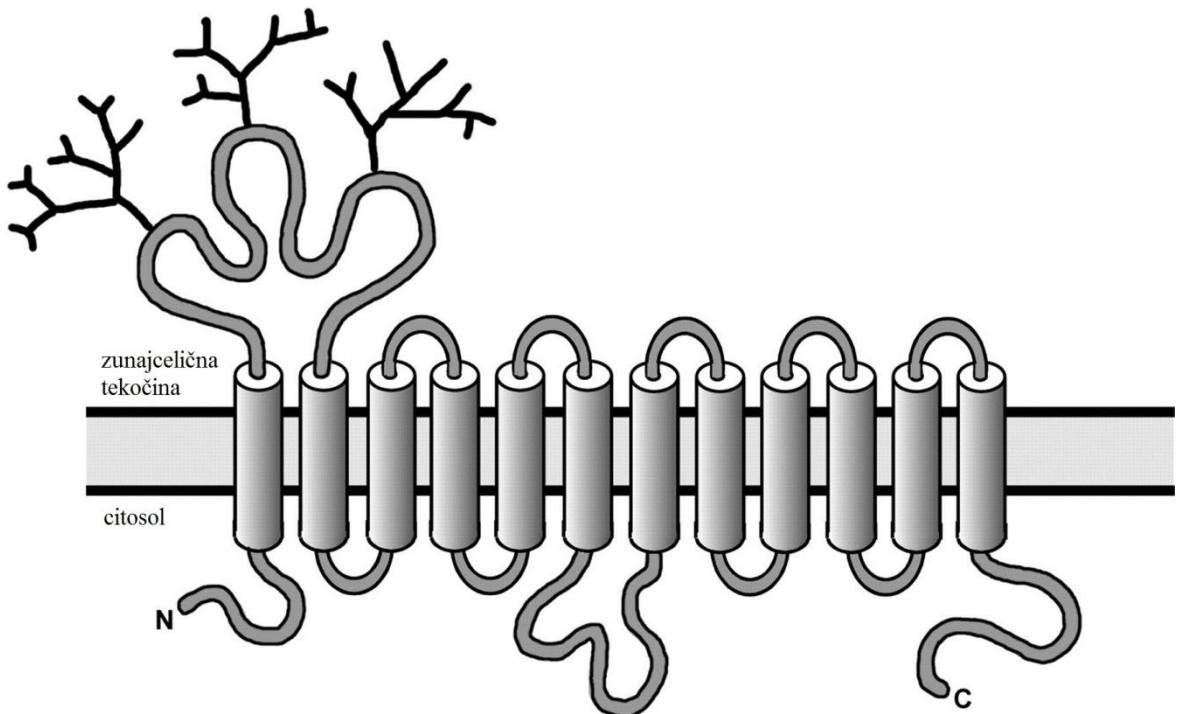
Vezikularni prenašalni proteini, ki se nahajajo v membrani sinaptičnih veziklov, prenašajo nevrotransmitorje iz citoplazme v lumen sinaptičnega vezikla. Tam se nevrotransmitorji skladiščijo do aktivacije presinaptičnega nevrona, ko se sprostijo v sinaptično špranjo. Poznamo vezikularni monoaminski prenašalec (VMAT), vezikularni prenašalec za glutamat (VGLUT) in vezikularni prenašalec za inhibitorne aminokisline (VGAT) (2,11).

1.5.2. Prenašalci na celičnih membranah

SLC-prenašalni proteini (prenašalci topljencev, angl. *solute carrier transporters*) delujejo na principu razlike v elektrokemijskem potencialu, npr. gradientu Na^+ ali H^+ , in nimajo vezavnih mest za ATP. Na celičnih membranah nevronov in celic glijev najdemo dve glavni skupini SLC-prenašalcev, SLC1 in SLC6. Družina SLC1 predstavlja prenašalce z visoko afiniteto za glutamat, v družino SLC6 pa spadajo prenašalec za dopamin (DAT), prenašalec za serotonin (SERT), prenašalec za noradrenalin (NET), prenašalec za glicin (GLYT) in GABA-prenašalec. Vsi omenjeni prenašalni proteini iz družine SLC6 se nahajajo na celičnih membranah astrocitov, njihovo delovanje pa je odvisno od Na^+ in Cl^- ionov.

Monoaminski nevrotransmitorji se lahko privzemajo v nevrone in astrocite tudi preko treh vrst prenašalcev iz družine SLC22, ki jih imenujemo prenašalci za organske katione (OCT), in sicer OCT1, OCT2 in OCT3. Družina SLC22 poleg OCT obsega še prenašalec za organske katione in karnitin (OCTN) ter prenašalec za organske anione (OAT) (2). Facilitirana difuzija preko prenašalcev za organske katione lahko poteka v obe smeri in ni odvisna od gradienta Na^+ in Cl^- ionov. Za ta način transporta sta značilni nizka afiniteta do substratov in visoka kapaciteta za prenos substratov preko membrane. Smer transporta je odvisna od koncentracijskega gradienta substrata in membranskega potenciala. Prenašalci OCT omogočajo facilitirano/olajšano difuzijo strukturno raznolikih organskih kationov, tudi monoaminskih nevrotransmitorjev in številnih zdravilnih učinkovin (10).

OCT je zgrajen iz 12 transmembranskih domen, velike zunajcelične zanke med domenama 1 in 2, na kateri so mesta za glikozilacijo, ter velike znotrajcelične zanke med domenama 6 in 7, ki vsebuje fosforilacijska mesta (9,10).



Slika 2: Shematski prikaz molekule OCT prenašalnega proteina

Sestavlja ga 12 transmembranskih področij, 6 zunajceličnih in 5 znotrajceličnih zank [prijejeno po (12)].

OCT najdemo v ledvicah, jetrih ter nevronih in celicah glije v osrednjem živčnem sistemu. Preko OCT1 in OCT2 poteka odstranjevanje eksogenih snovi iz telesa, OCT3 pa ima pomembno vlogo v možganih, med drugim odstranjuje monoaminske nevrotransmitorje iz zunajceličnega prostora.

OCT3 je v OŽS izražen v hipokampusu, malih možganih, možganski skorji in horoidnemu pleksusu ependimskih celic. Afiniteta OCT3 za prenos noradrenalina, serotoninina, dopamina in histamina je veliko nižja kot afiniteta NET, SERT in DAT, največja hitrost privzema pa je veliko višja kot pri visokoafinitetnih prenašalcih (2). V možganih najdemo še enega prenašaleca, ki ima podobne transportne značilnosti kot prenašalec OCT3. To je membranski prenašalec za monoamine (PMAT), ki je izražen na membranah nevronov, ne pa na celicah glije (13). Natančna lokacija PMAT in OCT3 na nevronih ni znana. Zelo verjetno je, da sodelujejo v očistku monoaminov v področjih z visoko koncentracijo monoaminov in po ponavljajoči stimulaciji monoaminergičnih nevronov. PMAT ima večjo

afiniteto za privzem serotonin in dopamina, OCT3 pa histamina, adrenalina in noradrenalina (13,14).

Preglednica III: Lastnosti privzema nevrotransmitorjev preko različnih prenašalcev

Privzem 1: SERT, NET, DAT	Privzem 2: OCT3, PMAT
odvisen od Na^+ in Cl^-	neodvisen od Na^+ in Cl^-
visoka afiniteta	nizka afiniteta
nizka kapaciteta	visoka kapaciteta

Preglednica IV: Prenašalci za nevrotransmitorje [prirejeno po (15)]

SUBSTRAT	ŠT. PODTIPOV	IME PRENAŠALCA
Noradrenalin	1	NET
Dopamin	1	DAT
Serotonin	1	SERT
GABA	4	GAT1–GAT4
GABA/betain	1	BGT-1
Glicin	2	GLYT1 in GLYT2
Prolin	1	PROT
L-glutamat	5	EAAT1–EAAT5
Vezikularni monoamini	2	VMAT-1 in VMAT-2
Vezikularni gaba/glicin	1	VGAT
Vezikularni glutamat	3	VGLUT1–VGLUT3

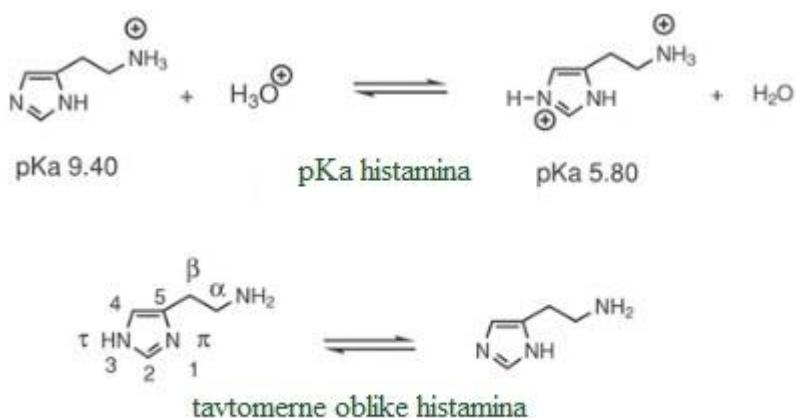
2. Histamin

Histamin je biogeni amin, ki nastane z dekarboksilacijo aminokisline histidin. Sintetizira se v mnogih tkivih, v bazofilcih, v parietalnih celicah želodčne mukoze, v nevronih OŽS in tudi na periferiji. Predstavlja enega izmed mnogih mediatorjev, ki so vpleteni v vnetni in alergijski odziv, pomembno pa vpliva tudi na izločanje želodčne kisline.

Histamin v možganih deluje kot nevrotransmitor; regulira osnovne homeostatske in višje funkcije, kot so: kognitivne funkcije, cirkadijalni in prehranjevalni ritem, učenje in spomin, lokomocija, nevroendokrina regulacija. Do teh sprememb pride preko interakcij z drugimi nevrotransmitorskimi sistemi (16).

2.1. Kemijske značilnosti histamina

Histamin ima dva bazična centra, primarni alifatski amin ($pK_{a1} = 9,4$) in imidazol ($pK_{a2} = 5,8$). Pri fiziološki vrednosti pH obstaja kot mešanica tavtomernih monokationov ($> 96\%$) in v manjši meri kot dikation (3%). Oba, monokation in dikation, sta fiziološko aktivna. V vodnih raztopinah je histamin v dveh tavtomernih oblikah π in τ .



Slika 3: Histamin v obliki monokationa/dikationa in tavtomerni obliki histamina v vodnih raztopinah

V vodnih raztopinah v ravnotežju prevladuje τ oblika histamina, razmerje med τ in π obliko je 4 : 1. Raziskave kažejo, da je tavtomerna sestava pomembna za interakcijo agonist-receptor (17).

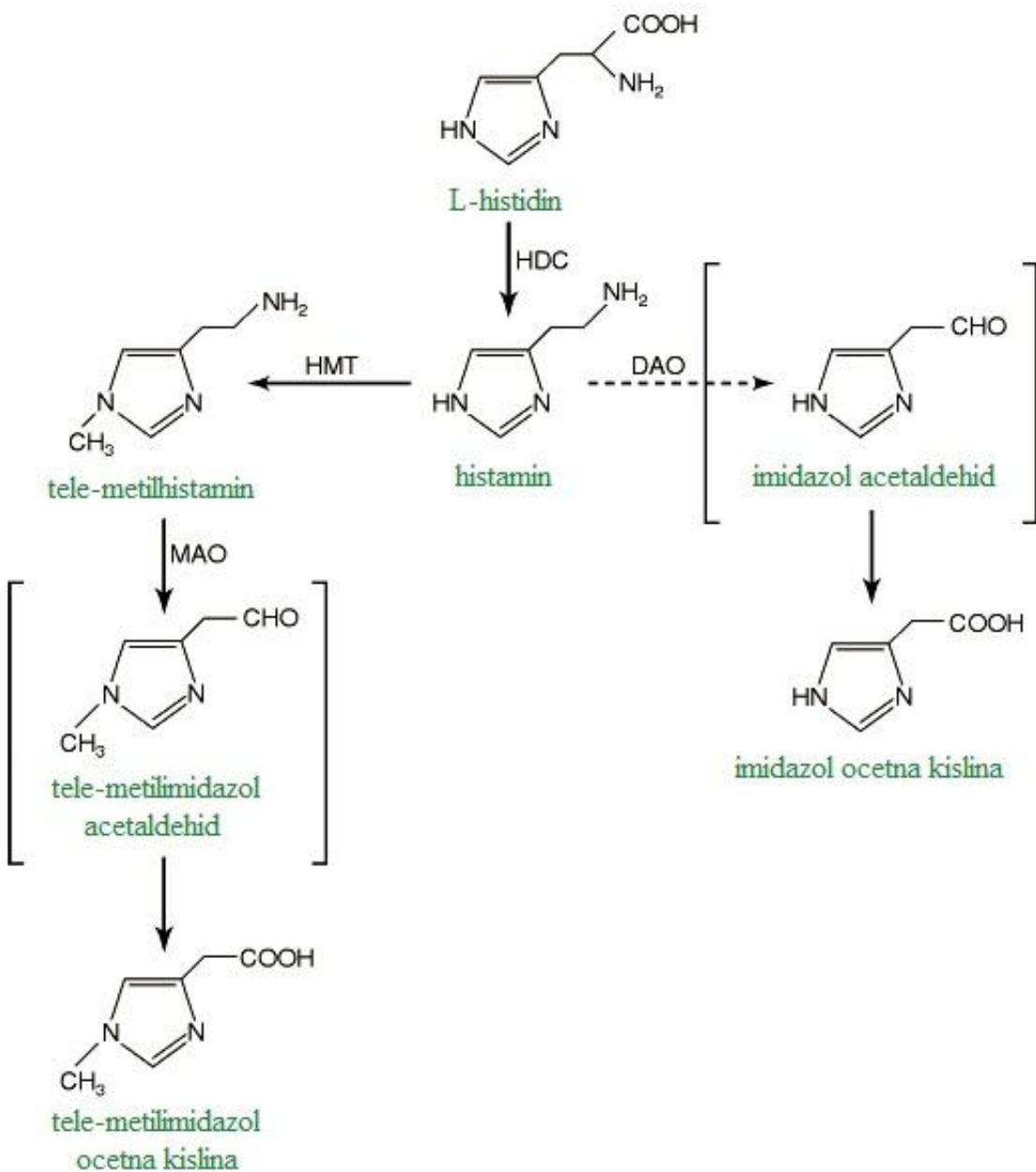
2.2. Biosinteza in metabolizem histamina

Histamin se sintetizira v Golgijevem aparatu mastocitov in bazofilnih levkocitov z encimsko dekarboksilacijo L-histidina. Encim, ki sodeluje v reakciji, je L-histidin-dekarboksilaza, kot kofaktor pa sodeluje še piridoksal-5'-fosfat (17).

Hitrost nastajanja histamina je odvisna od biološke uporabnosti njegovega prekurzorja L-histidina, ki ga nevroni in cerebrospinalna tekočina privzemajo preko prenašalcev za L-aminokisline (18).

Obstajata dve glavni poti metabolizma histamina v organizmu: N-metiliranje in oksidativno deaminiranje. V OŽS se histamin metabolizira le po prvi poti, saj se encim DAO, odgovoren za oksidativno deaminiranje, nahaja le zunaj osrednjega živčevja (ne

prehaja krvno-možganske pregrade). Histamin se pod vplivom encima histamin-N-metiltransferaze (HNMT) pretvori v tele-metilhistamin, ta pa dalje z encimoma monoaminoooksidaza B (MAO-B) in aldehid-dehidrogenaza do končnega produkta N-metilimidazol ocetne kisline (19).

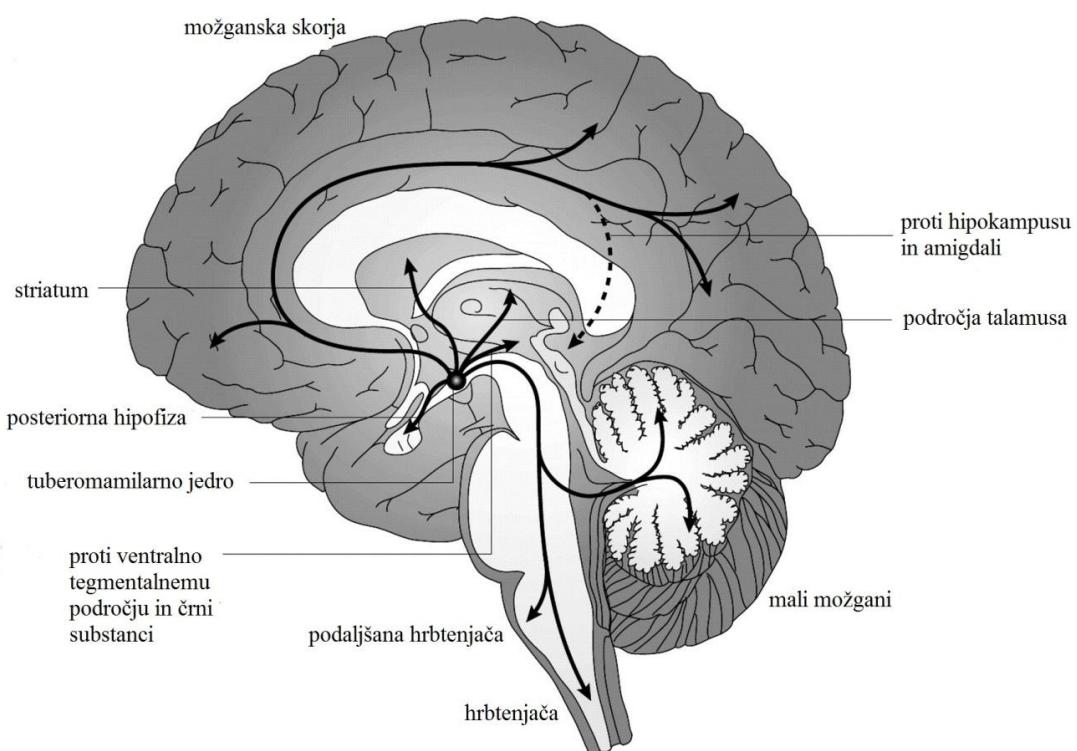


Slika 4: Sinteza in metabolizem histamina

Neprekinjene črte kažejo pot sinteze in razgradnje histamina v možganih. Prekinjene črte prikazujejo dodatne poti, ki se pojavljajo izven osrednjega živčnega sistema. (HDC, histidin-dekarboksilaza; HMT, histamin metiltransferaza; DAO, diaminooxidaza; MAO, monoaminoooksidaza). Aldehidni intermediati, ki so prikazani v oglatih oklepajih, še niso bili izolirani [prirejeno po (20)].

2.3. Histamin v OŽS

Histaminergični nevroni se nahajajo v tuberomamilarnem jedru posteriornega hipotalamus, njihovi aksoni pa oživčujejo celotni OŽS. Organizirani so v funkcionalne krožne poti, ki regulirajo različna področja možganov in delujejo po selektivnih nadzornih mehanizmih (21).



Slika 5: Histaminergične poti v osrednjem živčnem sistemu.

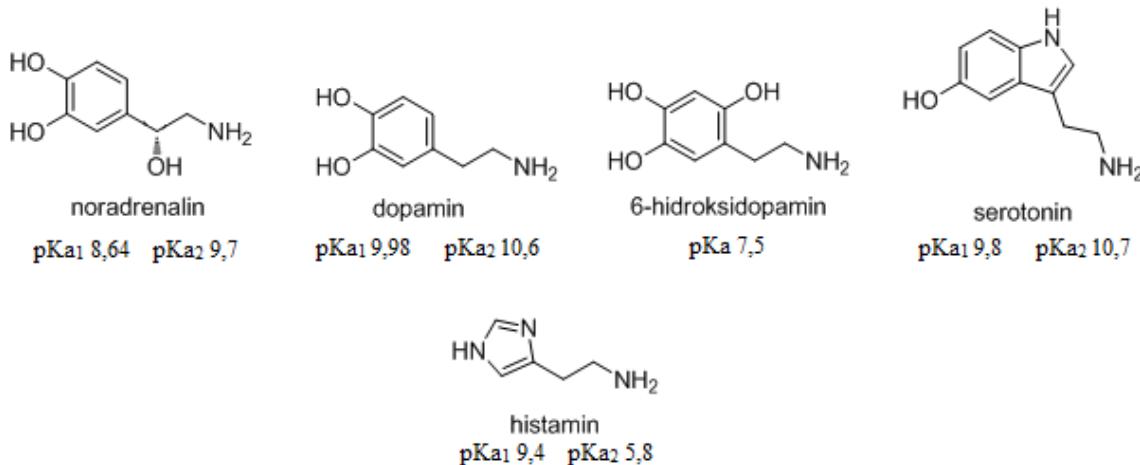
Približno 64 000 histaminergičnih nevronov, ki se nahajajo v tuberomamilarnem jedru človeških možganov, oživčuje večji del velikih možganov, malih možganov, posterorne hipofize in hrbtnica (22).

Histamin je v nevronih shranjen v telesu celice (soma) in odebelitvah aksona. Molekule histamina prehajajo v vezikle z aktivnim prenosom preko VMAT-2 prenašalca v zameno za dva protona. Ob nastopu akcijskega potenciala se histamin sprosti iz veziklov v sinaptično špranjo. Količina histamina v možganih je nižja od količine ostalih biogenih aminov, njegova presnova je veliko hitrejša (razpolovni čas je 0,5–2 minuti). Sintezo in sproščanje histamina nadzirajo histaminski receptorji H3, to so avtoreceptorji, ki delujejo po principu negativne povratne zanke (18). Sproščanje histamina v tarčnih regijah regulirajo podtipi naslednjih receptorjev: inhibitorni muskarinski M₁, adrenoceptorji α₂,

serotoninski 5-HT_{1A}, opioidni κ in μ ter galaninski receptorji. Tudi dušikov oksid (NO) zavira sproščanje histamina v hipotalamusu (19).

3. Biogeni amini v osrednjem živčnem sistemu

Glavni biogeni amini v OŽS so noradrenalin, dopamin, serotonin in histamin (23).



Slika 6: Strukturne formule biogenih aminov (noradrenalin, dopamin, serotonin in histamin) ter nevrotoksina 6-hidroksidopamina s pripadajočimi pKa vrednostmi (17, 24, 25)

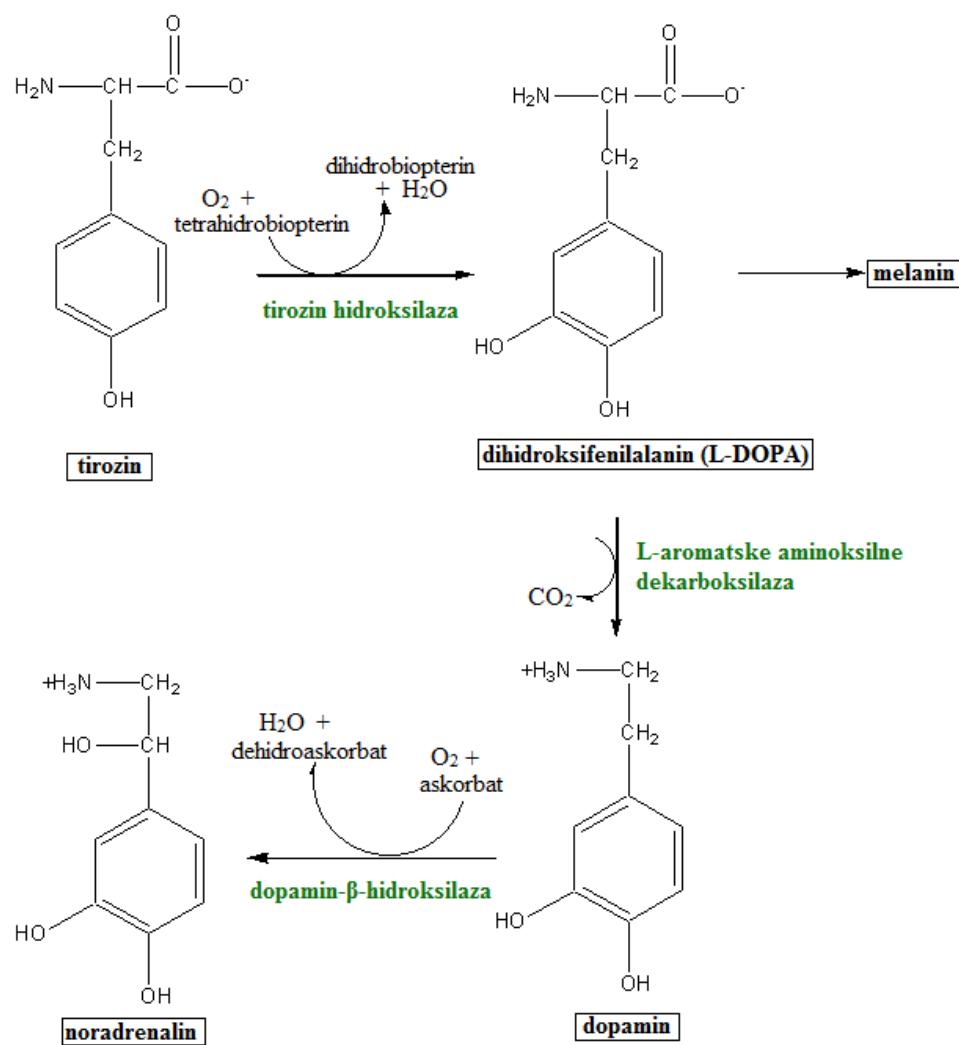
3.1. Noradrenalin

Telesa noradrenergičnih nevronov se nahajajo v ponsu in podaljšani hrbtenjači, njihovi aksoni pa oživčujejo velik del možganov ter hrbtenjače. Telesa noradrenergičnih nevronov najdemo predvsem v delu ponsa, imenovanem »locus ceruleus«. Sestavlja ga le okoli 10 000 nevronov, aksoni teh celic pa se iztezajo skozi srednje možgane, hipokampus, hipotalamus, talamus, male možgane in možgansko skorjo (23).

Vloga noradrenalina v OŽS:

- hranjenje,
- nadzor spanja in budnosti,
- spomin,
- pozornost,
- nadzor razpoloženja,
- regulacija arterijskega tlaka (7).

Noradrenalin je edini nevrotransmitor, ki se sintetizira znotraj sinaptičnih veziklov (3). Aminokislina L-tirozin se pod vplivom citosolnega encima tirozin hidroksilaze hidroksilira in nastane dihidroksifenilanalin (L-DOPA). Ta reakcija je ključna za regulacijo hitrosti nastajanja noradrenalina. V naslednjem koraku se L-DOPA pod vplivom encima L-aromatske aminokisline dekarboksilaze pretvori v dopamin. L-aromatske aminokisline dekarboksilaza je neselektivni citosolni encim, ki katalizira dekarboksilacijo različnih aromatskih aminokislin, npr. L-histidina in L-triptofana, ki sta prekurzorja v sintezi histamina in serotoninina. Dopamin- β -hidroksilaza katalizira pretvorbo dopamina v noradrenalin. Ta encim se nahaja predvsem v membranah sinaptičnih veziklov (23).



Slika 7: Noradrenalin in dopamin se sintetizirata iz istega prekurzorja (tirozina).

3.2. Dopamin

Dopamin predstavlja 80 % biogenih aminov v OŽS. V možganih obstajajo štiri glavne dopaminergične poti. Tri izhajajo iz črne substance (lat. *substantia nigra*). To so nigrostriatna pot, ki je pomembna za nadzor gibanja, mezolimbična in mezokortikalna pot, ki sta pomembni za dojemanje čustev, motivacijo in kognicijo (7). Mezolimbična in mezokortikalna pot sta mesti delovanja mnogih zdravil in rekreativnih substanc ter igrata pomembno vlogo v procesih nagrajevanja, ki so povezana s kompulzivnim jemanjem zdravil in zasvojenostjo. Četrta dopaminergična pot izhaja iz nucleusa arcuatusa v hipotalamu, projicira v hipofizo in regulira sproščanje hormonov, predvsem prolaktina (3).

Sinteza dopamine poteka po isti poti kot sinteza noradrenalina, le da dopaminergični nevroni ne vsebujejo encima dopamin- β -hidroksilaze in posledično dopamin ne prehaja v noradrenalin (23).

Metabolizem dopamine v možganih poteka pod vplivom encimov monoaminoooksidaze (MAO), katehol-O-metil transferaze (COMT) in aldehid-dehidrogenaze. Monoaminoooksidaza najprej oksidira dopamin do 3,4-dihidroksifenil acetaldehyda (DOPAL), ki se dalje oksidira v citotoksične radikale in kinone. Po eni izmed teorij bi to naj bil eden izmed vzrokov nastanka Parkinsonove bolezni (26). Glavna metabolita sta dihidroksifenil acetna kislina (DOPAC) in homovanilinska kislina (HVA). Vsebnost HVA v možganih je pokazatelj hitrosti obnavljanja dopamine. Koncentraciji DOPAC in HVA v urinu predstavljata indeks sproščanja dopamine (23).

6-hidroksidopamin je snov, ki selektivno uniči dopaminergične in adrenergične nevrone ter se pogosto uporablja v raziskovalne namene. 6-hidroksidopamin se v živčno celico privzame prek dopaminskih in noradrenergičnih prenosalcev, nato se metabolizira v toksičen metabolit, ki povzroča oksidacijsko poškodbo živčnih celic (23).

3.3. Serotonin (5-hidroksitriptamin)

Čeprav možgani vsebujejo le 1 % celotnega serotoninu v telesu, je ta pomemben nevrotransmitor v OŽS. Razporeditev serotoninergičnih nevronov v osrednjem živčevju je podobna kot pri noradrenergičnih nevronih (23). Telesa serotoninergičnih nevronov so zgoščena v jedrih, ki se nahajajo v neposredni bližini »šiva« oz. stika leve in desne

polovice podaljšane hrbtenjače (*Raphe nuclei*). Serotoninergični nevroni se po ascedentni poti projicirajo praktično po celotnih možganih. Serotonin vpliva na številne funkcije: uravnava ciklus spanje – budnost (v možganskem deblu), vpliva na občutke zadovoljstva (hipotalamus), uravnava apetit (hipotalamus), vpliva na spolne funkcije (hipotalamus), preprečuje nastanek obsesivno - kompulzivnih simptomov (limbični sistem) (27).

Prekurzor v sintezi serotoninina je esencialna aminokislina L-triptofan, ki se pod vplivom triptofan hidroksilaze in L-aromatske aminokisline dekarboksilaze pretvori v serotonin. Metabolizem serotoninina poteka v glavnem preko oksidativnega deaminiranja z MAO-A do nestabilnega 5-hidroksiindol-3-acetaldehida. Ta se nato ali oksidira ali reducira. Večina (85 %) se ga oksidira do 5-hidroksiindol ocetne kisline s pomočjo encima aldehyd dehidrogenaze, ostanek (15 %) pa se reducira do 5-hidroksitriptofola z encimom aldehyd reduktaza. Nekaj serotoninina je podvrženega acetilaciji z encimom 5-HT N-acetyltransferaza do N-acetylserotonina, ki se nato metilira do melatonina (17).

Namen dela

Astrociti izražajo histamin-N-metil transferazo, encim, ki v osrednjem živčevju razgrajuje histamin, zato mora histamin priti do citoplazme astrocitov, da se lahko razgradi. Histamin pri fiziološki vrednosti pH obstaja kot mešanica tautomernih monokationov (> 96 %) in v manjši meri kot dikation (3 %), zato ne more prosto prehajati celične membrane, ampak prehaja membrano preko prenašalnega proteina oz. prenašalnih proteinov.

V diplomskem delu bomo raziskali nekatere lastnosti celokupnega in nespecifičnega privzema histamina v astrocite novorojene podgane. Osredotočili se bomo na časovno in koncentracijsko odvisnost privzema ter določitev osnovnih parametrov privzema: Michaelis-Mentenove konstante, največje hitrosti ter učinkovitosti privzema.

V drugem delu diplomske naloge bomo preverili vpliv biogenih aminov (dopamina, L-noradrenalina, serotonin) in nevrotoksina (6-hidroksidopamina) na privzem histamina v astrocite.

V diplomskem delu bomo preverili naslednje hipoteze:

1. Privzem histamina v astrocite je odvisen od časa inkubacije in koncentracije zunajceličnega histamina ter poteka preko enega ali več prenašalnih proteinov.
2. Najboljša učinkovitost privzema histamina v astrocite bo v fizioloških razmerah: pri telesni temperaturi, ustrezni sestavi inkubacijskega medija in fiziološki vrednosti pH.
3. Biogeni amini (dopamin, L-noradrenalin in serotonin) ter 6-hidroksidopamin bodo zmanjšali privzem histamina v astrocite.

Materiali in metode

Pri delu smo uporabljali materiale, ki so zbrani v Preglednici V.

Preglednica V: Materiali, ki smo jih uporabljali v laboratoriju, in njihovi proizvajalci

MATERIAL	PROIZVAJALEC
Tripsin-EDTA, 0,05%	Gibco, ZDA
Fetalni goveji serum	Lonza, Belgija
Gentamicin	Gibco, ZDA
L-glutamin	Gibco, ZDA
Na-piruvat	Gibco, ZDA
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco, ZDA
Leibovitz L-15 medij	Sigma, ZDA
Goveji serumski albumin	Sigma, ZDA
HEPES	Sigma, ZDA
NaCl	Zorka Šabac
KCl	Merck, Nemčija
KH ₂ PO ₄	Merck, Nemčija
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma, ZDA
Glukoza	Merck, Nemčija
CaCl ₂	Sigma, ZDA
³ H-histamin, specifična aktivnost 10,6 Ci/mmol	New England Nuclear, ZDA
Histamin	Sigma, ZDA
NaOH	Alkaloid, Makedonija
Dopamin	Sigma, ZDA
6-hidroksidopamin	Sigma, ZDA
L-noradrenalin	Koch-Light
Serotonin	Sigma, ZDA
Scintilacijska tekočina Aquasol	New England Nuclear, ZDA
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, ZDA

1. Priprava celičnih kultur astrocitov

Primarne kulture astrocitov smo pripravili iz možganske skorje 3 dni starih mladičev podgan obeh spolov seva Wistar, ki so bile vzgojene na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Uporabili smo metodo Schwartzove in Wilsonove (1992).

Vse postopke na živalih smo izvedli v skladu z dovoljenjem Veterinarske uprave Republike Slovenije za izvajanje poskusov na živalih št. 34401-1/2010/8 in smernicami za

delo s poskusnimi živalmi, ki jih je izdal Komite za zaščito živali (National Institutes of Health, Bethesda, ZDA).

V aseptičnih pogojih smo iz lobanje dekapitiranih podgan odstranili možgane in jih potopili v raztopino Leibovitz L-15. Odstranili smo možganske ovojnice in izolirali možgansko skorjo. Možgansko tkivo smo nato v raztopini Leibovitz L-15 mehansko razdrobili s pomočjo pipet in injekcijskih igel različnih debelin. Nato smo ga preko sterilne najlonske mrežice s premerom 75 µm prenesli v centrifugirko (4 min, 1200 obratov/min, sobna temperatura). Po centrifugiranju smo supernatant zavrgli, usedlino pa prenesli v gojilne posode, v katere smo dodali hranilni medij za gojenje astrocitov z naslednjo sestavo:

- 50 mL medija DMEM z visoko koncentracijo glukoze
- 5 mL fetalnega govejega seruma
- 50 µL gentamicina
- 500 µL piruvata
- 500 µL L-glutamina

Celice smo nato gojili v inkubatorju pri 37 °C, v mešanici 95 % zraka in 5 % CO₂.

Medij DMEM sestavlja aminokisline, soli, glukoza, vitamini, železo in pH-indikator fenol rdeče. Fetalni goveji albumin omogoča preživetje, rast in delitev celic v kulturi. Gentamicin preprečuje okužbo z bakterijami, L-glutamin predstavlja vir dušikovih atomov in tako kot piruvat dodaten vir energije.

Ko so kulture prvič postale konfluentne, smo zamenjali medij in jih ponovno inkubirali (37 °C, mešanica 95 % zraka in 5 % CO₂). Sledilo je 20-urno stresanje pri 150 obratih/minuto. Postopek menjave medija in stresanja smo ponovili trikrat. S tem smo odstranili celice mikroglije, ki se ne morejo pritrditi na gojilno posodo tako učinkovito kot astrociti.

Po trikratni ponovitvi tega postopka smo odlili medij DMEM in dodali tripsin-EDTA. S tem so se celice odlepile od dna in stene gojilne posode. Inkubirali smo jih 20 minut pri 37 °C, v mešanici 95 % zraka in 5 % CO₂, nato pa jih prenesli v nove gojilne posode, ki

smo jim dodali hranilni medij, katerega sestava je opisana zgoraj. Celice smo naslednjih 24 ur inkubirali in po končani inkubaciji spet zamenjali medij, s čimer smo odstranili tripsin-EDTA.

Po približno tednu dni so kulture drugič postale konfluentne, dodali smo tripsin-EDTA in jih presadili na gojilne plošče z 12 ločenimi vdolbinami. Nato smo jih gojili še tri tedne, med tem pa smo redno spremljali rast celičnih kultur pod mikroskopom. Po treh tednih so bile celične kulture pripravljene za izvajanje poskusov.

2. Privzem histamina v celične kulture astrocitov

Plošče s celičnimi kulturami astrocitov smo pred poskusom hranili v inkubatorju pri 37 °C. Odstranili smo medij DMEM in celične kulture dvakrat sprali s pufrom za privzem brez CaCl_2 . Nato smo dodali pufer za privzem z dodatkom CaCl_2 .

Preglednica VI: Sestava pufra za privzem histamina

Substanca	Količina
HEPES	5,958 g
NaCl	7,306 g
KCl	0,358 g
KH_2PO_4	0,163 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,296 g
glukoza	1,009 g
CaCl_2	0,250 g
bidestilirana H_2O	dopolnimo do 1000 ml
pH uravnavamo z 0,1N NaOH do pH 6,6 ali pH 7,4	

V prvi seriji poskusov smo raziskovali kinetične lastnosti privzema: koncentracijsko odvisnost, hitrost privzema in Michaelis-Mentenovo konstanto (K_m).

V vdolbine gojilne plošče smo dodali različne koncentracije ^3H -histamina in histamina (0,125 μM , 2 μM , 7 μM , 10 μM , 20 μM , 30 μM , 50 μM , 70 μM , 90 μM , 100 μM) ter inkubirali pri 37 °C v mešanici 95 % zraka in 5 % CO_2 različno dolgo: 5, 10 ali 20 minut.

Pri poskusih, kjer smo proučevali vpliv drugih biogenih aminov na privzem histamina, smo predinkubirali z dopaminom, 6-hidroksidopaminom, L-noradrenalinom in serotoninom, nato pa plošče s celičnimi kulturami astrocitov inkubirali 20 minut (37 °C, mešanica 95 %

zraka in 5 % CO₂). Po inkubaciji smo jim dodali še radioaktivno označen ³H-histamin in ponovno inkubirali 20 minut pri enakih pogojih.

Po zaključeni inkubaciji smo prekinili reakcijo tako, da smo plošče postavili na led in jih štirikrat sprali z mrzlim pufrom za privzem brez CaCl₂. Celice smo lizirali z dodatkom 300 µL 0,5N NaOH in 10-minutnim stresanjem na stresalniku pri 200 obratih/minuto. V 250 µL lizata smo s scintilacijskim števcem določali količino privzetega histamina, preostanek lizata pa smo uporabili za določanje koncentracije proteinov.

3. Določanje privzetega histamina

Količino histamina, privzetega v celice, smo določali s tekočinskim scintilacijskim števcem (MicroBeta Trilux, Perkin Elmer, ZDA). Števec zazna β-sevanje, ki ga oddaja ³H-histamin pri radioaktivnem razpadu, in nam kot rezultat poda število radioaktivnih razpadov na minuto (DPM = decay per minute).

V Eppendorfove epruvete smo odpipetirali 250 µL vzorca in mu dodali 1,5 mL scintilacijske tekočine Aquasol. Aquasol je univerzalna raztopina za tekočinsko scintilacijsko štetje. Vsebuje aromatska topila in scintilatorje, to so snovi, ki absorbirajo energijo ionizirajočega sevanja ter jo nato oddajo v obliki svetlobe. Števec vsebuje dve fotopomnoževalni celici, ki zaznata svetlobne signale. Meritve so potekale pri sobni temperaturi in tlaku.

4. Določanje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi

Koncentracijo proteinov smo določali kolorimetrično po Bradfordovi metodi, ki temelji na reakciji proteinov z barvilm Coomassie Brilliant Blue G-250. Rdeče barvilo v kislem pojavi na proteine spremeni barvo v modro, ki ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 595 nm.

V vdolbinice na mikrotitrski plošči smo odpipetirali 8 µL vzorca, dodali 152 µL bdestilirane vode in 40 µL reagenta BioRad. Hkrati smo pripravili še standardne raztopine govejega serumskega albumina v koncentracijah 0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 1,6 µg/mL, 2,0 µg/mL, 4,0 µg/mL, 6,0 µg/mL in 10,0 µg/mL ter slep vzorec, s pomočjo katerih smo

dobili umeritveno krivuljo. Vzorce smo dobro premešali in po 30 minutah s UV/VIS-spektrofotometrom (Sunrise, Tecan, Avstrija) izmerili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm. Absorbanca obarvane raztopine je premosorazmerna koncentraciji proteinov v vzorcu. Meritve vsakega vzorca smo opravili v dveh paralelkah.

5. Analiza podatkov

Vse poskuse privzema histamina v astrocite smo izvedli v treh paralelkah in jih najmanj dvakrat ponovili. Podatke smo tako pridobili iz najmanj šestih meritev. Za obdelavo podatkov in risanje grafov smo uporabili računalniški program GraphPad Prism, verzija 5.0 (GraphPad Software Inc., ZDA). Rezultate smo prikazali kot aritmetično sredino \pm standardno napako aritmetične sredine. Statistično razliko med dvema vzorcema smo računali s pomočjo Studentovega t-testa. Statistično značilno razliko je predstavljala vrednost $p \leq 0,05$.

Rezultati

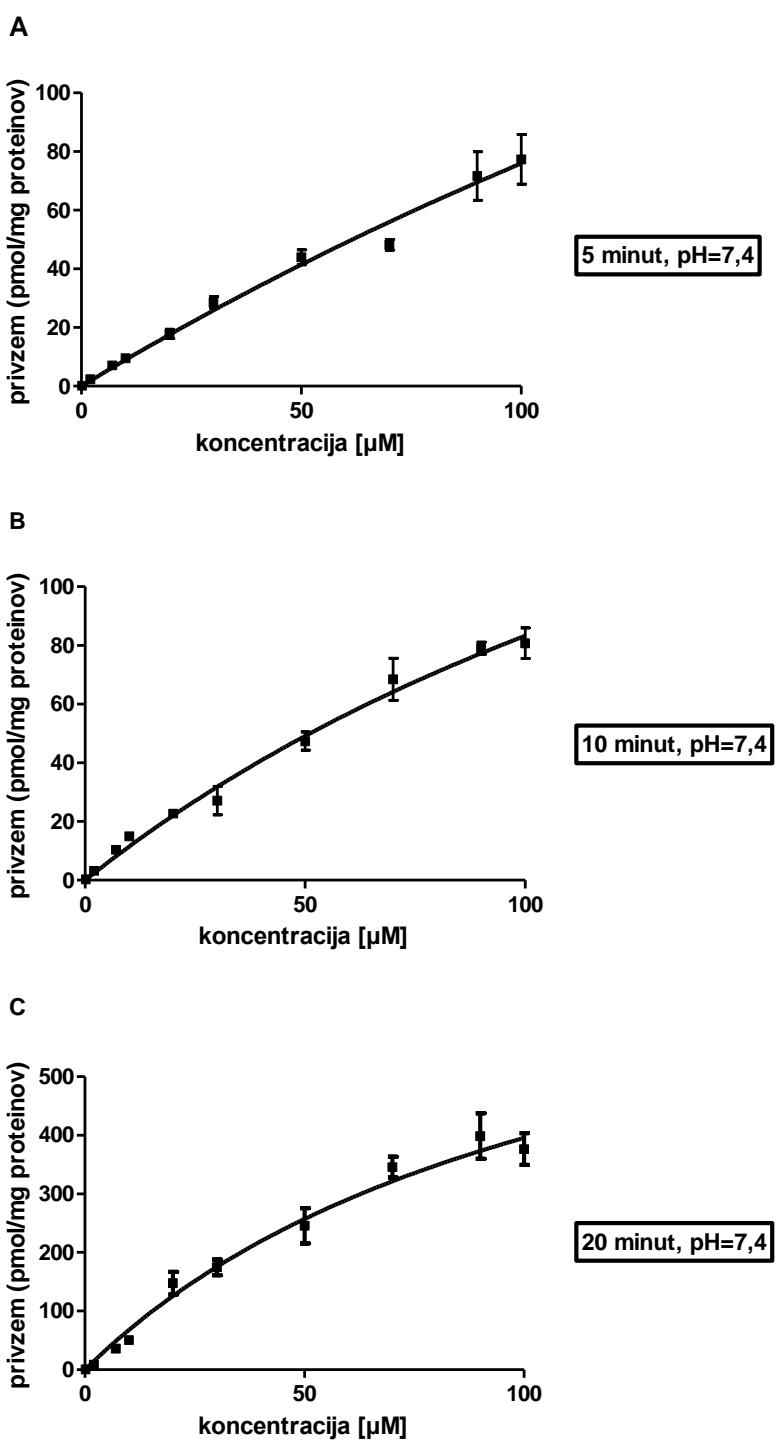
Histamin je pri fiziološki vrednosti pH protonirana molekula, zato ne more prosto prehajati celične membrane. Membrano prehaja s pomočjo prenašalnega proteina oz. prenašalnih proteinov. Ker še ne poznamo specifičnega prenašalca za histamin, kot je na primer prenašalec SERT za serotonin, smo najprej opravili poskuse, s katerimi smo raziskali kinetiko celokupnega privzema histamina v primarno kulturo astrocitov ter določili osnovne parametre privzema: Michaelis-Mentenovo konstanto privzema, maksimalno hitrost privzema ter učinkovitost privzema pri različnih inkubacijskih časih in v različnih eksperimentalnih razmerah (različne vrednosti pH inkubacijskega medija).

Ker se lahko monoaminski nevrotransmitorji prenašajo prek sorodnih prenašalcev, npr. prenašalec SERT lahko poleg serotoninina prenaša še noradrenalin (28), smo v drugem delu diplomske naloge preverili vpliv biogenih aminov (dopamina, L-noradrenalina, serotoninina) in nevrotoksina (6-hidroksidopamina) na privzem histamina v astrocite. Uporabili smo različne koncentracije teh aminov in preverili privzem histamina v astrocite v fizioloških razmerah.

1. Kinetika privzema histamina

1.1. Koncentracijska odvisnost celokupnega privzema histamina

Konfluentne kulture astrocitov smo inkubirali v pufru za privzem (pH 7,4), ki smo mu dodali od 0,125 do 100 $\mu\text{mol/L}$ ^3H -histamina. Inkubacija s ^3H -histaminom je potekala 5, 10 in 20 minut. Količina privzetega histamina je naraščala sorazmerno s koncentracijo histamina v zunajceličnem mediju, če je inkubacijski čas znašal 5 minut (Slika 9A). Ko smo inkubacijski čas podaljševali, se količina privzetega histamina ni več povečevala. Po 10 minutah inkubacije je bila količina privzetega histamina pri najvišjih dveh uporabljenih koncentracijah histamina (90 in 100 $\mu\text{mol/L}$) približno enaka (Slika 9B). Če smo astrocite v primarni kulturi inkubirali 20 minut, se je privzem histamina ustalil že pri 70 $\mu\text{mol/L}$, količina privzetega histamina pa je bila tudi statistično značilno večja kot pri krajevih časih inkubacije (Slika 9C).



Slika 8: Privzem ^3H -histamina v astrocite novorojene podgane v odvisnosti od koncentracije ^3H -histamina pri fiziološkem pH

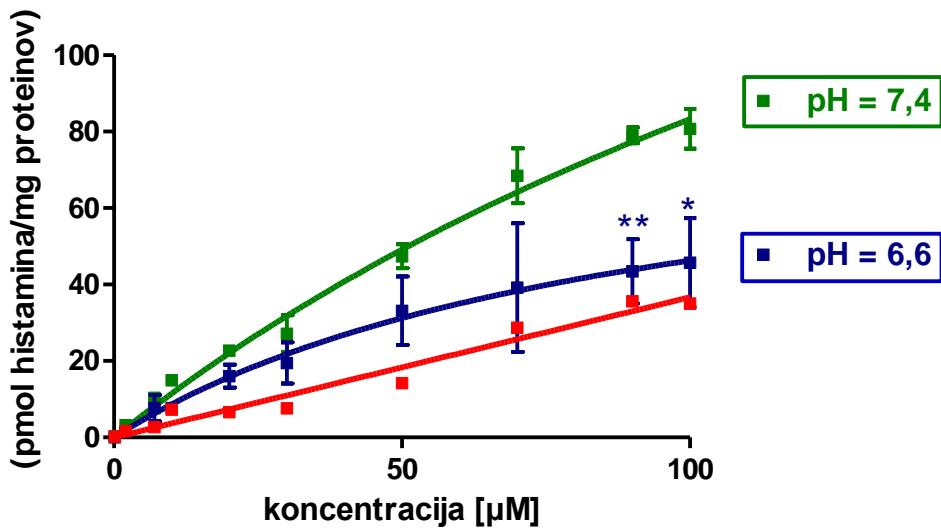
Astrocite smo inkubirali 5, 10 in 20 minut z naraščajočimi koncentracijami ^3H -histamina ($0,125 \mu\text{M}$, $2 \mu\text{M}$, $7 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, $70 \mu\text{M}$, $90 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$). Rezultati so prikazani kot aritmetična sredina \pm standardna napaka aritmetične sredine treh poskusov, opravljenih v triplikatih ($n = 9$).

Količina privzetega histamina je po 5 minutah inkubacije znašala 77,4 pmol/mg proteinov, po 10 minutah 80,7 pmol/mg proteinov, po 20 minutah inkubacije pa 376,5 pmol/mg proteinov, kar je skoraj petkrat več kot po 5- oz. 10-minutni inkubaciji. Dejstvu, da se histamin privzema preko prenašalca in ne difundira, govorji v prid tudi relativno majhen del privzetega histamina. Aktivnost 125 nM 3 H-histamina v inkubacijskem mediju, ki so mu bili izpostavljeni astrociti, je bila 230.000 dpm. V astrocite se ga je privzelo le 1300 dpm (0,57 %).

1.2. Koncentracijska odvisnost nespecifičnega privzema histamina

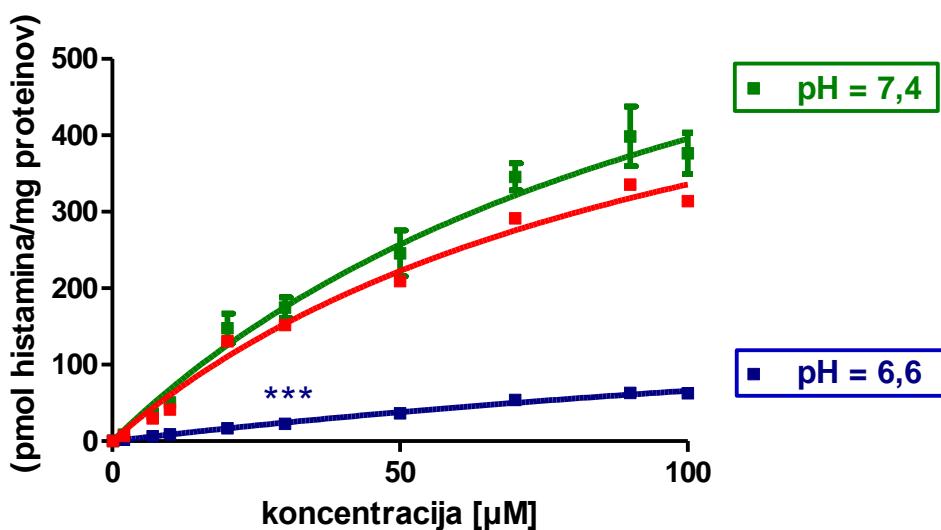
Da ugotovimo, koliko histamina se zares prenese v notranjost celice preko prenašalca, moramo od celokupnega privzema histamina odšteti nespecifični privzem histamina. Ta predstavlja histamin, vezan na membranske receptorje in akceptorje, oz. histamin, ki v astrocite vstopi preko neselektivnih prenašalcev. Nespecifični privzem bi najlažje določili tako, da bi poskus izvedli v razmerah, v katerih bi prenos preko prenašalca zavrl s selektivnim inhibitorjem privzema histamina. Ker (še) ne poznamo primerne učinkovine, ki bi se selektivno vezala in zavrla promet preko prenašalca, preko katerega potuje histamin, lahko nespecifični privzem histamina merimo v »nefizioloških« razmerah. »Nefiziološke« razmere lahko predstavlja temperatura, ki je nižja od 28 °C, ali povišana koncentracija vodikovih ionov ($\text{pH} < 6,8$).

Primarne kulture astrocitov smo inkubirali 10 in 20 minut z naraščajočimi koncentracijami 3 H-histamina (0,125–100 μM). Uporabili smo pufer za privzem z vrednostjo pH 6,6. Rezultate smo prikazali na Sliki 10. Slike 10 je razvidno, da višja koncentracija vodikovih ionov v mediju vpliva na količino privzetega histamina v astrocite. Če smo opazovali privzem histamina po 10-minutni inkubaciji v kislem okolju, se je količina privzetega histamina statistično značilno zmanjšala pri inkubaciji z 90 in 100 $\mu\text{mol/L}$ histamina (Slika 10). Če smo podaljšali čas inkubacije na 20 minut, je postala odvisnost privzema histamina od vrednosti pH še bistveno bolj izrazita (Slika 11). Že pri inkubaciji s 30 μM 3 H-histamina pri pH inkubacijskega medija 7,4 se je v astrocite preneslo signifikantno več histamina ($p<0.0001$), pri višjih koncentracijah se je razlika še povečevala.



Slika 9: Primerjava privzema ^{3}H -histamina v astrocite novorojene podgane pri pH 7,4 in pH 6,6 po 10-minutni inkubaciji

Zelena črta prikazuje privzem histamina pri pH 7,4 (celokupni privzem), modra prikazuje privzem histamina pri pH 6,6 (nespecifični privzem), rdeča pa razliko med celokupnim in nespecifičnim privzemom (specifični privzem). Rezultati so prikazani kot aritmetična sredina \pm standardna napaka aritmetične sredine treh poskusov, opravljenih v triplikatih ($n = 9$).



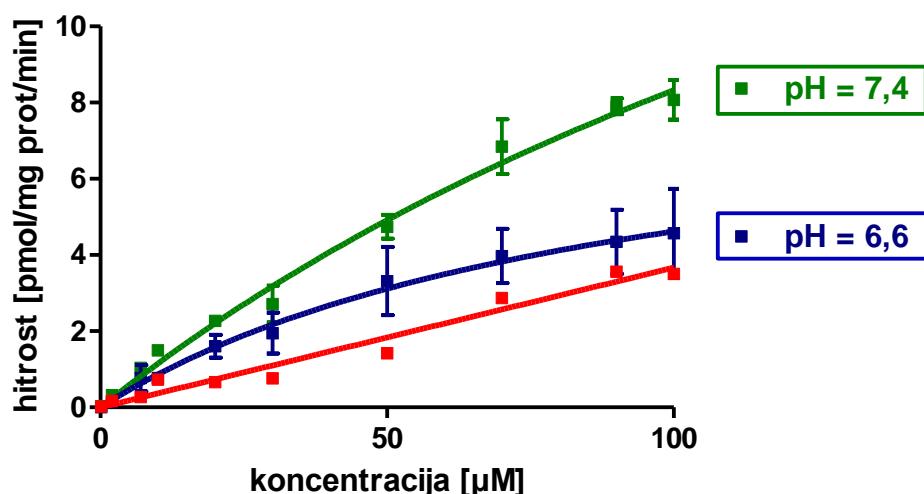
Slika 10: Primerjava privzema ^{3}H -histamina v astrocite novorojene podgane pri pH 7,4 in pH 6,6 po 20-minutni inkubaciji

Zelena črta prikazuje privzem histamina pri pH 7,4 (celokupni privzem), modra prikazuje privzem histamina pri pH 6,6 (nespecifični privzem), rdeča pa razliko med celokupnim in nespecifičnim privzemom (specifični privzem). Rezultati so prikazani kot aritmetična sredina \pm standardna napaka aritmetične sredine treh poskusov, opravljenih v triplikatih ($n = 9$).

1.3. Hitrost privzema histamina

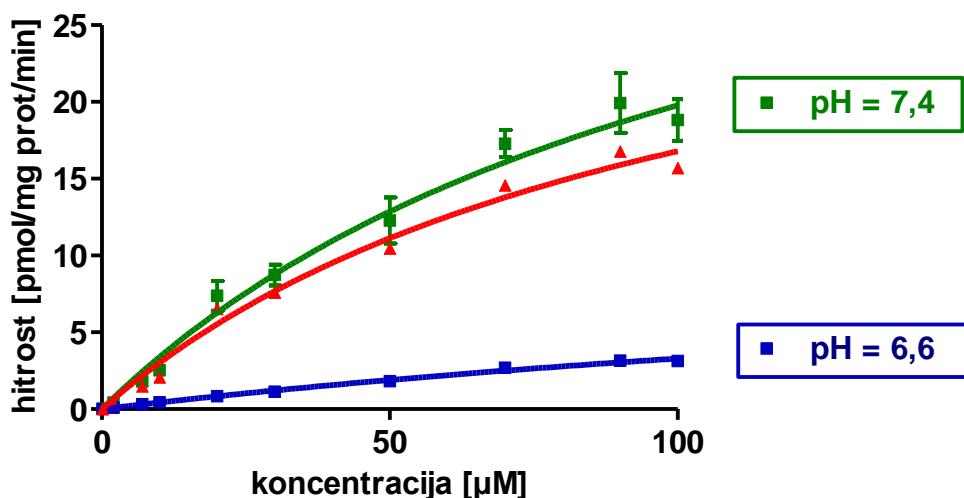
Izračunali smo kinetične parametre privzema histamina v astrocite: Michaelis-Mentenovo konstanto (K_m), maksimalno hitrost privzema (V_{max}) in učinkovitost privzema (V_{max}/K_m). Michaelis-Mentenovo konstanto in maksimalno hitrost privzema smo izračunali s prilagajanjem eksperimentalnih podatkov v enačbi:

$$V = \frac{V_{max} [\text{histamin}]}{K_m + [\text{histamin}]}$$



Slika 11: Hitrost privzema ^3H -histamina v astrocite novorojene podgane pri pH 7,4 in pH 6,6 pri 10 minutah

Zelena črta prikazuje hitrost privzema histamina pri pH 7,4 (celokupni privzem), modra hitrost privzema histamina pri pH 6,6 (nespecifični privzem), rdeča pa razliko hitrosti privzema med celokupnim in nespecifičnim privzemom (specifični privzem). Rezultati so prikazani kot aritmetična sredina \pm standardna napaka aritmetične sredine treh poskusov, opravljenih v triplikatih ($n = 9$).



Slika 12: Hitrost privzema ^3H -histamina v astrocite novorojene podgane pri pH 7,4 in pH 6,6 pri 20 minutah

Zelena črta prikazuje hitrost privzema histamina pri pH 7,4 (celokupni privzem), modra hitrost privzema histamina pri pH 6,6 (nespecifični privzem), rdeča pa razliko hitrosti privzema med celokupnim in nespecifičnim privzemom (specifični privzem). Rezultati so prikazani kot aritmetična sredina \pm standardna napaka aritmetične sredine treh poskusov, opravljenih v triplikatih ($n = 9$).

Kinetični parametri privzema so podani v Preglednici VII.

Preglednica VII: Kinetični parametri privzema histamina v astrocite

Km [μM]*	Vmax [pmol/mg proteinov/min]*	Učinkovitost privzema (Vmax/Km) [μL/mg proteinov/min]
104,0 \pm 28,85	34,26 \pm 5,67	0,33

* aritmetična sredina \pm standardna napaka aritmetične sredine

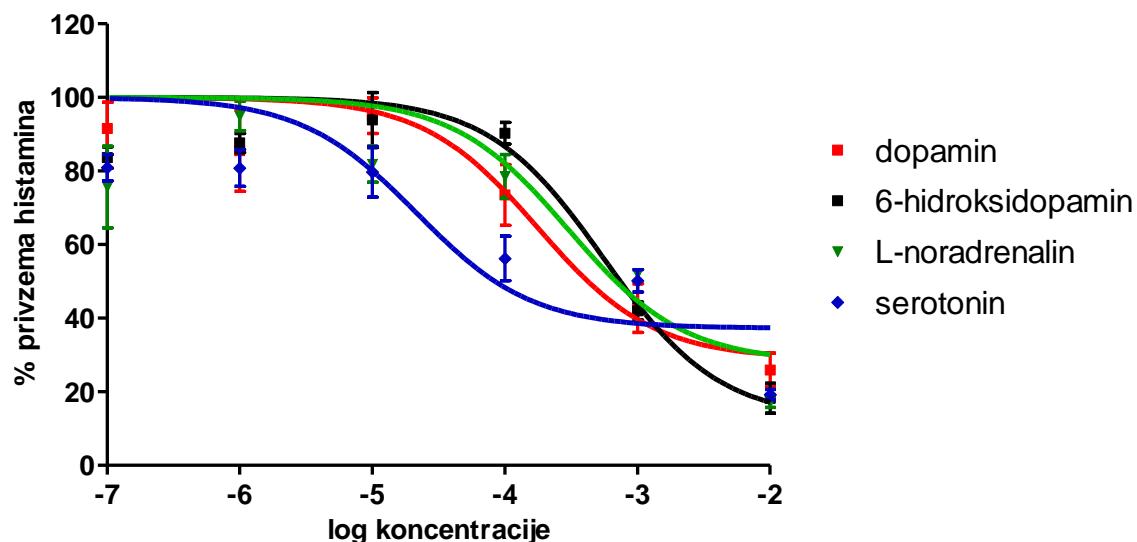
Vrednosti kinetičnih parametrov histamina, relativno majhna afiniteta in velika kapaciteta nakazujejo na privzem preko **nespecifičnega prenašalca**.

2. Vpliv biogenih aminov na privzem histamina

Nespecifični prenašalci, npr. prenašalci za organske katione (OCT), prenašajo veliko endogenih in eksogenih snovi neodvisno od zunajcelične koncentracije natrijevih in kloridnih ionov. Prenašalci za organske katione poleg histamina prenašajo preko

membrane tudi druge biogene amine, zato smo v zadnjem delu naloge žeeli raziskati vpliv biogenih aminov dopamina, L-noradrenalina, serotonina in nevrotoksa 6-hidroksidopamina na privzem histamina v astrocite.

Astrocite smo najprej inkubirali v prisotnosti različnih koncentracij biogenih aminov ($\mu\text{mol}\cdot\text{mmol/L}$) in nato dodali še radioaktivno označen ^3H -histamin ter izmerili količino privzetega histamina.



Slika 13: Inhibicija privzema ^3H -histamina v astrocite novorojene podgane z dopaminom, 6-hidroksidopaminom, L-noradrenalinom in serotoninom

Slika prikazuje delež privzetega ^3H -histamina v odvisnosti od logaritma koncentracije biogenih aminov. Rezultati so prikazani kot aritmetična sredina \pm standardna napaka aritmetične sredine dveh poskusov, opravljenih v triplikatih ($n = 6$).

Slike 14 je razvidno, da so v visokih koncentracijah vsi biogeni amini inhibirali privzem histamina v astrocite novorojene podgane. Pri koncentracijah, nižjih od $10 \mu\text{mol/L}$, biogeni amini niso povzročili inhibicije. Pri višjih koncentracijah so povzročili od koncentracije odvisno zmanjšanje privzema histamina v astrocite. Vrstni red sposobnosti zaviranja privzema histamina je sledeč: serotonin > dopamin > L-noradrenalin = 6-hidroksidopamin (Preglednica VIII).

Preglednica VIII: Vrednosti logIC₅₀ in odstotek največje inhibicije celokupnega privzema histamina v astrocite novorojene podgane

Amin	log IC ₅₀	Največja inhibicija [%]
Dopamin	-3,488	74 %
6-hidroksidopamin	-3,091	82 %
L-noradrenalin	-2,907	83 %
Serotonin	-3,583	81 %

V Preglednici VIII so podani logaritmi vrednosti IC₅₀ in odstotek največje inhibicije privzema celokupnega histamina.

Rezultati inhibicijskih študij privzema histamina nakazujejo na možnost, da različni biogeni amini uporabljajo isti nizkoafinitetni visokokapacitetni prenašalni protein za privzem v astrocite novorojene podgane.

Razprava

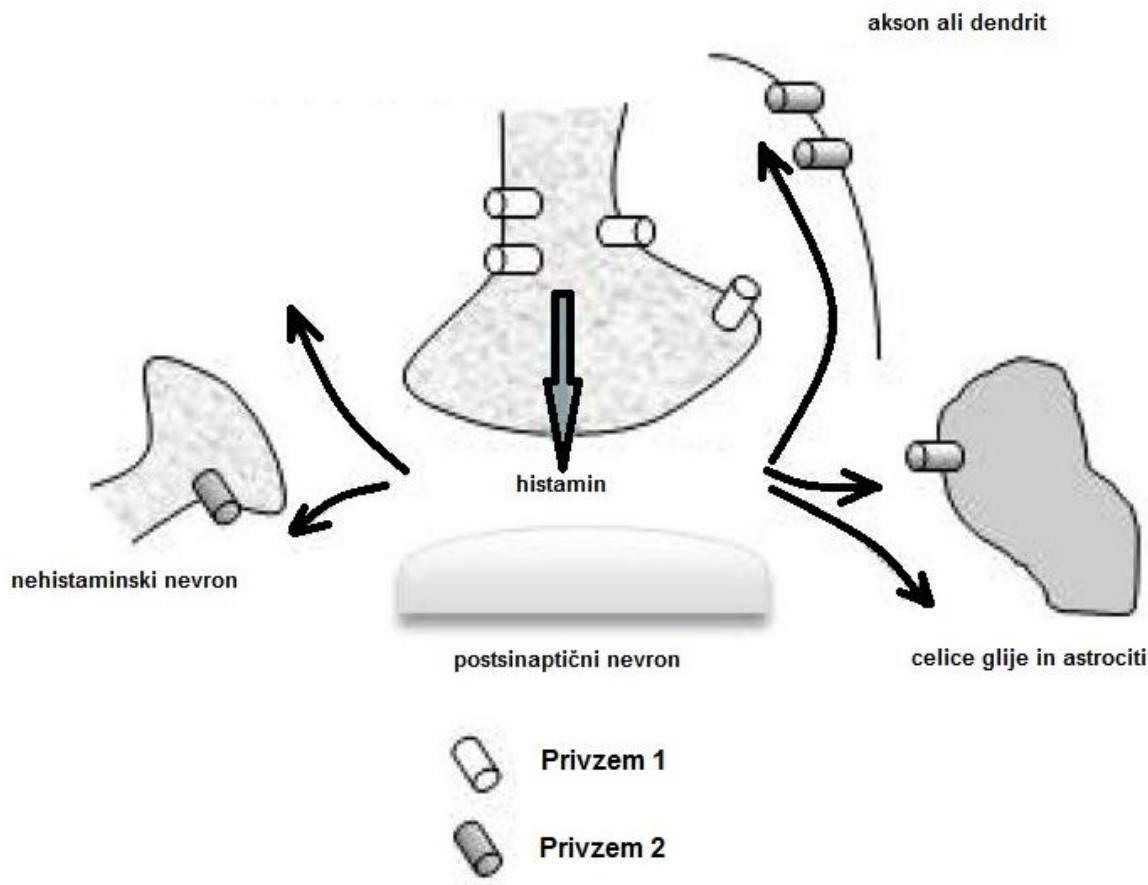
Človeški možgani omogočajo vrsto aktivnosti: sprejemanje informacij iz okolja s pomočjo čutil, nadzor telesne temperature, arterijskega tlaka in dihanja, z njimi mislimo, sanjamo, čustvujemo. Možgani vse aktivnosti nadzorujejo, usmerjajo in koordinirajo. Prenos informacij v osrednjem živčnem sistemu poteka predvsem s sinaptičnim prenosom. Za normalno delovanje osrednjega živčevja je zelo pomembno natančno uravnavanje sproščanja nevrotransmitorjev iz presinaptičnih nevronov in njihova inaktivacija oziroma odstranitev iz sinaptične špranje. Astrocyti so celice, ki igrajo pomembno vlogo v tem procesu. Privzemajo presežek kalijevih ionov in nevrotransmitorjev iz sinaptične špranje. Tako vzdržujejo homeostazo in preprečujejo pretirano vzdražnost nevronov ter njihovo poškodbo.

Znanstveniki že vrsto let iščejo prenašalca za histamin, ki bi bil podoben specifičnim prenašalcem za druge nevrotransmitorje, kot so prenašalni proteini za serotonin (SERT), dopamin (DAT) in noradrenalin (NET). Prav tako še ni znano, preko katerih nespecifičnih prenašalcev bi se lahko histamin prenašal čez membrano celic osrednjega živčevja.

Histamin je biogeni amin, ki je pri fiziološkem pH pozitivno nabit, zato ne more prosti prehajati celičnih membran, ampak potrebuje prenašalni protein, s pomočjo katerega lahko vstopa v celico in iz nje. Histamin bi se v osrednjem živčnem sistemu lahko privzemal v živčne celice in celice glije preko prenašalnih proteinov za biogene amine: za serotonin (SERT), dopamin (DAT) in noradrenalin (NET). Za te prenašalne proteine (DAT, SERT, NET) je znano, da ne privzemajo le enega, ampak več strukturno podobnih nevrotransmitorjev (28).

Do sedaj je več raziskovalcev prišlo do ugotovitve, da je privzem histamina v astrocite novorojene podgane visokoafiniteten in nizkokapacitetni proces, odvisen od časa, koncentracije histamina in temperature (29,30). Histamin se tudi v nevrone privzema preko visokoafinitetnega in nizkokapacitetnega prenašalca, vendar je hitrost privzema približno 1000-krat manjša kot hitrost privzema v celice glije, kar potrjuje dejstvo, da astrocyti predstavljajo glavno mesto inaktivacije tega nevrotransmitorja (31).

Naši rezultati potrjujejo, da se histamin v astrocite prenaša s pomočjo prenašalnega proteina, preko katerega se lahko prenašajo tudi drugi biogeni amini, in sicer s procesom, ki je bolj podoben privzemu 2 kot privzemu 1.



Slika 14: Shematski prikaz prenašalcev privzema 1 in privzema 2

Dokazi, ki potrjujejo zgornjo trditev, so naslednji:

- 1) privzem histamina je odvisen od časa inkubacije in koncentracije zunajceličnega histamina ter vrednosti pH v inkubacijskem mediju;
- 2) specifični privzem histamina je nasitljiv proces z majhno afiniteto (K_m znaša $104,0 \mu\text{M}$) in veliko kapaciteto ($V_{max} = 34,26 \text{ pmol/mg proteinov/minuto}$);
- 3) prenos histamina preko celične membrane zmanjšajo drugi biogeni amini.

Različni avtorji so že poročali, da obstaja privzem histamina z visoko afiniteto v živčne celice (32), astrocite (29) in endotelijalne celice (33). Privzem nevrotransmitorjev preko prenašalcev z visoko afiniteto je vedno odvisen od koncentracije natrijevih, kloridnih in

vodikovih ionov v zunajceličnem prostoru ali inkubacijski tekočini in je energetsko potraten proces.

V predhodnih raziskavah smo že potrdili, da je privzem histamina odvisen le od prisotnosti natrijevih ionov in aktivnosti membranske Na^+/K^+ -ATPaze (34). V diplomskem delu smo dokazali, da je privzem histamina odvisen tudi od vrednosti pH neposrednega okolja. Aktivnost večine specifičnih prenašalcev za biogene amine (NET, DAT, SERT) je odvisna od koncentracije zunajceličnih natrijevih in kloridnih ionov, medtem ko je aktivnost prenašalcev za glutamat odvisna od prisotnosti natrijevih in vodikovih ionov (2). Morebitni prenašalni protein za histamin je zaradi odvisnosti od natrijevih in vodikovih ionov bolj soroden prenašalcem za glutamat kot pa specifičnim transporterjem za biogene amine.

Specifični privzem (privzem preko prenašalca) predstavlja razlika med celokupnim in nespecifičnim privzemom. Nespecifični privzem je prenos snovi preko membrane, ki poteka mimo specifičnega prenašalca. Del histamina se lahko v eksperimentalnih razmerah veže tudi na receptorska in nereceptorska vezavna mesta, česar naša metoda ne loči.

V eksperimentalnih razmerah ponazorimo nespecifični privzem tako, da prenos zavremo farmakološko (z učinkovino, ki selektivno zavre prenos) ali imunološko (s protitelesom proti prenašalcu). Če ne poznamo prenašalca ali če nimamo ustreznih farmakoloških in imunoloških orodij, opazujemo privzem v »nefizioloških« razmerah (temperatura, manjša od 28 °C, ali nizka vrednost pH). V naših poskusih smo za določanje nespecifičnega privzema tega opazovali pri pH 6,6. Pri 20-minutni inkubaciji je bil celokupni privzem pri najvišjih uporabljenih koncentracijah skoraj 5-krat večji kot nespecifični.

Biogeni amini imajo v razmerah *in vitro* do svojega prenašalca zelo visoko afiniteto (10 nM – 1 μM), v razmerah *in vivo* pa je ta bistveno manjša. Relativno visoka vrednost K_m privzema histamina v astrocite nakazuje, da se histamin v astrocite prenaša s privzemom 2, ki vključuje nespecifičnega prenašalca. Podobno vrednost K_m (141 μM) in hitrost privzema (22,5 pmol/mg proteinov/minuto) smo določili na primarnih kulturah astrocitov, pripravljenih iz možganov odrasle podgane. Med nespecifične prenašalce, ki bi lahko prenašali histamin, sodijo prenašalci za organske katione in membranski prenašalec za biogene amine. Prenos histamina in drugih biogenih aminov preko OCT3 so dokazali v

razmerah *in vitro* (14) ter *in vivo* (35), prenos histamina preko OCT2 je opisan tudi v razmerah *in vitro*, natančneje v celicah HEK293, v katere so prenesli mRNA za OCT2 (36).

Prenos histamina preko prenašalcev OCT lahko izključimo, ker se v astrocitih nahaja le izoblika OCT2, izooblika OCT3 pa je prisotna le v živčnih celicah (37). OCT2 ima zelo majhno afiniteto za privzem histamina ($K_m = 940 \mu\text{M}$) (38). Privzem preko OCT2 tudi ni odvisen od prisotnosti natrijevih ionov in ni energetsko potraten proces (2).

Naslednji kandidat, preko katerega bi se histamin lahko prenašal v astrocite, je membranski prenašalec za monoamine (PMAT). To hipotezo podpirajo tudi rezultati inhibicijskih študij privzema, saj so visoke koncentracije vseh uporabljenih biogenih aminov zavirale prenos histamina v celice. Biogeni amini nikoli niso povzročili 100 % inhibicije celokupnega privzema; povzročili so največ 83 % inhibicijo, torej so vplivali le na specifični privzem.

Membranski prenašalec za monoamine ima najvišjo afiniteto za prenos serotoninina in dopamina, nižjo za prenos noradrenalina in najnižjo za prenos histamina. Vrstni red afinitet zaviranja prenosa histamina, ki smo ga dobili v naših poskusih, je bil naslednji: serotonin > dopamin > noradrenalin, kar potrjuje morebitno vpletene prenašalce PMAT, vendar se ta naj ne bi izražal v astrocitih (28) v razmerah *in vivo*. Mi smo poskuse opravili na primarnih kulturah astrocitov, ki so pet tednov rastli samostojno in izolirano od drugih celic. Celice v primarni kulti lahko izgubijo ali pridobijo nekatere lastnosti, ker živijo v drugačnih razmerah. Možno je, da se je v njih izrazil membranski prenašalec za monoamine, vendar moramo to dejstvo v nadalnjih raziskavah še potrditi.

Sklep

Rezultati našega dela dokazujejo, da se histamin privzema v astrocite preko nespecifičnega prenašalnega proteina z nizko afiniteto in visoko kapaciteto. Preko istega prenašalnega proteina se lahko prenašajo tudi drugi biogeni amini, in sicer s procesom, ki je bolj podoben privzemu 2 kot privzemu 1.

V diplomskem delu smo potrdili vse zastavljene hipoteze.

1. Privzem histamina v astrocite je odvisen od časa inkubacije in koncentracije histamina v zunajceličnem mediju. Poteka preko enega ali več prenašalnih proteinov. Morebitni prenašalni protein za histamin je zaradi odvisnosti od natrijevih in vodikovih ionov bolj soroden prenašalcem za glutamat kot pa specifičnim transporterjem za biogene amine.
2. Najboljša učinkovitost privzema histamina v astrocite je v fizioloških razmerah: pri telesni temperaturi, ustrezni sestavi inkubacijskega medija in fiziološki vrednosti pH. Pri slednji se privzame tudi do 5-krat več histamina kot pri nižji vrednosti pH.
3. Biogeni amini (dopamin, L-noradrenalin in serotonin) ter 6-hidroksidopamin zmanjšajo privzem histamina v astrocite, histamin se torej v astrocite prenaša preko nespecifičnega prenašalca z nizko afiniteto in veliko kapaciteto. Biogeni amini nikoli niso povzročili 100 % inhibicije celokupnega privzema, povzročili so največ 83 % inhibicijo, torej so vplivali le na specifični privzem.

Literatura

1. Jenkins GW, Kemnitz CP, Tortora GJ: Anatomy and Physiology. 2nd Edition, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, 2010: 358–425.
2. Perdan K, Lipnik-Štangelj M, Kržan M: The Impact of Astrocytes in the Clearance of Neurotransmitters by Uptake and Inactivation. Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes 2009; 9: 211–235.
3. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM: Principles of Neural Science. 4th Edition, McGraw-Hill Companies, Inc., New York, 2000: 19–34, 175–186, 280–297.
4. Kržan M: Funkcija astrocitov. Zdr Vest 2001; 70: 553–559.
5. Perko D, Zaletel M: Pomen astrocitov, obžilnih živčnih vlaken in možganskega žilnega endotelija pri regulaciji možganskega krvnega pretoka. Med Razgl 2008; 47: 283–291.
6. Lekov medicinski e-slovar. Dosegljivo na:
<http://lsm1.amebis.si/lsmeds/novPogoj.aspx?pPogoj=neurotransmitor>.
Dostop: 16. 8. 2012.
7. Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC: Molecular Neuropharmacology, a foundation for clinical neuroscience. McGraw-Hill, New York, 2001: 167–190.
8. http://www.nature.com/nature/journal/v457/n7230/fig_tab/457675a_F3.html.
Dostop: 4. 9. 2012.
9. Lee G, Dallas S, Hong M, Bendayan R: Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchyma considerations. Pharmacol Rev 2001; 53: 569–596.
10. Koepsell H: Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs. Trends Pharmacol Sci 2004; 25: 375–381.
11. Gether U, Andersen PH, Larsson OM, Schousboe A: Neurotransmitter transporters: molecular function of important drug targets. Trends Pharmacol Sci 2006; 27: 375–383.
12. Jonker JW, Schinkel AH: Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). J Pharmacol Exp Ther 2004; 308: 2–9.
13. Dahlin A, Xia L, Kong W, Hevner R, Wang J: Expression and immunolocalization of the plasma membrane monoamine transporter in the brain. Neuroscience 2007; 146: 1193–1211.

14. Duan H, Wang J: Selective transport of monoamine neurotransmitters by human plasma membrane monoamine transporter and organic cation transporter 3. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 335: 743–753.
15. Iversen L: Neurotransmitter transporters and their impact on the development of psychopharmacology. *Br J Pharmacol* 2006; 147 Suppl 1: S82–S88.
16. Passani MB, Giannoni P, Bucherelli C, Baldi E, Blandina P: Histamine in the brain: beyond sleep and memory. *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 1113–1122.
17. Williams DA, Lemke TL: Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002: 794–812.
18. Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O: Histamine in the nervous system. *Physiol Rev* 2008; 88: 1183–1241.
19. Brown RE, Stevens DR, Haas HL: The physiology of brain histamine. *Prog Neurobiol* 2001; 63: 637–672.
20. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al.: Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th Edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1999. Dosegljivo na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27927/figure/A1020/>. Dostop: 23. 8. 2012.
21. Passani MB, Blandina P: Histamine receptors in the CNS as targets for therapeutic intervention. *Trends Pharmacol Sci* 2011; 32: 242–249.
22. Haas H, Panula P: The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 121–130.
23. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G: Rang & Dale's Pharmacology. 7th Edition, Churchill Livingstone, Toronto, 2012: 442–475.
24. Huang YF, Chiang CK, Lin YW, Liu K, Hu CC, Bair MJ, Chang HT: Capillary electrophoretic separation of biologically active amines and acids using nanoparticle-coated capillaries. *Electrophoresis* 2008; 29: 1942–1951.
25. Rudnick G, Kirk KL, Fishkes H, Schuldiner S: Zwitterionic and anionic forms of a serotonin analog as transport substrates. *J Biol Chem* 1989; 264: 14865–14868.
26. Anderson DG, Mariappan SV, Buettner GR, Doorn JA: Oxidation of 3,4 dihydroxyphenylacetaldehyde, a toxic dopaminergic metabolite, to a semiquinone radical and an ortho-quinone. *J Biol Chem* 2011; 286: 26978–26986.
27. Bačar S, Koder S: Farmakoterapija depresivnih motenj. *Farm Vest* 2006; 57: 245–250.
28. Daws LC: Unfaithful neurotransmitter transporters: focus on serotonin uptake and implications for antidepressant efficacy. *Pharmacol Ther* 2009; 121: 89–99.

29. Huszti Z: Carrier-mediated high affinity uptake system for histamine in astroglial and cerebral endothelial cells. *J Neurosci Res* 1998; 51: 551–558.
30. Osredkar D, Burnik-Papler T, Pečavar B, Kralj-Iglič V, Kržan M: Kinetic and pharmacological properties of [(3)H]-histamine transport into cultured type 1 astrocytes from neonatal rats. *Inflamm Res* 2009; 58: 94–102.
31. Rafalowska U, Waskiewicz J, Albrecht J: Is neurotransmitter histamine predominantly inactivated in astrocytes? *Neurosci Lett* 1987; 80: 106–110.
32. Sakurai E, Sakurai E, Oreland L, Nishiyama S, Kato M, Watanabe T, Yanai K: Evidence for the presence of histamine uptake into the synaptosomes of rat brain. *Pharmacology* 2006; 78: 72–80.
33. Černe K, Irmam-Florjanc T, Kržan M: Histamine uptake into human vascular endothelial cells and influence of three different antidepressant drugs. *Inflamm Res* 2008; 57 Suppl 1: S37–S38.
34. Perdan-Pirkmajer K, Mavri J, Kržan M: Histamine (re)uptake by astrocytes: an experimental and computational study. *J Mol Model* 2010; 16: 1151–1158.
35. Gasser PJ, Lowry CA, Orchinik M: Corticosterone-sensitive monoamine transport in the rat dorsomedial hypothalamus: potential role for organic cation transporter 3 in stress-induced modulation of monoaminergic neurotransmission. *J Neurosci* 2006; 26: 8758–8766.
36. Amphoux A, Vialou V, Drescher E, Bruss M, Mannoury la CC, Rochat C, Millan MJ, Giros B, Bonisch H, Gautron S: Differential pharmacological in vitro properties of organic cation transporters and regional distribution in rat brain. *Neuropharmacology* 2006; 50: 941–952.
37. Perdan-Pirkmajer K, Pirkmajer S, Černe K, Kržan M: Molecular and kinetic characterization of histamine transport into adult rat cultured astrocytes. *Neurochem Int* 2012; 61: 415–422.
38. Koepsell H, Lips K, Volk C: Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res* 2007; 24: 1227–1251.