

**UNIVERZA V LJUBLJANI**  
**FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**ROK KOJC**

**DIPLOMSKA NALOGA**

**UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

**Ljubljana, 2013**

**UNIVERZA V LJUBLJANI**  
**FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**ROK KOJC**

**VPLIV MOTENE ENERGIJSKE PRESNOVE NA**  
**PRIVZEM HISTAMINA V ASTROCITE**  
**NOVOROJENE PODGANE**

**THE IMPACT OF IMPAIRED ENERGY**  
**METABOLISM ON HISTAMINE UPTAKE**  
**INTO NEONATAL RAT ASTROCYTES**

**Ljubljana, 2013**

Diplomsko nalogo sem opravljal na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo ter Inštitutu za patološko fiziologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof.dr. Mojce Kržan in somentorstvom doc. dr. Sergeja Pirkmajerja.

### **Zahvala**

Hvala tehnični sodelavki Jožici Košir za pomoč v laboratoriju ter somentorju Sergeju Pirkmajerju za raziskovalne zamisli in strokovne nasvete.

Iskrena hvala mentorici Mojci Kržan za dostopnost, sproščen odnos ter posredovanje svojega znanja in izkušenj.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelal samostojno, pod mentorstvom prof.dr. Mojce Kržan in somentorstvom doc. dr. Sergeja Pirkmajerja.

Rok Kojc

## VSEBINA

Povzetek.....	VI
Abstract.....	VII
Okrajšave in simboli .....	VIII
UVOD.....	1
1. Histološka zgradba osrednjega živčnega sistema .....	1
2. Funkcije astrocitov .....	2
2.1. Astroцитi oskrbujejo živčne celice s hranili .....	2
2.2. Astroцитi iz sinapse privzemajo glutamat .....	2
2.3. Zaščita živčnih celic pred radikali.....	2
2.4. Ohranjanje homeostaze ionov v zunajceličnem prostoru.....	2
2.5. Regulacija mikrocirkulacije v možganih.....	3
3. Tridelna sinapsa .....	3
4. Inaktivacija živčnih prenašalcev .....	4
4.1. Difuzija.....	4
4.2. Encimska razgradnja .....	4
4.3. Privzem v presinaptično živčno celico.....	4
4.4. Privzem v celice glije .....	5
5. Oblika prenosa preko membranskih prenašalcev .....	5
6. Vloga astrocitov pri privzemu histamina .....	5
7. Histamin .....	6
7.1. Kemijske lastnosti .....	7
7.2. Histamin v osrednjem živčnem sistemu .....	7
7.3. Biosinteza in presnova .....	8
8. Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaza.....	9
8.1. Uvrstitev NKA .....	10
8.2. Zgradba NKA.....	10
8.3. Farmakološki pomen izooblik NKA .....	11

8.4. Signalna funkcija NKA .....	12
9. Kardiotonični glikozidi .....	12
9.1. Endogeni kardiotonični glikozidi .....	13
9.2. Razdelitev in struktura .....	13
10. Natrijev fluorid.....	14
11. Natrijev azid in kalijev cianid .....	14
12. Hipoksija .....	15
NAMEN DELA .....	16
MATERIALI IN METODE .....	18
1. Kemikalije in oprema.....	18
2. Priprava celičnih kultur astrocitov .....	18
3. Privzem histamina v celične kulture astrocitov .....	20
4. Določanje privzetega histamina .....	22
5. Določanje koncentracije proteinov .....	23
6. Priprava vzorcev za gelsko elektroforezo in gelska elektroforeza.....	23
7. Prenos iz gela na PVDF membrano (prenos western) .....	24
8. Imunodetekcija.....	24
9. Analiza podatkov .....	25
REZULTATI .....	27
RAZPRAVA.....	39
SKLEP .....	46
LITERATURA .....	47

## Kazalo slik

Slika 1: Medsebojna lega in povezanost celic v osrednjem živčnem sistemu.....	1
Slika 2: Primarna kultura astrocitov iz možganske skorje novorojene podgane .....	1
Slika 3: Glutamat in delovanje tridelne sinapse .....	3
Slika 4: Tautomerne oblike histamina .....	7
Slika 5: Projekcije histaminskih nevronov .....	8
Slika 6: Shematski prikaz encima $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze .....	11
Slika 7: Shematski prikaz delovanja kardiotioničnih glikozidov .....	12
Slika 8: Kardiotionični glikozidi .....	13
Slika 9: Shematski prikaz dihalne verige .....	15
Slika 10: Koncentracijska odvisnost privzema [ $^3\text{H}$ ]-histamina po izpostavitvi 1 mM NaF .....	27
Slika 11: Koncentracijska odvisnost privzema [ $^3\text{H}$ ]-histamina po izpostavitvi 0,1 mM KCN .....	28
Slika 12: Koncentracijska odvisnost privzema [ $^3\text{H}$ ]-histamina po izpostavitvi 1 mM $\text{NaN}_3$ .....	29
Slika 13: Koncentracijska odvisnost privzema [ $^3\text{H}$ ]-histamina v pufru za privzem brez $\text{Na}^+$ ionov .....	30
Slika 14: Koncentracijska odvisnost privzema [ $^3\text{H}$ ]-histamina v pufru za privzem z zvišano koncentracijo $\text{K}^+$ ionov na 50 mM .....	31
Slika 15: Koncentracijska odvisnost privzema [ $^3\text{H}$ ]-histamina v pufru za privzem z znižano koncentracijo $\text{K}^+$ ionov na 1,2 mM .....	31
Slika 16: Primerjava privzema histamina pri koncentraciji 100 $\mu\text{M}$ [ $^3\text{H}$ ]-histamina .....	32
Slika 17: Privzem 125 nM [ $^3\text{H}$ ]-histamina ob dodatku holinijevega klorida .....	33
Slika 18: Vpliv ishemije na privzem 125 nM [ $^3\text{H}$ ]-histamina .....	34
Slika 19: Vpliv ishemije in ouabaina na privzem 125 nM [ $^3\text{H}$ ]-histamina .....	34
Slika 20: Privzem 125 nM [ $^3\text{H}$ ]-histamina .....	35
Slika 21: Privzem 50 $\mu\text{M}$ [ $^3\text{H}$ ]-histamina .....	36
Slika 22: Barvanje z barvilom Ponceau S, imunodetekcija GFAP in PMAT .....	37
Slika 23: Barvanje z barvilom Ponceau S, imunodetekcija GFAP in pERK1/2 .....	38

## **Kazalo preglednic**

Preglednica I: Izooblike podenot NKA in njihova izraženost v tkivih različnih živalskih vrst .....	11
Preglednica II: Učinki različnih posegov v celični metabolizem na $[Na^+]_i$ v kulturi astrocitov iz hrbtenjače podgane. ....	15
Preglednica III: Sestava medija za gojenje astrocitov .....	19
Preglednica IV: Sestava pufra za privzem histamina .....	20
Preglednica V: Sestava pufra za privzem z visoko koncentracijo KCl .....	21
Preglednica VI: Uporabljena protitelesa.....	25

## **Kazalo enačb**

Enačba 1: Izračun proste Gibbsove energije .....	10
Enačba 2: Število razpadov radioaktivnega izotopa na minuto.....	22
Enačba 3: Izračun koncentracije $[^3H]$ -histamina v vzorcu .....	22
Enačba 4: Izračun velikosti vzorca .....	26

## **Povzetek**

V diplomskem delu smo celične kulture astrocitov iz možganske skorje novorojene podgane izpostavili različnim inhibitorjem normalne energijske presnove in s tem zavrli nastajanje ATP v celici. Z 1 mM NaF smo zavrli glikolitične procese v celici in privzem histamina se je zmanjšal. Inhibicija dihalne verige z 0,1 mM KCN ali 1 mM NaN<sub>3</sub> je prav tako povzročila zmanjšanje privzema histamina. Iz tega lahko zaključimo, da zaviranje energijsko odvisnih procesov v celici zmanjša privzem histamina.

Ugotovili smo, da je privzem histamina odvisen od Na<sup>+</sup> ionov, vendar na privzem še v večji meri vplivajo K<sup>+</sup> ioni.

Presenetljivo pa se je po izpostavitvi hipoksiji in odtegnitvi hranil (simulacija možganske kapi) privzem histamina povečal. Menimo, da je to posledica porušene integritete celične membrane astrocitov in posledičnega neselektivnega privzema, kljub temu pa drugih vzrokov ne moremo povsem izključiti.

Inhibicija membranske Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze z ouabainom ni vplivala na privzem, čeprav smo ob uporabi ouabaina in digoksina v koncentraciji 10<sup>-7</sup> M opazili vpliv na privzem, ki bi lahko bil posledica aktivacije signalne funkcije Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze.

Specifični membranski prenašalec za histamin še ni poznan. Predpostavke, da je to membranski prenašalec za monoamine (PMAT, SLC29A4), s prenosom western in uporabo protiteles proti PMAT nismo potrdili. Z veliko verjetnostjo pa lahko trdimo, da je ouabain v celicah sprožil signalno pot ERK1/2.

Zaključimo lahko, da zaviranje energijsko odvisnih celičnih procesov zmanjša privzem histamina v astrocite. Privzem histamina je odvisen od K<sup>+</sup> ionov in v manjši meri od Na<sup>+</sup> ionov. Privzem histamina ne poteka preko membranskega prenašalca za monoamine (PMAT), ouabain pa v astrocitih najverjetneje sproži znotrajcelično signalno pot ERK1/2.

**Ključne besede:** astrociti, privzem histamina, energijska presnova, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaza, PMAT



## **Abstract**

In the present work cultures from cerebral cortices of neonatal rat astrocytes were prepared and incubated with various inhibitors of cellular energy metabolism. We inhibited the glycolytic pathway with 1 mM NaF which resulted in decreased histamine uptake. Direct inhibition of respiratory chain with 0,1 mM KCN or 1 mM NaN<sub>3</sub> resulted in a significant decrease in histamine uptake, as well. We conclude that inhibition of energy-required cellular processes results in decreased histamine uptake.

Moreover, Na<sup>+</sup> and especially K<sup>+</sup> ions influence histamine uptake.

Astrocyte cultures were exposed to hypoxic conditions and glucose deprivation which surprisingly resulted in an increase of histamine uptake. The increased uptake is probably nonspecific due to functional damage of the cellular membrane integrity.

Histamine uptake does not appear to be sensitive to ouabain inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. On the other hand, incubating the astrocytes with low concentrations of ouabain and digoxin (10<sup>-7</sup> M) influenced the histamine uptake. This could be the result of the activation of intracellular signalling pathways triggered by the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Indeed, our results suggest that ouabain stimulated the activation of ERK1/2 signalling pathway.

A specific histamine uptake carrier remains undetermined. Using western blot and specific anti-PMAT antibodies we were unable to confirm the involvement of plasma membrane monoamine transporter (PMAT, SLC29A4) in histamine uptake.

We conclude that inhibition of energy-required processes decreases histamine uptake in cultured astrocytes. Histamine uptake is Na<sup>+</sup> and especially K<sup>+</sup> dependent and does not appear to involve PMAT. In addition, our results suggest ouabain induces the activation of ERK1/2 signalling pathway in cultured astrocytes.

**Keywords:** astrocytes, histamine uptake, energy metabolism, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, PMAT

## Okrajšave in simboli

[K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>- znotrajcelična koncentracija kalijevih ionov

[K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>- zunajcelična koncentracija kalijevih ionov

[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>- znotrajcelična koncentracija natrijevih ionov

[Na<sup>+</sup>]<sub>o</sub>- zunajcelična koncentracija natrijevih ionov

ATP- adenzin-5'-trifosfat

EGFR- receptor za epidermalni rastni dejavnik (angl. *epidermal growth factor receptor*)

ERK1/2- z zunajceličnimi signali regulirana kinaza (angl. *extracellular signal-regulated kinase 1/2*- sinonim: p44/42 MAPK)

GABA-  $\gamma$ -aminomaslena kislina

GFAP- glialna fibrilarna kislina beljakovina (angl. *glial fibrillary acidic protein*)

KG- kardiotonični glikozidi

MAPK- z mitogeni aktivirana protein kinaza (angl. *mitogen-activated protein kinase*)

mRNA- informacijska ribonukleinska kislina (angl. *messenger RNA*)

NKA- Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- ATPaza (sinonim: Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- črpalka ali Na<sup>+</sup>- črpalka)

NMDAR- glutamatni ionotropni receptor, katerega selektivni agonist je *N*-metil-D-aspartat (NMDA)

OCT- družina prenašalcev organskih kationov (angl. *organic cation transporters*)

PMAT- membranski monoaminski prenašalec (angl. *plasma membrane monoamine transporter*, ENT4, SLC29A4)

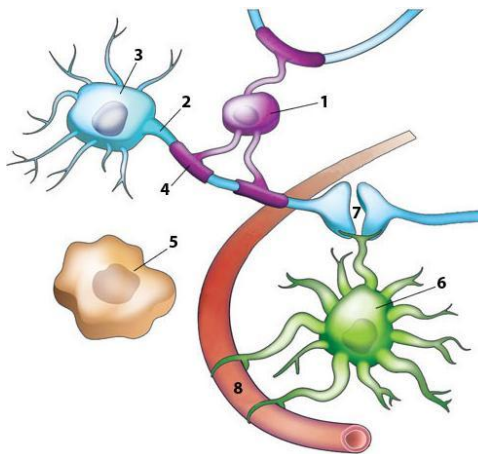
Ras- signalna beljakovina Ras iz skupine monomernih beljakovin G

SLC6- prenašalec topljencev 6 (angl. *solute carrier 6*)

## UVOD

### 1. Histološka zgradba osrednjega živčnega sistema

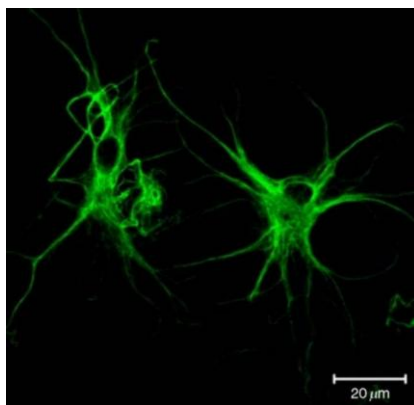
Osrednji živčni sistem sestavljajo živčne celice in celice nevroglije. Celice glije so najštevilnejše celice osrednjega živčevja. Delimo jih na mikroglijo in makroglijo.



*Slika 1: Medsebojna lega in povezanost celic v osrednjem živčnem sistemu*

1- oligodendrocit, 2- nevir (akson), 3- telo živčne celice, 4- mielinska ovojnica, 5- mikroglija, 6- astrocit, 7- sinapsa, 8- krvna kapilara. Prirejeno po [1].

Celice mikroglije so mezodermalnega izvora. Udeležene so pri vnetnem odzivu in imajo lastnosti podobne makrofagom v krvi. Celice makroglije so ektodermalnega izvora in jih sestavljajo oligodendrociti in astrociti. Oligodendrociti z mielinsko ovojnico obdajajo živčna vlakna in so analogi Schwannovih celic, ki ovijajo aksone nevronov perifernega živčevja. Astrociti predstavljajo najštevilnejše celice glije [2].



*Slika 2: Primarna kultura astrocitov iz možganske skorje novorojene podgane*

Celice so obarvane s protitelesom proti glialni kisli fibrilarni beljakovini (angl. *glial fibrillary acidic protein* – *GFAP*), intermediarnemu filamentu, ki je značilen označevalec astrocitov *in vitro* in *in vivo* [3]. Slika je bila posneta na Inštitutu za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Ljubljana, Slovenija [4].

## **2. Funkcije astrocitov**

Delovanje nevroglije je prvi opisal Rudolf Virchow leta 1858 in sicer kot »substancia..., ki leži med ustreznimi deli živčevja, jih drži skupaj in daje tej celoti v večji oziroma manjši meri tudi obliko« [5]. Astrociti so neenakomerne, zvezdaste oblike z dolgimi izrastki, ki se stikajo z nevroni, kapilarami ali možgansko ovojnico *pia mater* [6]. Dolgo je veljalo prepričanje, da nudijo zgolj podporo živčnim celicam. V zadnjem času vedenje o njihovih funkcijah narašča.

### **2.1. Astrociti oskrbujejo živčne celice s hranili**

Zaradi svoje lege med kapilaro in živčno celico lahko privzemajo glukozo iz krvi, jo presnovijo in oskrbujejo živčne celice z laktatom, ki je pomemben dopolnilni presnovni vir v primeru pomanjkanja kisika ali glukoze [7]. Astrociti imajo tudi veliko večjo zalogo glikogena kot živčne celice (čeprav je ta zaloga v primerjavi z mišičnimi ali jetrnimi celicami skromna) in ga lahko v primeru pomanjkanja glukoze učinkovito uporabijo [8].

### **2.2. Astrociti iz sinapse privzemajo glutamat**

Odrasli astrociti podgane in človeka izražajo več različnih prenašalcev za glutamat ter druge prenašalce za neurotransmitorje in imajo ključno vlogo v glutamatnem sistemu v možganih [9]. Glutamat je v povišanih koncentracijah (ekscitotoksičen) za živčne celice, za astrocite pa precej manj. V nadaljevanju bomo to funkcijo astrocitov podrobneje razložili na primeru tridelne sinapse.

### **2.3. Zaščita živčnih celic pred radikali**

Astrociti živčne celice oskrbujejo z antioksidantom glutationom (GSH) oziroma z gradniki za njegovo sintezo v živčni celici [10].

### **2.4. Ohranjanje homeostaze ionov v zunajceličnem prostoru**

Za transmembranski gradient  $\text{Na}^+$  in  $\text{K}^+$  ionov tako v živčnih celicah kot astrocitih skrbi encim  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza (NKA), ki ohranja stalne koncentracije teh dveh ionov zunaj in znotraj celice ter ustvarja elektrokemijski potencial, ki je potreben za številne transmembranske procese. Okvirne fiziološke vrednosti so za  $\text{Na}^+$  ione:  $[\text{Na}^+]_i = 20 \text{ mM}$  in

$[Na^+]_o = 140 \text{ mM}$  ter za kalijeve ione:  $[K^+]_i = 130 \text{ mM}$  in  $[K^+]_o = 5 \text{ mM}$  [2]. Astroцитi preko prenašalnih proteinov za  $K^+$  in  $Cl^-$  ione ter kanalov za  $K^+$  in  $Cl^-$  ione privzemajo prebitok zunajceličnih  $K^+$  ionov, ki nastane po prenosu živčnega signala in po njem [6].

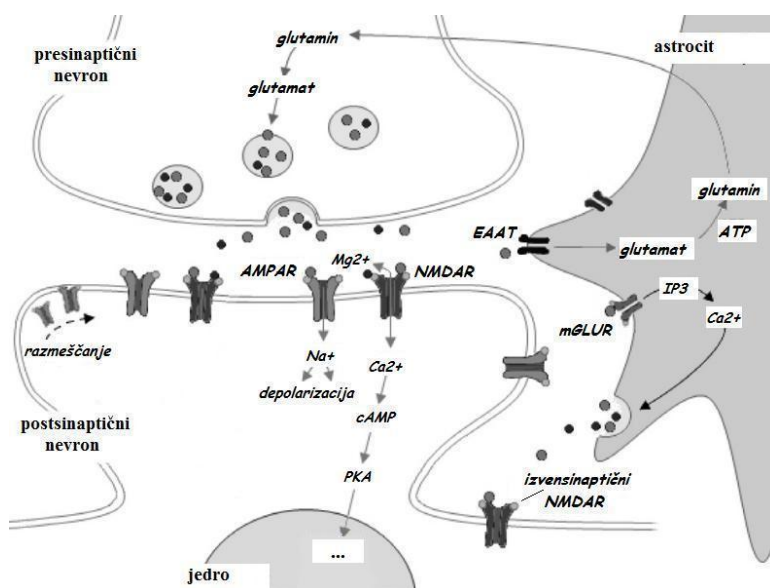
### 2.5. Regulacija mikrocirkulacije v možganih

Astroцитi kontrolirajo lokalni pretok krvi v predelih možganov v skladu z aktivnostjo živčnih celic, kar zaznavajo s privzemom glutamata, ki v astroцитih izzove oscilacije v znotrajcelični koncentraciji  $Ca^{2+}$  ionov [5]. Pomagajo tudi vzdrževati krvno-možgansko pregrado [11].

Novejša spoznanja kažejo, da so tudi astroцитi vzdražne celice. Ta fenomen je pri astroцитih izražen drugače kot pri živčnih celicah, kjer pride do depolarizacije vzdolž celične membrane. Pri astroцитih vzdražnost temelji na mobilizaciji  $Ca^{2+}$  ionov, ki se nahajajo v endoplazemskem retikulumu zaradi česar se poveča citosolna koncentracija  $Ca^{2+}$  ionov, kar deluje kot celični signal. Oscilacije znotrajcelične koncentracije  $Ca^{2+}$  ionov so lahko intrinzične ali pa jih sproži sproščanje živčnih prenašalcev v sinapso [12].

### 3. Tridelna sinapsa

Tridelno sinapso sestavljajo presinaptična in postsinaptična živčna celica ter perisinaptični astroцит. Spodnja slika s pripadajočim besedilom razlaga delovanje tridelne sinapse na primeru živčnega prenašalca glutamata, ki je najboljše raziskan model za njeno delovanje.



Slika 3: Glutamat in delovanje tridelne sinapse

Prenos akcijskega potenciala po presinaptični živčni celici povzroči sproščanje glutamata, ki se veže na različne glutamatne receptorje na postsinaptičnih živčnih celicah in astrocitih. Aktivacija receptorjev AMPA (AMPA) depolarizira postsinaptično živčno celico, kar povzroči aktivacijo napetostno odvisnih receptorjev NMDA (NMDAR). Pride do vnosa  $\text{Ca}^{2+}$  ionov, kar aktivira številne nevroplastične kaskade. Glutamat se iz sinapse privzame v astrocite preko prenašalca za glutamat (EAAT). V astrocitu se pretvori do glutamina, ki ga po sprostitvi v sinapso privzamejo presinaptične živčne celice in uporabijo za sintezo glutamata. Glutamat se na astrocitih veže tudi na metabotropne glutamatne receptorje (mGLUR), ki so sklopljeni s proteini G. Po vezavi pride do spremembe v znotrajcelični koncentraciji  $\text{Ca}^{2+}$ , kar deluje kot celični signal. (*ATP-adenozin-5'-trifosfat, IP3-inozitol 1,4,5-trifosfat*). Prirejeno po [13].

## **4. Inaktivacija živčnih prenašalcev**

### **4.1. Difuzija**

Najenostavnejši način zmanjšanja koncentracije živčnega prenašalca v sinapsi je difuzija iz sinapse po disociaciji z receptorja.

### **4.2. Encimska razgradnja**

Encimska razgradnja živčnih prenašalcev lahko poteka v sinapsi ali po ponovnem privzemu v presinaptično živčno celico ali v celico glije. V holinergičnih sinapsah je prisoten encim acetilholin-esteraza, ki razgradi živčni prenašalec acetilholin (ACh) do holina in acetatnega aniona. Holin se nato preko prenašalca privzame v presinaptično živčno celico in porabi za ponovno sintezo ACh. V adrenergičnem sistemu poteka znotrajcelična razgradnja noradrenalina z encimoma monoamin-oksido (MAO) in katehol-O-metil-transferazo (COMT) [14].

### **4.3. Privzem v presinaptično živčno celico**

Privzem biogenih aminov v presinaptično živčno celico poteka predvsem preko viskoafinitetnih membranskih prenašalcev za monoamine, ki so odvisni od gradientov  $\text{Na}^+$  in  $\text{Cl}^-$  ionov. Mednje prištevamo prenašalec za dopamin (DAT), prenašalec za 5-hidroksitriptamin (SERT) in prenašalec za noradrenalin (NET). Med njimi obstaja velika podobnost v primarnem zaporedju aminokislin in vse uvrščamo v družino prenašalcev SLC6 (angl. *solute carrier 6*). Prenos preko teh prenašalcev označujemo kot *privzem<sub>1</sub>* [3]. Tudi histamin spada med biogene amine. Kljub temu da se podobno kot ostali monoamini v sinaptični mešiček prenaša z vezikularnim monoaminskim prenašalcem (VMAT2), pa specifični prenašalec za privzem histamina preko celične membrane še ni odkrit.

Poleg *privzema*<sub>1</sub> pa obstajajo tudi nizkoafinitetni, visokokapacitetni prenašalci, neodvisni od gradientov Na<sup>+</sup> in Cl<sup>-</sup> ionov. S skupnim imenom jih imenujemo *privzem*<sub>2</sub> in izkazujejo drugačen farmakološki profil kot *privzem*<sub>1</sub> [3]. Privzem preko nizkoafinitetnih prenašalcev (*privzem*<sub>2</sub>) poganja koncentracijski gradient topljenca, ki se vzpostavi preko membrane zaradi različnih koncentracij topljenca v zunaj- in znotrajcelični tekočini.

#### 4.4. Privzem v celice glije

Živčni prenašalci se tudi v celice glije privzemajo s *privzemo*<sub>1</sub>, *privzemo*<sub>2</sub> ali kombinacijo obeh. Primer je glutamat, ki se v astrocite privzema s *privzemo*<sub>1</sub> in *privzemo*<sub>2</sub> [13], medtem ko so za histamin poznani zgolj prenašalci tipa *privzem*<sub>2</sub>.

### 5. Oblika prenosa preko membranskih prenašalcev

Kot smo omenili že v predhodnem besedilu, lahko prenos nevrottransmitorjev preko membranskih prenašalcev razdelimo v dve skupini.

V skupino *privzem*<sub>1</sub> štejemo visokoafinitetne prenašalce, za katere je značilen kotransport Na<sup>+</sup> ionov in nevrottransmitorjev. Natančneje poteka privzem po naslednjem mehanizmu:

- privzem nevrottransmitorjev ob kotransportu Na<sup>+</sup> in Cl<sup>-</sup> ionov (primer so prenašalci za GABA, noradrenalin/adrenalin, dopamin, serotonin, prolin, glicin, holin, betain, taurin (družina prenašalcev SLC6))
- privzem nevrottransmitorjev ob kotransportu Na<sup>+</sup> in antiportu K<sup>+</sup>, neodvisno od Cl<sup>-</sup> ionov (primer je prenos ekscitatornih aminokislinskih živčnih prenašalcev glutamata (SLC1) in aspartata)

Druga skupina je prenos preko nizkoafinitetnih prenašalcev (*privzem*<sub>2</sub>). Primer prenašalcev je skupina prenašalcev za organske katione/anione/zwitterione, katerih transport je neodvisen od Na<sup>+</sup> ionov. Sem spadajo prenašalci iz družine SLC22 (OCT1 (SLC22A1), OCT2 (SLC22A2) in OCT3 (SLC22A3)) in membranski prenašalec za monoamine PMAT (poimenovan tudi SLC29A4 in ENT4).

### 6. Vloga astrocitov pri privzemu histamina

Astrociti imajo ključno vlogo pri privzemu histamina iz sinapse in njegovi inaktivaciji v možganih odrasle podgane [15]. Predhodne raziskave našega laboratorija predvidevajo, da za privzem histamina v astrocite iz možganske skorje novorojene podgane obstajata vsaj

dva različna prenašalna mehanizma. Prvi predstavlja prenos preko visokoafinitetnega, nizkokapacitetnega, energijsko in temperaturno odvisnega prenašalca, ki ga zavira prisotnost inhibitorja NKA ouabaina, drugi pa prenos preko nizkoafinitetnega in visokokapacitetnega prenašalca, ki bi lahko pripadal prenašalcu iz družine prenašalcev za organske katione (angl. *organic cation transporter–OCT*) [16]. Astrociti izražajo monoaminske prenašalce tipa *privzem<sub>1</sub>* [17], ki imajo kvečjemu zelo nizko afiniteto do privzema histamina.

Kandidata za *privzem<sub>2</sub>* sta predvsem OCT2 (SLC22A2) in OCT3 (SLC22A3) iz skupine prenašalcev OCT. Kljub temu verjetno obstajajo tudi drugi prenašalci za histamin, saj novejša raziskave kažejo, da se privzem histamina v astrocitih odrasle podgane v prisotnosti kortikosterona in decinija-22, ki zavirata delovanje OCT, ne zmanjša [15]. Poleg tega inhibitorja OCT kortikosteron in decinij-22 nimata vpliva na privzem histamina v astrocite iz striatuma in malih možganov, čeprav so OCT prenašalci na teh celicah izraženi, privzem histamina pa ne kaže odvisnosti od Na<sup>+</sup> ionov [18].

Kandidat za *privzem<sub>2</sub>* histamina v astrocite ostaja membranski prenašalec za monoamine PMAT (SLC29A4), ki poleg drugih biogenih aminov lahko prenaša tudi histamin [19]. PMAT je transmembranska beljakovina, ki jo najdemo v osrednjem živčnem sistemu, prisotna pa je tudi v drugih tkivih. Sestavlja jo zaporedje 530 aminokislin z 10-12 transmembranskimi segmenti. Prenos preko PMAT je odvisen od membranskega potenciala, ni pa odvisen od Na<sup>+</sup> in Cl<sup>-</sup> ionov [20]. Poskusi z metodo dvojne fluorescenčne histokemije v rezinah možganskega tkiva podgan dokazujejo prisotnost PMAT samo v živčnih celicah, medtem ko v astrocitih PMAT ni izražen [3]. V kulturi človeških astrocitov je prisotnost OCT3 in PMAT prenašalcev dokazana. Preko njiju se histamin v astrocite privzema preko nizkoafinitetnega, časovno odvisnega transporta, ki je neodvisen od Na<sup>+</sup> in Cl<sup>-</sup> ionov [21].

## **7. Histamin**

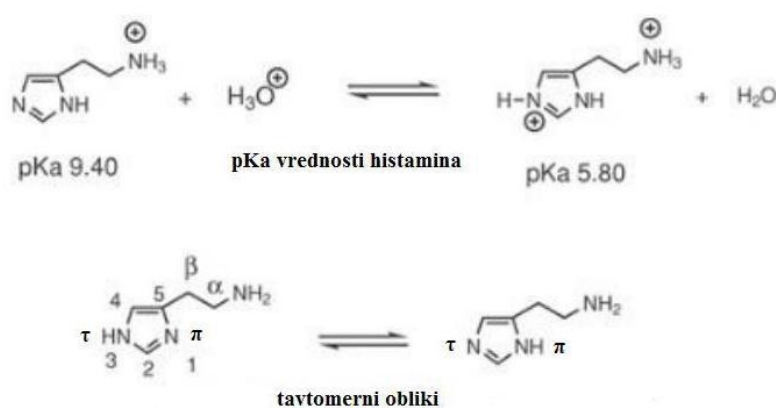
Histamin uvrščamo med biogene amine. Sintetizira in nahaja se v številnih celicah kot so bazofilci, enterokromafinim celicam podobne celice želodca ter živčne celice osrednjega in perifernega živčnega sistema. Ob sprostitvi izzove učinke, ki so večinoma lokalni, saj



deluje kot avtakoid ali parakrini mediator [22]. V diplomskem delu se bomo osredotočili na vlogo histamina v osrednjem živčnem sistemu, kjer deluje kot živčni prenašalec.

### 7.1. Kemijske lastnosti

Histamin ima dva bazična centra. To sta primarni alifatski amin s  $pK_a$  9,40 in imidazol s  $pK_a$  5,80. Pri fiziološkem pH se histamin nahaja v ravnotežni zmesi tautomernih kationov. Monokation predstavlja več kot 96 % celotne zmesi, dikation 3 %, preostali majhen delež pa je nenabita molekula. Pri pH vrednostih, nižjih od fiziološke, je delež dikationa višji [22].

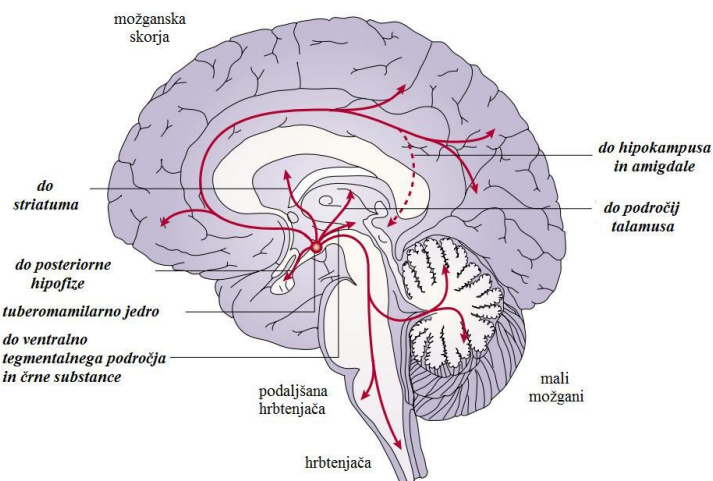


Slika 4: Tautomerne oblike histamina

Tautomerne oblike histamina, ki se vzpostavita na imidazolovem obroču, se imenujeta  $\tau$  in  $\pi$ . Razmerje med njima je v vodnih raztopinah približno 4 : 1 v korist  $N\tau$ -H tautomera. Prirejeno po [22].

### 7.2. Histamin v osrednjem živčnem sistemu

Histamin v osrednjem živčnem sistemu deluje kot neurotransmitor. Jedra histaminskih nevronov se nahajajo v tuberomamilarnem jedru posteriornega hipotalamusa in projicirajo v celotno možgansko skorjo, talamus, bazalne ganglije, amigdalo [23] ter v podaljšano hrbtenjačo in mrežnico [24]. Histaminski nevroni vsebujejo tudi druge živčne prenašalce in modulatorje ter encime GABA-sintetazo, glutaminska-kislina-dekarboksilazo (GAD) in živčni prenašalec  $\gamma$ -aminomasleno kislino (GABA) [24].



*Slika 5: Projekcije histaminskih nevronov*

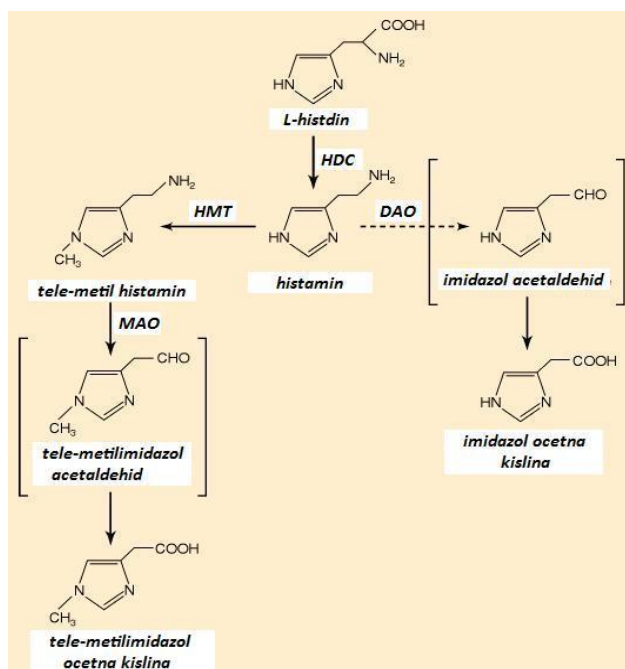
Prirejeno po [24].

Svoje učinke v osrednjem živčnem sistemu histamin posreduje preko vezave na 3 tipe histaminskih receptorjev:  $H_1$ ,  $H_2$  in  $H_3$ . Celice glije izražajo receptorje  $H_1$  in  $H_2$  [25]. Vsi spadajo v družino receptorjev, ki so sklopljeni s proteini G. V osrednjem živčnem sistemu receptorji  $H_1$  uravnavajo številne fiziološke funkcije, kot so ohranjanje budnosti, uravnavanje hranjenja, bruhanje, lokomocija, učenje, spomin in čustvovanje. Za receptorje  $H_2$  predvidevajo, da imajo podobno vlogo kot receptorji  $H_1$ . Receptorji  $H_3$  so presinaptični avtoreceptorji na histaminskih nevronih. Nahajajo pa se tudi na adrenergičnih, holinergičnih in serotoninških nevronih, kjer kot heteroreceptorji regulirajo izločanje teh živčnih prenašalcev. Za antagoniste receptorjev  $H_3$  predvidevajo terapevtsko uporabnost pri motnjah spanja [26], kognitivnih motnjah in narkolepsiji [25]. Celice v krvi (eozinofilci, nevtrofilci, limfociti T) in dendritične celice izražajo tudi histaminske receptorje  $H_4$  [22].

### **7.3. Biosinteza in presnova**

Biosinteza histamina v možganih poteka v histaminergičnih nevronih. Histaminergični sistem v možganih je prvi opredelil T. Watanabe leta 1983 z uporabo označenih protiteles proti encimu L-histidin-dekarboksilazi [23]. L-histidin se preko prenašalca za L-aminokislino privzame v živčno celico, kjer ga encim L-histidin-dekarboksilaza pretvori do histamina. Nato se preko vezikularnega monoaminskega prenašalca (VMAT2) privzame v sinaptični mešiček. Po sprostitvi iz vezikla ga encim histamin-N-metiltransferaza (HNMT)

pretvori do neaktivnega metabolita tele-metilhistamina [24]. HNMT se nahaja v citosolu postsinaptičnih živčnih celic in astrocitov [24], vendar se morda lahko v določenih razmerah nahaja tudi v celični membrani in metilira histamin v zunajceličnem prostoru [27]. Čeprav slednja teorija ponuja enostavno rešitev problema presnove histamina, pa ni nedvoumno dokazana. Ker se HNMT pretežno nahaja v znotrajceličnem prostoru, lahko sklepamo, da mora presnovna pot razgradnje histamina vključevati tudi (nepoznani) prenašalec za histamin, saj histamin kot nabita molekula ne more prehajati celične membrane [15].



Slika 7: Reakcije sinteze in metabolizma histamina

HDC- histamin-dekarboksilaza, HMT- histamin-N-metiltransferaza, MAO- monoamin-oksidaža, DAO- diamin-oksidaža. DAO se ne nahaja v osrednjem živčnem sistemu, zato je ta presnovna pot v živčevju ni pomembna. Molekule v oklepajih so predlagani intermediati, ki jih še niso izolirali. Prirejeno po [28].

## 8. $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza (NKA) je encim, ki ga najdemo v plazemski membrani (skoraj) vseh živalskih celic. Deluje kot ionska črpalka, ki z aktivnim transportom črpa  $\text{Na}^+$  in  $\text{K}^+$  ione v nasprotni smeri njenega elektrokemijskega gradienta, pri tem pa uporablja energijo iz ATP. Poleg omenjene funkcije črpalke, ki jo je leta 1957 opredelil J. C. Skou, v zadnjem času postaja za raziskovalce zanimiva predvsem njena funkcija pri celičnem signaliziranju.

NKA vzdržuje transmembranski elektrokemijski potencial, ki je potreben za prenos živčnih dražljajev, krčenje mišic, vzdražnost tkiv in za druge celične procese, ki so odvisni od vzpostavljenih gradientov [29]. Elektrokemijski gradient  $\text{Na}^+$  ionov je usmerjen proti celični notranjosti, saj poteka od višje koncentracije  $\text{Na}^+$  ionov v zunajceličnem prostoru proti nižji koncentraciji  $\text{Na}^+$  ionov v celični notranjosti. NKA je pomemben tudi pri uravnavanju celične prostornine [30]. V celicah glije pa je koncentracijski gradient omenjenih ionov pomemben za privzem živčnih prenašalcev, predvsem glutamata [31]. Transporterji za glutamat (GLT1, GLAST) in  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjevalec so sklopljeni z elektrokemijskim gradientom  $\text{Na}^+$  ionov, ki ga vzpostavlja NKA [9].

$$\Delta G = RT \ln(c_2/c_1) + zF\Delta V \text{ [kJ/mol]}$$

*Enačba 1: Izračun proste Gibbsove energije*

R- splošna plinska konstanta [ $8,315 \times 10^{-3} \text{ kJmol}^{-1}$ ], T- temperatura [K], z-število osnovnih električnih nabojev, električna napetost [V], c- koncentracija topljenca [mol/L]. Prirejeno po [32].

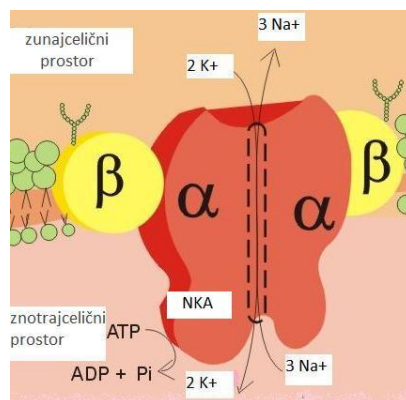
NKA, ki za svoje delovanje porablja ATP, prispeva velik delež k celotnemu celičnemu metabolizmu [29]. Zanimiva je ocena, da se okoli tretjino dnevne proizvodnje ATP porabi ravno za delovanje tega encima [33].

### **8.1. Uvrstitev NKA**

NKA spada med črpalke tipa P. Skupina je dobila takšno poimenovanje, saj katalizirajo reakcije preko reakcijskega mehanizma, ki vključuje tvorbo ključnega intermediata s fosfatno vezjo [33]. Ta intermedat je *fosforilaspartat*, ki nastane, ko fosfatna skupina iz molekule ATP reagira s stransko verigo specifičnega, konzervativno ohranjenega aspartatnega aminokislinskega preostanka [32].

### **8.2. Zgradba NKA**

NKA sestavljata dve podenoti. To sta večja in katalitično aktivna podenota  $\alpha$  ter manjša in glikozilirana podenota  $\beta$ . Na podenoti  $\alpha$  se nahajajo vezavna mesta za ATP, fosforilacijsko mesto in zunajcelično vezavno mesto za kardiotonične glikozide (KG). Funkcija podenote  $\beta$  še ni povsem pojasnjena, najbrž pa ima pomembno vlogo pri umestitvi podenote  $\alpha$  v celično membrano [34].



Slika 6: Shematski prikaz encima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze

Encim se nahaja v plazemski membrani in za črpanje  $\text{Na}^+$  in  $\text{K}^+$  ionov uporablja energijo, ki se sprosti pri hidrolizi ATP. NKA je heterodimer, ki ga sestavljata podenota  $\alpha$  in podenota  $\beta$ . Prirejeno po [35].

Podenoti imata različne izooblike, ki so različno izražene v tkivih ter različno občutljive na inhibicijo s kardiotioničnimi glikozidi. Zaradi tega je s farmakološkega vidika NKA zelo zanimiva tarča.

Preglednica I: Izooblike podenot NKA in njihova izraženost v tkivih različnih živalskih vrst  
Prirejeno po [29].

Izooblika	Izraženost v tkivih	Izooblika	Izraženost v tkivih
$\alpha 1$	Vsa tkiva, glavna izooblika v ledvicah	$\beta 1$	Vsa tkiva
$\alpha 2$	Odraslo srce, gladka mišičnina žil, skeletna mišica, možgani, maščobne celice, hrustančevina, kosti	$\beta 2$	Možgani, hrustančevina, eritrociti, srce
$\alpha 3$	Vzdružna tkiva osrednjega in perifernega živčevja, prevodni sistem srčne mišice	$\beta 3$	Možgani, hrustančevina, eritrociti, pljuča
$\alpha 4$	Testisi	$\alpha 1\beta 1$	Prevladujoča oblika v tkivih

V možganih podgane so prisotne vsaj tri izooblike podenote  $\alpha$ :  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  in  $\alpha 3$  ter dve izoobliki podenote  $\beta$ :  $\beta 1$  in  $\beta 2$ . V astrocitih najdemo dve izoobliki podenote  $\alpha$  ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ) in dve izoobliki podenote  $\beta$  ( $\beta 1$  in  $\beta 2$ ). V astrocitih podgane prevladuje izooblika  $\alpha 1$  [34, 36], z izjemo določenih astrocitnih kultur, ki izražajo izoobliki  $\alpha 1$  in  $\alpha 2$  [37].

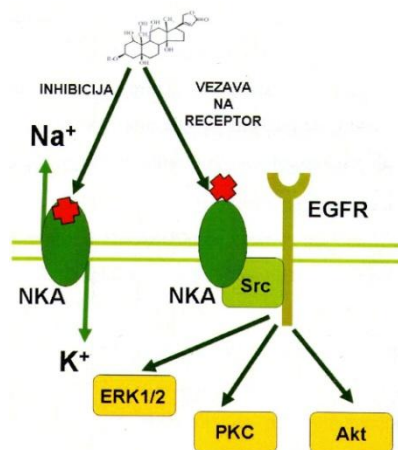
### 8.3. Farmakološki pomen izooblik NKA

Poskusi na celicah prepone podgane kažejo, da 1  $\mu\text{M}$  ouabain inhibira izoobliko  $\alpha 2$ , pri tem pa nima učinka na izoobliko  $\alpha 1$ . Hkrati pa 500  $\mu\text{M}$  ouabain popolnoma inhibira obe

izoobliki [38]. Podganja izooblika  $\alpha 1$  je namreč vsaj 100-krat manj občutljiva na inhibicijo z ouabainom kot izooblika  $\alpha 2$ . Podatki v literaturi kažejo, da je pri podgani  $IC_{50}$  za izoobliko  $\alpha 1$  večji kot 10 000 nM, medtem ko je  $IC_{50}$  za izobliki  $\alpha 2$  in  $\alpha 3$  NKA samo 10-50 nM [39].

#### 8.4. Signalna funkcija NKA

Obstajajo dokazi, da NKA v kardiomiocitih ne samo da deluje kot ionska črpalka, temveč tudi interagira z bližnjimi membranskimi proteini in organiziranimi kaskadami citosolnih signalnih proteinov, preko katerih prenaša sporočila znotrajceličnim organelom. Aktivacija signalnih poti, ki jih povzroči vezava ouabaina na NKA, je neodvisna od sprememb v znotrajceličnih koncentracijah  $Na^+$  in  $K^+$  ionov. Te poti vključujejo aktivacijo kinaze Src, s Src posredovano transaktivacijo receptorja za epidermalni rastni dejavnik (EGFR), aktivacijo signalne beljakovine Ras, aktivacijo z mitogeni aktivirane protein kinaze p44/42 (p44/42 MAPK), poimenovano tudi ERK1/2, ter povečano nastajanje reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) v mitohondrijih [40].



Slika 7: Shematski prikaz delovanja kardi toničnih glikozidov

NKA tvori z nereceptorsko tirozin-kinazo Src funkcionalni receptor za kardi tonične glikozide. Po vezavi liganda pride do aktivacije EGFR in sprožitve kaskade znotrajceličnih signalnih poti. (EGFR- receptor za epidermalni rastni dejavnik, PKC- protein-kinaza C, ERK1/2- z zunajceličnimi signali regulirana kinaza 1/2. Povzeto po [29, 41]. Slika 7 je uporabljena z dovoljenjem [41].

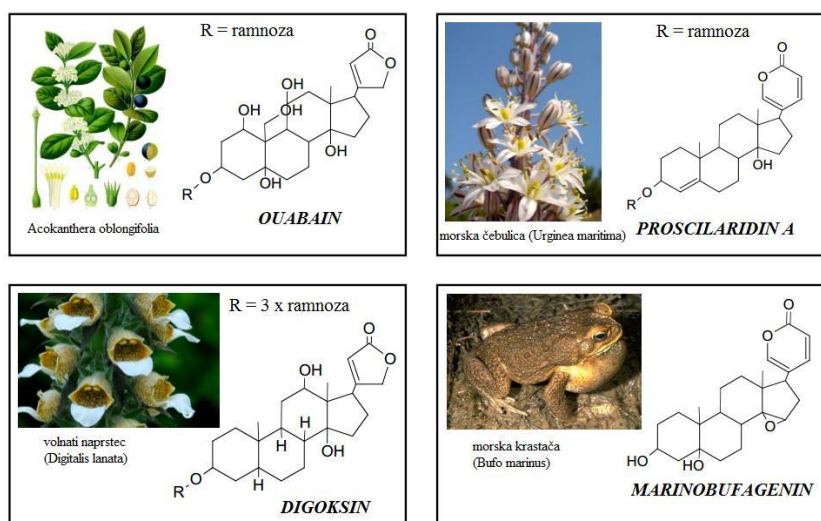
### 9. Kardi tonični glikozidi

Kardi tonične glikozide (KG) že stoletja uporabljamo za zdravljenje srčnega popuščanja, v današnjem času pa predvsem pri srčnem popuščanju v kombinaciji s kronično atrijsko fibrilacijo. KG so sekundarni metaboliti, prisotni predvsem v vrstah *Strophantus gratus in*

*Acokanthera oblongifolia* (ouabain), *Digitalis lanata* (digoksin, digitoksin) in *Nerium oleander* (oleandrin). Najdemo pa jih tudi v nekaterih živalskih vrstah, na primer v vrsti krastače *Bufo marinus* (marinobufagenin).

### 9.1. Endogeni kardi tonični glikozidi

Raziskovalci so izolirali endogene KG tudi iz različnih vrst sesalcev, in sicer ouabain, digoksin, marinobufagenin in proscilaridin A. Ouabain v človeškem telesu deluje kot hormon. Nastaja v skorji nadledvične žleze in v hipotalamusu ter ima številne, vendar še ne v celoti pojasnjene funkcije v telesu. Udeležen je pri stanjih, kot so kronično ledvično popuščanje, neravnovesje v bilanci  $\text{Na}^+$  ionov, kongestivno srčno popuščanje in preeklampsija. Pomemben je vpliv endogenih KG na delovanje NKA v kardiomiocitih in ledvičnih tubulih, saj lahko z inhibicijo NKA vplivajo na transmembranski elektrokemijski potencial, ki je pomemben za transport različnih ionov preko celične membrane. Pomemben endogeni KG je tudi marinobufagenin, ki ima večjo afiniteto do izooblike  $\alpha_1$ , ki je neobčutljiva na ouabain [42].



Slika 8: Kardi tonični glikozidi

Strukturne formule endogenih kardi toničnih glikozidov: kardenolidov (ouabain, digoksin) in bufadienolidov (proscilaridin A, marinobufagenin) s pripadajočimi organizmi, iz katerih so bili izolirani. Prirejeno po [29].

### 9.2. Razdelitev in struktura

Osnovno strukturo kardi toničnih glikozidov predstavlja steroidni skelet, ki predstavlja farmakoforno jedro. To jedro je substituirano na dveh mestih, in sicer na mestu 17 z

laktonskim obročem in na mestu 3 s sladkorno skupino. Glede na vrsto vezanega laktonskega obroča razdelimo kardiotionične glikozide v dve skupini. Med kardenolide prištevamo tiste z vezanim nenasičenim petčlenskim butirolaktonskim obročem (npr. ouabain, digoksin, digitoksin), med bufadienolide pa tiste z vezanim nenasičenim šestčlenskim pironskim obročem (npr. marinobufagenin). Za kardiotionične glikozide je značilna *trans* konformacija obročev A/B in C/D za razliko od spolnih hormonov, mineralokortikoidov in glukokortikoidov, kjer gre za *cis* konformacijo. Na mestu 3 so pripete različne sladkorne molekule. Njihova zamenjava vpliva predvsem na farmakokinetične lastnosti. Molekula se v obliki aglikona praviloma hitreje absorbira in metabolizira [43].

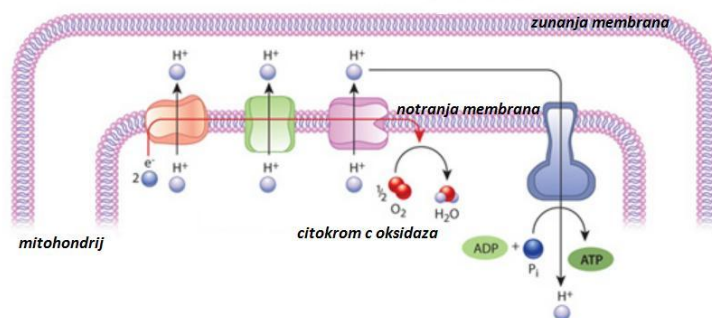
## 10. Natrijev fluorid

Fluoridni ioni (F<sup>-</sup>) zavirajo predvsem delovanje encimov, ki so udeleženi v procesu glikolize in ciklu trikarboksilnih kislin, zato najbolj prizadenejo celice, ki so metabolično aktivnejše [44]. Ob hkratni prisotnosti Mg<sup>2+</sup> in fosfatnih ionov so znani inhibitorji encima enolaze (fosfopiruvat-hidrataza), ki v procesu glikolize katalizira reakcijo pretvorbe 2-fosfoglicerata do fosfoenolpiruvata [45]. Fluoridni ioni zavirajo tudi kompleks piruvat dehidrogenazo [46]. Na ta način je prekinjen proces glikolize in vstopanje piruvata v cikel trikarboksilnih kislin.

## 11. Natrijev azid in kalijev cianid

Azidni (N<sub>3</sub><sup>-</sup>) in cianidni (CN<sup>-</sup>) ioni so zaviralci celičnega dihanja. Celično dihanje je zapleten, večstopenjski proces. Azidni in cianidni ioni prekinejo oksidativno fosforilacijo, ki poteka v mitohondriju. Interagirajo z Fe<sup>3+</sup> ionom v prostetični skupini (hem a<sub>3</sub>) kompleksnega encima citokrom-c-oksidge, kar zavira delovanje tega encima. Ogljikov (mono)oksid (CO), ki je prav tako zaviralec citokrom-c-oksidge, za razliko od azidnih in cianidnih ionov inhibira hem v reducirani obliki Fe<sup>2+</sup>. Inhibicija verige za prenos elektronov ustavi sintezo ATP, saj se ustavi transmembranski tok protonov (H<sup>+</sup>), ki ta proces prvotno tudi poganja [32]. Z inkubacijo celične kulture z azidnimi ali cianidnimi ioni kemično simuliramo hipoksične pogoje.





Slika 9: Shematski prikaz dihalne verige

Cianidni in azidni ioni zavirajo citokrom-c-oksidozo. (ADP- adenzin-5'-difosfat, Pi- anorganski fosfat). Prirejeno po [47].

## 12. Hipoksija

Hipoksija je opredeljena kot pomanjkanje kisika ( $O_2$ ) v tkivih glede na potrebe oksidativnega metabolizma [48]. Patološki pogoji, ki zmanjšajo ali zavrejo proizvodnjo energije v celici, kot so hipoglikemija ali hipoksija, vodijo do porušanja transmembranskih ionskih gradientov [46]. Astroцитi so manj občutljivi na hipoglikemična in hipoksična stanja kot nevroni [49], saj imajo večje zaloge glikogena, prav tako pa astroцитi pripomorejo k daljšemu času preživetja nevronov v primeru metaboličnih insultov [50].

*Preglednica II: Učinki različnih posegov v celični metabolizem na  $[Na^+]_i$  v kulturi astroцитov iz hrbtnjače podgane.*

Prirejeno po [8].

Sestava medija	$[Na^+]_i$
Medij brez glukoze	Rahlo zvišan
Medij brez glukoze + 2-deoksiglukoza	Rahlo zvišan
Medij brez glukoze + 10 mM NaF	Zvišan
Medij brez glukoze + 10 mM $NaN_3$	Zvišan
2 mM ouabain	Zvišan
Medij z zvišano $[K^+]$	Zvišan

Zvišan  $[Na^+]_i$  je merilo za padec transmembranskega gradienta  $Na^+$  in/ali za nezadostno delovanje NKA. V primerih iz tabele je bila sprememba  $[Na^+]_i$  v večini primerov reverzibilna. V astroцитih iz možganske skorje podgan so spremembe  $[Na^+]_i$  lahko tudi do 4,5-krat večje kot v kulturi astroцитov iz hrbtnjače podgane [8].

## NAMEN DELA

Celično presnovo sestavljajo zapleteni procesi, ki so medsebojno prepleteni, sklopljeni in soodvisni. V diplomskem delu bomo normalno celično presnovo zavirali na različnih stopnjah in opazovali, kako se to odrazi na privzemu histamina v astrocite iz možganske skorje novorojene podgane.

Celično energijsko presnovo bomo prekinili tako, da bomo s fluoridnimi ioni zavirali proces glikolize ter s cianidnimi ali azidnimi ioni encime v dihalni verigi. Tako bomo kemično ustvarili hipoksične pogoje in v celicah preprečili nastanek ATP, ki je potreben za delovanje NKA in s tem za vzdrževanje transmembranskih ionskih gradientov in delovanje prenašalcev za različne nevrottransmitorje. Z namenom simulacije možganske kapi bomo celice postavili v hipoksično komoro in jim hkrati odtegnili hranila (glukozo) ter preverili, kako se to odrazi na privzemu histamina.

Na delovanje NKA bomo vplivali tudi neposredno, tako da bomo astrocite inkubirali z različnimi koncentracijami kardiotioničnih glikozidov (KG). Za zaviranje funkcije črpalke bomo uporabili KG v inhibitornih koncentracijah, za morebiten vpliv signalne funkcije NKA pa KG v nižjih koncentracijah, kot so potrebne za inhibicijo črpalne funkcije NKA.

Raziskali bomo še vpliv zunajcelične koncentracije  $\text{Na}^+$  in  $\text{K}^+$  ionov. S tem bomo ocenili, ali se histamin v celice privzema s specifičnim prenašalcem (*privzem<sub>1</sub>*), nespecifičnim prenašalcem (*privzem<sub>2</sub>*) ali kombinacijo obeh.

S prenosom western bomo v kulturah astrocitov poskusili dokazati prisotnost membranskega prenašalca za monoamine (PMAT, SLC29A4), ki je kandidat za privzem histamina v astrocite, in aktivacijo znotrajcelične signalne poti ERK1/2.

V diplomskem delu bomo preverili naslednje hipoteze:

Inhibicija procesa glikolize z NaF in encimov dihalne verige z  $\text{NaN}_3$  in KCN vodi do zmanjšanega nastajanja molekul ATP.

1. Privzem histamina je odvisen od nastajanja ATP v celicah. V razmerah zmanjšanega nastajanja ATP se bo privzem histamina zmanjšal.

Z inhibicijo NKA porušimo transmembranski elektrokemijski potencial, ki poganja številne transmembranske procese, tudi privzem histamina.

2. Ouabain in drugi KG bodo zavirali delovanje  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze in zmanjšali privzem histamina.

Ouabain v nizkih koncentracijah ne zavira NKA, vendar aktivira številne znotrajcelične signalne poti.

3. Ouabain bo v koncentracijah, ki aktivirajo celične signalne poti vplival na privzem histamina v celično kulturo astrocitov.

Hipoksija okrne in spremeni normalen celični metabolizem. Čeprav imajo celice mehanizme za preživetje v kratkotrajnih hipoksičnih pogojih, hipoksija v končni fazi vodi do porušanja transmembranskih elektrokemijskih gradientov in propada celice.

4. Privzem histamina se bo po izpostavljenosti astrocitov hipoksiji in odtegnitvi glukoze zmanjšal.

Histamin je pri fizioloških pogojih nabita molekula, zato mora za prehod celične membrane uporabiti prenašalec.

5. Privzem histamina je odvisen od zunajcelične koncentracije  $\text{Na}^+$  in  $\text{K}^+$  ionov.
6. Kulture astrocitov novorojene podgane izražajo membranski prenašalec za monoamine (PMAT).
7. Ouabain aktivira znotrajcelično signalno pot ERK1/2.

# MATERIALI IN METODE

## 1. Kemikalije in oprema

Pri delu smo uporabili naslednje kemikalije:

Tripsin-EDTA, 0,05% (Gibco, ZDA), fetalni goveji serum (FBS) (Lonza, Belgija), gentamicin (Gibco, ZDA), L-glutamin (Gibco, ZDA), natrijev 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),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Nemčija),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Sigma, ZDA), glukoza (Merck, Nemčija),  $\text{CaCl}_2$  (Sigma, ZDA), [ $^3\text{H}$ ]-histamin (histaminijev diklorid) s specifično aktivnostjo 10,6 Ci/mmol (New England Nuclear, ZDA), histamin (Sigma, ZDA), NaOH (Alkaloid, Makedonija), ouabain (Serva, Nemčija), digoksin (Merck, Nemčija), digitoksin (Merck, Nemčija),  $\text{NaN}_3$  (Sigma, ZDA), NaF (Sigma, ZDA), KCN (Kemika, Zagreb), scintilacijska tekočina Aquasol (New England Nuclear, ZDA), Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, ZDA), LPS (Sigma-Aldrich, ZDA)

Pri delu smo uporabili naslednje materiale in opremo:

analitska tehtnica (Sartorius), pH meter MA 5735 (Iskra), inkubator (New Brunswick Scientific, Binder), plastične posode za gojenje celic s perforiranim zamaškom (TPP), mikrotitske plošče z 12 razdelki (TPP), mikrotitrne plošče s 96 razdelki (TPP), polavtomatska pipeta (Gilson Inc.), polavtomatska pipeta (Eppendorf), nastavki za pipete (Eppendorf), epruvete in vialne (Eppendorf), laboratorijske igle (TIK d.o.o.), niteks membrana (ZBF), stresalnik Vibromix 10 (Tehtnica<sup>®</sup>), stresalnik Vibromix 314 EVT (Tehtnica<sup>®</sup>), svetlobni mikroskop Nikon eclipse TS100 (Nikon<sup>®</sup>), scintilacijski števec MicroBeta<sup>®</sup> TriLix (PerkinElmer), elektronska pipeta HandyStep<sup>®</sup> (BrandTech<sup>®</sup> scientific, Inc.), zaščitna komora z laminarnim pretokom zraka LFVP 12 (Iskra Pio d.o.o), hladilnik in zamrzovalnik (Gorenje), spektrofotometer (Tecan Group Ltd.)

## 2. Priprava celičnih kultur astrocitov

Primarne celične kulture astrocitov smo pripravili iz možganske skorje novorojenih podgan seva Wistar. Mladiči so bili stari 3 dni, obeh spolov in vzgojeni na Inštitutu za patologijo

Medicinske fakultete v Ljubljani. Pri pripravi celičnih kultur smo uporabili metodo Schwartzove in Wilsonove [51].

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). Dekapitacijo poskusnih živali in pripravo primarnih celičnih kultur je izvedel ustrezno usposobljen laboratorijski tehnik.

Po dekapitaciji smo novorojenim podganam v aseptičnih pogojih iz lobanje odstranili možgane in jih potopili v raztopino Leibovitz L-15 medija z dodatkom 1 mg/mL BSA in 25  $\mu$ M/mL gentamicina. Nato smo odstranili možganske ovojnice in druge dele možganov (striatum, hipokampus, talamus, hipotalamus, hipofizo, možgansko deblo) in izolirali možgansko skorjo. Možgansko tkivo smo v raztopini Leibovitz L-15 mehansko zdrobili in homogenizirali s pomočjo pipet in injekcijskih igel padajočega premera. Homogenizat tkiva smo preko sterilne najlonske mrežice s premerom 75  $\mu$ m prenesli v centrifugo (4min, 1200 obratov/min, sobna temperatura). Po centrifugiranju smo supernatant zavrgli, sediment pa prenesli v gojilne posode, v katere smo dodali medij za gojenje astrocitov.

*Preglednica III: Sestava medija za gojenje astrocitov*

Substanca	Volumen
Medij DMEM z visoko koncentracijo glukoze	50 mL
Fetalni goveji serum	5 mL
Gentamicin	50 $\mu$ L
Piruvat	500 $\mu$ L
L-glutamin	500 $\mu$ L

Medij DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) sestavljajo aminokisljine, soli, glukoza, vitamini, železovi ioni in pH indikator fenol rdeče. Fetalni goveji albumin je proteinski vir in omogoča preživetje celic ter njihovo rast in delitev v kulturi. Gentamicin preprečuje razvoj bakterij, L-glutamin pa je vir dušika in predstavlja skupaj s piruvatom dodaten vir energije.

Celice smo nato gojili v inkubatorju pri 37 °C, v mešanici 95 % zraka in 5 % CO<sub>2</sub>.

Ko so kulture prvič postale konfluentne, smo zamenjali medij in jih ponovno inkubirali pri enakih pogojih (37 °C, mešanica 95 % zraka in 5 % CO<sub>2</sub>). Nato smo kulture 20 ur stresali pri 150 obratih/minuto. Postopek menjave medija in stresanja smo trikrat ponovili, saj smo s tem odstranili celice mikroglije, ki se ne morejo tako učinkovito pritrčiti na gojilno posodo kot astrociti.

V naslednjem koraku smo odlili medij DMEM in dodali raztopino tripsin-EDTA. S tem so se celice odlepili od dna in stene gojilne posode. Inkubirali smo jih 20 minut pri 37 °C, v mešanici 95 % zraka in 5 % CO<sub>2</sub>, nato pa jih prenesli v nove gojilne posode, ki smo jim dodali hranilni medij enake sestave kot je opisana zgoraj. Celice smo inkubirali naslednjih 24 ur in po končani inkubaciji spet zamenjali medij, da smo odstranili tripsin-EDTA.

Po približno tednu dni gojenja so kulture postale drugič konfluentne. Dodali smo jim tripsin-EDTA in jih presadili na gojilne plošče z 12 ločenimi vdolbinami. Gojili smo jih še 3 tedne, med tem pa smo redno spremljali rast celičnih kultur pod mikroskopom. Po treh tednih so bile celične kulture pripravljene za izvajanje zastavljenih poskusov.

Celične kulture, ki so bile izpostavljene hipoksiji in odtegnitvi hranil, smo pripravili po naslednjem postopku: tri tedne starim celicam smo po drugi pasaži odlili DMEM medij in jim dodali DMEM medij brez fetalnega govejega seruma in glukoze. Plošče smo nato postavili v inkubator s 94% N<sub>2</sub>, 0,2% O<sub>2</sub> in 5 % CO<sub>2</sub>. Celice smo pustili v inkubatorju 1h, 3h ali 6h. Nato smo odlili medij brez FBS in glukoze ter dodali medij s FBS in glukozo. Po približno 21 h smo na celicah izvedli poskus.

### 3. Privzem histamina v celične kulture astrocitov

Plošče s celičnimi kulturami astrocitov smo pred poskusom hranili v inkubatorju pri 37 °C. Odlili smo medij DMEM in celične kulture dvakrat sprali s pufrom za privzem brez CaCl<sub>2</sub>. Nato smo dodali pufer za privzem z dodatkom CaCl<sub>2</sub>.

*Preglednica IV: Sestava pufera za privzem histamina*

Substanca	Količina
HEPES	5,958 g
NaCl	7,306 g
KCl	0,358 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,163 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,296 g

glukoza	1,009 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,250 g
bidestilirana voda	dopolnimo do 1000 mL
pH uravnamo z 0,1 N NaOH do pH 7,4	

V pufru za privzem znaša koncentracija Na<sup>+</sup> ionov 125 mM in K<sup>+</sup> ionov 5 mM. V pufru z znižano koncentracijo K<sup>+</sup> ionov smo zamenjali KCl z 0,8744 g manitola za pripravo 1 L pufra. Celokupna vsebnost K<sup>+</sup> ionov znaša 1,2 mM (iz KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). V pufru brez Na<sup>+</sup> ionov smo zamenjali NaCl z 22,772 g manitola za pripravo 1 L pufra. V pufru s povišano koncentracijo K<sup>+</sup> ionov znaša celokupna vsebnost K<sup>+</sup> ionov 50 mM zaradi večje zatehte KCl. Pripravo prikazuje spodnja preglednica.

*Preglednica V: Sestava pufra za privzem z visoko koncentracijo KCl*

Substanca	Količina
HEPES	5,958 g
NaCl	9,327 g
KCl	7,456 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,163 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,296 g
glukoza	1,009 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,250 g
bidestilirana voda	dopolnimo do 1000mL

Pri poskusih, kjer smo preučevali vpliv ouabaina, digoksina, digitoksina smo celice z naštetimi substancami inkubirali 20 min ali 1h (odvisno od poskusa) v inkubatorju v mešanici 95 % zraka in 5 % CO<sub>2</sub> pri 37 °C. Z ouabainom smo poskuse izvajali v temi, saj je občutljiv na svetlobo. Ouabain smo pripravili v koncentraciji 10<sup>-3</sup> M, digoksin in digitoksin pa v koncentraciji 10<sup>-4</sup> M, pri čemer smo kot topilo uporabili DMSO. Vse substance so namreč slabo topne v vodnih medijih. Pri poskusih s KCN, NaN<sub>3</sub>, NaF smo celične kulture s temi substancami inkubirali v enakih razmerah, čas inkubacije je bil 1h. Pri poskusih, kjer smo spremenili elektrolitsko sestavo medija (visoka koncentracija K<sup>+</sup>, medij z znižano koncentracijo K<sup>+</sup> in medij brez Na<sup>+</sup> ionov) je inkubacija trajala 30 min.

Za določanje privzema smo celičnim kulturam dodali še radioaktivno označen [<sup>3</sup>H]-histamin v različnih koncentracijah glede na vrsto poskusa in celice ponovno inkubirali 20 min pri enakih pogojih. Po zaključeni inkubaciji smo reakcijo prekinili tako, da smo plošče

postavili na led in jih štirikrat sprali z mrzlim pufrom za privzem brez  $\text{CaCl}_2$ . Celice smo lizirali s 300  $\mu\text{L}$  0,5 N NaOH in 10-minutnim stresanjem na stresalniku pri 200 obratih/min. Nato smo odvzeli 250  $\mu\text{L}$  lizata, v katerem smo določali količino privzetega [ $^3\text{H}$ ]-histamina, preostanek lizata pa smo uporabili za določanje koncentracije proteinov.

#### 4. Določanje privzetega histamina

Količino v celice privzetega histamina smo določali s tekočinskim scintilacijskim števcem (MicroBeta Trilux, Perkin Elmer, ZDA). Celice smo inkubirali z radioaktivnim [ $^3\text{H}$ ]-histaminom. Ta oddaja  $\beta$ -sevanje, ki ga zazna scintilacijski števec.

Meritve je potekala tako, da smo v Eppendorfove epruvete odpipetirali 250  $\mu\text{L}$  celičnega lizata in mu dodali 1,5 mL univerzalne scintilacijske tekočine Aquasol. Aquasol vsebuje aromatska topila in scintilatorje. Scintilatorji so snovi, ki absorbirajo energijo ionizirajočega sevanja ter jo nato oddajo kot svetlobo. Števec vsebuje dve fotopomnoževalni celici, ki to svetlobo zaznata. Zaznani signal aparat izrazi kot CPM (angl. *count per minute*) oziroma kot število  $\beta$ - razpadov radioaktivnega izotopa na minuto (angl. *disintegration per minute*, DPM). V idealnih pogojih vsakemu  $\beta$ - razpadu sledi svetlobni signal. Detektor upošteva le signale, ki dospejo do obeh fotopomnoževalnih celic, ostali ostanejo prezrti in se upoštevajo kot šum ozadja. Od vrednosti DPM smo odšteli srednjo vrednost DPM slepega vzorca in po spodnjih enačbah izračunali koncentracijo [ $^3\text{H}$ ]-histamina v vzorcu. EFF v *Enačbi 2* označuje učinkovitost štetja. Meritve so potekale pri sobni temperaturi in atmosferskem tlaku.

$$DPM = \frac{CPM}{EFF}$$

*Enačba 2: Število razpadov radioaktivnega izotopa na minuto*

$$c \left( \frac{\text{nmol}}{250 \mu\text{L}} \right) = \frac{DPM}{\text{specifična aktivnost izotopa} \left( \frac{\text{Ci}}{\text{mmol}} \right)}$$

$$1 \text{ Ci} = 2,22 \times 10^{12} \text{ DPM}$$

*Enačba 3: Izračun koncentracije [ $^3\text{H}$ ]-histamina v vzorcu*



## 5. Določanje koncentracije proteinov

Koncentracija proteinov služi kot merilo, koliko celic se nahaja v posameznem razdelku na gojilni plošči. Količino privzetega histamina podajamo v razmerju s koncentracijo proteinov v razdelku, da dobimo medsebojno primerljive rezultate.

Koncentracijo proteinov smo določali z metodo po Bradfordu. Metoda temelji na reakciji barvila Coomassie Brilliant Blue G-250 z ioniziranimi funkcionalnimi skupinami proteinov, pri čemer se spremeni barva barvila iz rdeče v modro, ki ima absorpcijski maksimum pri 595 nm. Za umeritveno krivuljo smo pripravili slep vzorec ter standardne raztopine govejega serumskega albumina (BSA) 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. Na mikrotitrski plošče smo odpipetirali 8 µL celičnega lizata. V vse vdolbinice smo dodali 152 µL bidestilirane vode in 40 µL reagenta BioRad. Nato smo ploščo zaščitili s folijo, premešali in pustili stati 30 min. Nato smo z UV/VIS-spektrofotometrom (Sunrise, Tecan, Avstralija) izmerili absorbanco. S pomočjo umeritvene krivulje smo izračunali koncentracijo proteinov v vzorcu. Meritve so potekale pri sobni temperaturi in atmosferskem tlaku v dveh paralelkah.

## 6. Priprava vzorcev za gelsko elektroforezo in gelska elektroforeza

Po končanem poskusu smo pripravili vzorce za elektroforezo po naslednjem postopku. Celice smo lizirali v 1x Laemmlijevem pufu (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2 % (w/v) SDS, 10 % (w/v) glicerol, 0.002 % (w/v) bromofenol modro, 5 % (v/v) β-merkaptotanol). Tkivne vzorce možganov in ledvic novorojene podgane ter mišice soleus in mišice extensor digitorum longus (EDL) odrasle podgane smo po odvzemu zamrznili v tekočem dušiku, nato pa smo jih narezali na drobne koščke in homogenizirali s steklenimi homogenizatorji v ledenomrzlem litičnem pufu (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 % (v/v) Triton, 10 % (v/v) glicerol, 20 mM Tris pH 7,8, 10 mM NaF, 1 mM EDTA, 0,5mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF, 1 % (v/v) proteazni inhibitor). Lizate smo nato centrifugirali 15 min pri 12.000xg (T = 4 °C). Sediment smo zavrgli, v supernatantu pa smo določili koncentracijo celokupnih beljakovin. Glede na koncentracijo beljakovin v supernatantu smo vzorce ustrezno redčili z dH<sub>2</sub>O do enake končne koncentracije. Nato smo jih raztopili v 4x Laemmlijevem pufu (250 mM Tris, 8 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) glicerol, 0,008 % (w/v) bromfenol modro, pH 6,8) v razmerju 3 : 1. V Laemmlijevem pufu pripravljene vzorce celic ali tkiv smo nato 20 minut inkubirali pri 56 °C ob stalnem

stresanju (500–600/min). Vzorce smo nanegli na poliakrilamidni gel. Za elektroforezo smo uporabili gradientni bis-tris gel (4-12%) z 18 žepki (BioRad®, Hercules, California, ZDA) in MES pufer (BioRad®, Hercules, California, ZDA). V prvi in zadnji žep smo nanegli 2,5 µl oziroma 4,5 µl proteinskega markerja (*Full Range Rainbow Protein Molecular Weight Marker*; GE Healthcare, Uppsala, Švedska), v vmesne žepe pa smo nanegli 30-45 µl vzorcev, pripravljenih v Laemmlijevem pufru. Elektroforeza je potekala 45- 55 min pri 200 V na sobni temperaturi.

## **7. Prenos iz gela na PVDF membrano (prenos western)**

Po končani elektroforezi smo izvedli prenos beljakovin iz gela na polivinilidenfluoridno (PVDF) membrano (Immobilon-P, Millipore®, Billerica, Massachusetts, ZDA). Membrano smo predhodno aktivirali v 100-odstotnem metanolu (30-60 s). Prenos smo izvedli z uporabo sistema Criterion XT (BioRad®, Hercules, California, ZDA). Prenos je ob stalnem hlajenju potekal 75 minut pri 100 V pufru za prenos (tris-glicinski pufer (31 mM Tris, 0,24 M glicin, 10 % (v/v) metanol). Po končanem prenosu smo uspešnost prenosa na PVDF membrano preverili z barvilom Ponceau S, tako da smo membrano 1–5 min inkubirali v raztopini barvila Ponceau v očetni kislini (0,1 % (w/v) Ponceau S v 5 % (v/v) očetni kislini) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, ZDA). Ozadje smo odstranili s spiranjem v 5 % očetni kislini. Membrano smo razbarvali s spiranjem v pufru TBS-T (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,02 % (v/v) Tween-20, pH 7,6).

## **8. Imunodetekcija**

Prenosu na PVDF membrano je sledila enourna inkubacija v 7,5 % (w/v) nemastnem mleku (Posneto mleko v prahu, Pomurske mlekarne, Ljutomer, Slovenija) v TBS-T na stresalniku pri sobni temperaturi (angl. *blocking*). Nato smo membrano inkubirali v raztopini ustreznih primarnih protitelesih čez noč na stresalniku pri 4 °C. Uporabili smo specifična primarna protitelesa: anti-SLC29A4 (ab56554, mišje monoklonsko protitelo), anti-GFAP (kunčje poliklonsko protitelo), pERK1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>). Primarna protitelesa smo pripravili v ustreznih redčitvah v pufru za primarna protitelesa (5 ml TBS 20x, 80 mL dH<sub>2</sub>O, 100 mg NaN<sub>3</sub>, 100 mg BSA, do 100 mL dH<sub>2</sub>O) (Preglednica VI). Membrano smo 30 min spirali v pufru TBS-T in nato 60 min inkubirali v raztopini sekundarnih protiteles (BioRad®, Hercules, California, ZDA) v 5 % (w/v) nemastnem mleku v prahu v TBS-T na stresalniku pri sobni temperaturi. Uporabljena sekundarna protitelesa so bila konjugirana s

hrenovo peroksidazo. Sekundarna protitelesa proti mišjim ali kunčjim protitelesom smo pripravili v redčitvi 1:12.5000 ali 1:25.000 v 5 % (w/v) mleku v prahu v TBS-T.

*Preglednica VI: Uporabljena protitelesa*

Proti beljakovini	Redčitev	Proizvajalec protitelesa
PMAT	1:1000	Abcam®, (ZDA)
GFAP	1:1000	DakoCytomation®, (Danska)
pERK1/2	1:20000	Cell Signaling Technology®, (ZDA)

Specifične beljakovinske pasove smo prikazali z metodo ojačane kemiluminiscence (*enhanced chemiluminescence - ECL*). Uporabili smo kemiluminiscentni reagent proizvajalca Pierce® (Thermo Scientific®, West Palm Beach, Florida, ZDA). Svetlobni signal smo posneli na rentgenski film (Agfa, Zagreb, Hrvaška), ki smo ga razvili na napravi (Curix 60, Agfa HealthCare®, Greenville, South Carolina, ZDA). V nekaterih primerih smo za detekcijo beljakovin uporabili že uporabljeno PVDF membrano. Pred inkubacijo z novim primarnim protitelesom smo najprej odstranili že vezana primarna protitelesa (angl. *stripping*). Membrano smo v ta namen inkubirali v pufru za »stripping« (2 % (w/v) SDS, 0,62 M Tris, pH 6,8) 30 minut na tresalniku pri 37 °C. Nato smo membrano sprali v pufru TBS-T in ponovno blokirali nespecifična vezavna mesta z 7,5 % (w/v) nemastnim mlekom v prahu v TBS-T 1 uro na stresalniku pri sobni temperaturi . Uspešnost odstranitve primarnih protiteles s postopkom »strippinga« smo pred imunodetekcijo nove beljakovine vedno najprej preverili. Membrano smo po »strippingu« ponovno uporabili samo, če je bil po ponovni inkubaciji s sekundarnimi protitelesi ECL signal na membrani v želenem časovnem intervalu povsem odsoten.

## 9. Analiza podatkov

Za obdelavo podatkov in risanje grafov smo uporabili računalniški program GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., ZDA). Rezultati so prikazani kot aritmetična sredina in standardna napaka aritmetične sredine. Pri medsebojni primerjavi skupin podatkov smo uporabili enosmerno ali dvosmerno analizo variance (ANOVA) in Bonferronijev *post hoc*-test. Stopnjo statistično pomembne razlike med vzorci je predstavljala vrednost p, ki smo jo označili: \* za  $p \leq 0,05$  , \*\* za  $p \leq 0,01$ , \*\*\* za  $p \leq 0,001$  in \*\*\*\* za  $p \leq 0,0001$ .

Poskuse smo izvajali v treh, štirih ali šestih ponovitvah. Za primere, ko je bil poskus izveden zgolj v treh ali štirih ponovitvah smo po spodnji formuli izračunali velikost vzorca, ki je potrebna, da zaznamo signifikantno razliko med povprečnima vrednostma privzema pri  $\alpha = 0.05$  (obojeustranski interval) in moči testa 80 % ( $\beta = 0.20$ ). Vrednost smo izračunali pri koncentraciji 7  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-histamina. Pri nižjih koncentracijah namreč glede na izkušnje ne opazimo signifikantnih razlik v privzemu. Dobljeni rezultati potrjujejo, da večje število ponovitev v teh primerih ni bilo potrebno. Število potrebnih ponovitev je pripisano v besedilu pod grafi.

$$N = 2 \cdot SD^2 \cdot (z_\alpha + z_\beta)^2 / \Delta^2$$

*Enačba 4: Izračun velikosti vzorca*

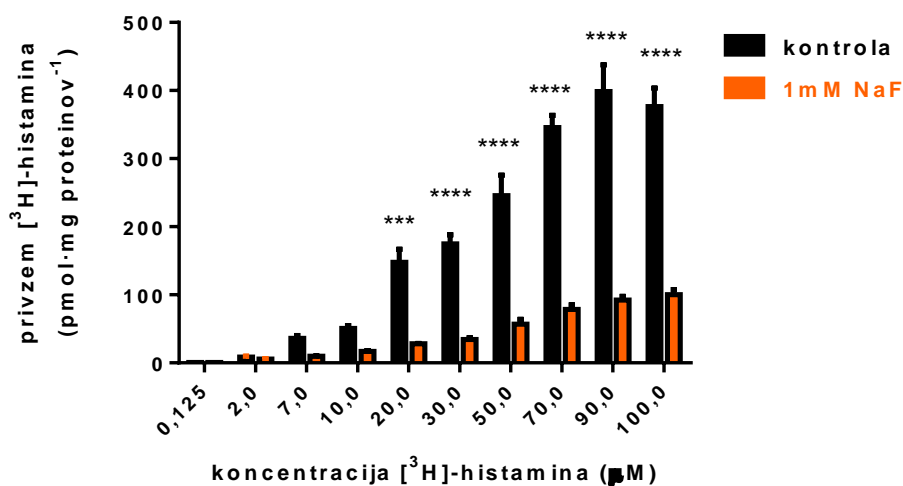
N- število ponovitev, SD- skupni standardni odklon dveh vzorcev,  $(z_\alpha + z_\beta)^2$ - tabelna vrednost, odvisna od izbranih pogojev (v našem primeru 6,2),  $\Delta$ - razlika povprečij dveh vzorcev. Povzeto po [52].

## REZULTATI

V prvem delu predstavljamo rezultate poskusov, kjer smo preučevali vpliv motenj energijske presnove z inhibicijo presnovnih reakcij glikolize ali pa encima citokrom-c-oksidade v dihalni verigi. S tem smo preprečili oziroma zmanjšali nastajanje ATP, ki je nujen za normalno delovanje številnih energijsko odvisnih procesov v celici.

Celično glikolizo smo zavirali z 1 mM NaF. Pri vseh grafih bomo kot reprezentativne vrednosti izpostavili privzem pri uporabljenem [<sup>3</sup>H]-histaminu v koncentracijah 10 μM in 100 μM. Ostale vrednosti so razvidne z grafov.

Za grafe na *Slikah 10, 11 in 12* velja, da so bili astrociti izpostavljeni 60 min 1 mM NaF, 0,1 mM KCN ali 1 mM NaN<sub>3</sub> pri 37° C, nato pa 20 min različnim koncentracijam [<sup>3</sup>H]-histamina pri 37° C.



*Slika 10: Koncentracijska odvisnost privzema [<sup>3</sup>H]-histamina po izpostavitvi 1 mM NaF*

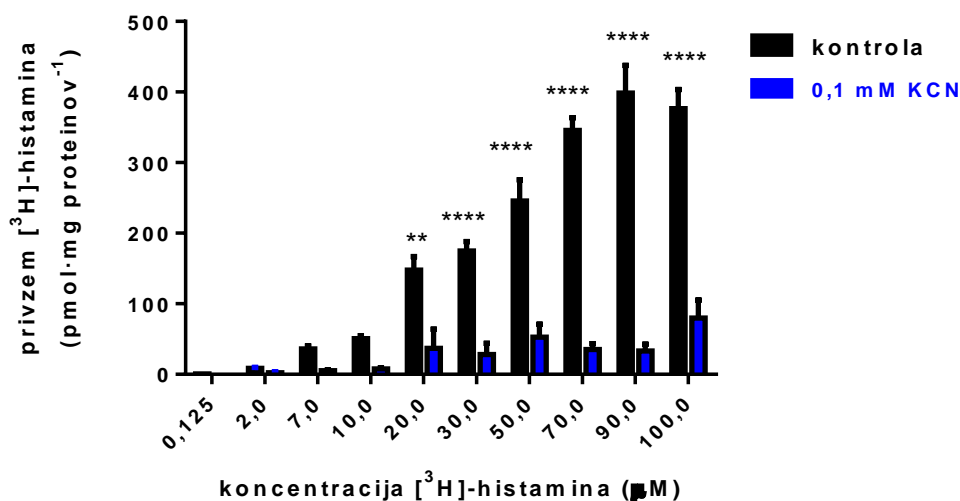
Vsak stolpec predstavlja srednjo vrednost ± standardno napako srednje vrednosti (N=4). Statistično pomembna razlika: \*\*\* za  $p \leq 0,001$  in \*\*\*\* za  $p \leq 0,0001$ , dvosmerna ANOVA in Bonferronijev post hoc- test. Število potrebnih ponovitev: N=3.

Z grafa na *Sliki 10* vidimo, da se je po izpostavitvi 1 mM NaF privzem histamina v celotnem koncentracijskem območju zmanjšal. Vrednosti privzema so znašale pri uporabljenem histaminu v koncentraciji 10 μM za kontrolo  $50,6 \pm 4,4$  pmol·mg protein<sup>-1</sup>, za vzorec  $17,0 \pm 1,1$  pmol·mg protein<sup>-1</sup> ter pri 100 μM histamina za

kontrolo  $376,5 \pm 27,2$  pmol·mg proteinov<sup>-1</sup> in za vzorec  $100,0 \pm 7,7$  pmol·mg proteinov<sup>-1</sup>. Rezultati kažejo, da zaviranje procesa glikolize zmanjša privzem histamina.

### Inhibicija dihalne verige

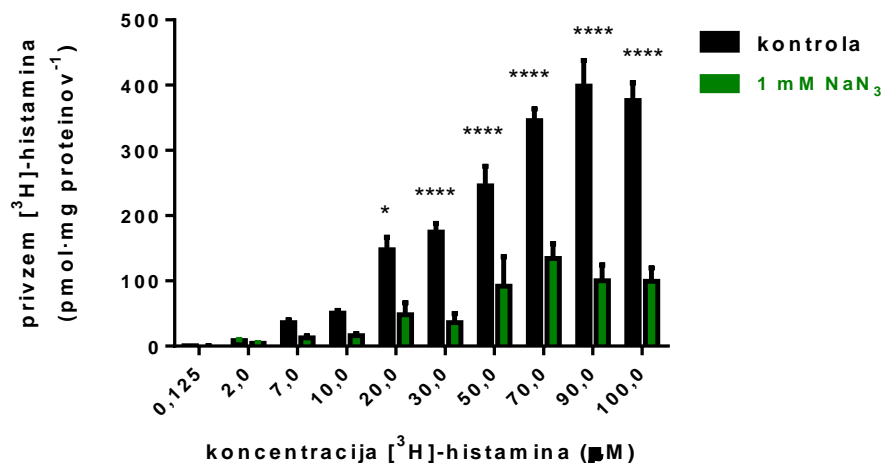
Za inhibicijo dihalne verige smo uporabili 0,1 mM KCN in 1 mM NaN<sub>3</sub>.



Slika 11: Koncentracijska odvisnost privzema [<sup>3</sup>H]-histamina po izpostavitvi 0,1 mM KCN

Vsak stolpec predstavlja srednjo vrednost ± standardno napako srednje vrednosti (N=4). Statistično pomembna razlika: \*\* za  $p \leq 0,01$  in \*\*\*\* za  $p \leq 0,0001$ , dvosmerna ANOVA in Bonferronijev post hoc- test. Število potrebnih ponovitev: N=2.

Z grafa na Sliki 11 vidimo, da se je po izpostavitvi 0, 1 mM KCN privzem histamina v celotnem koncentracijskem območju zmanjšal. Vrednosti privzema so znašale pri uporabljenem histaminu v koncentraciji 10 µM za kontrolo  $50,6 \pm 4,4$  pmol·mg proteinov<sup>-1</sup>, za vzorec  $7,6 \pm 1,4$  pmol·mg proteinov<sup>-1</sup> ter pri 100 µM histamina za kontrolo  $376,5 \pm 27,2$  pmol·mg proteinov<sup>-1</sup> in za vzorec  $79,8 \pm 25,5$  pmol·mg proteinov<sup>-1</sup>. Rezultati kažejo, da inhibicija dihalne verige zmanjša privzem histamina.



Slika 12: Koncentracijska odvisnost privzema [<sup>3</sup>H]-histamina po izpostavitvi 1 mM NaN<sub>3</sub>

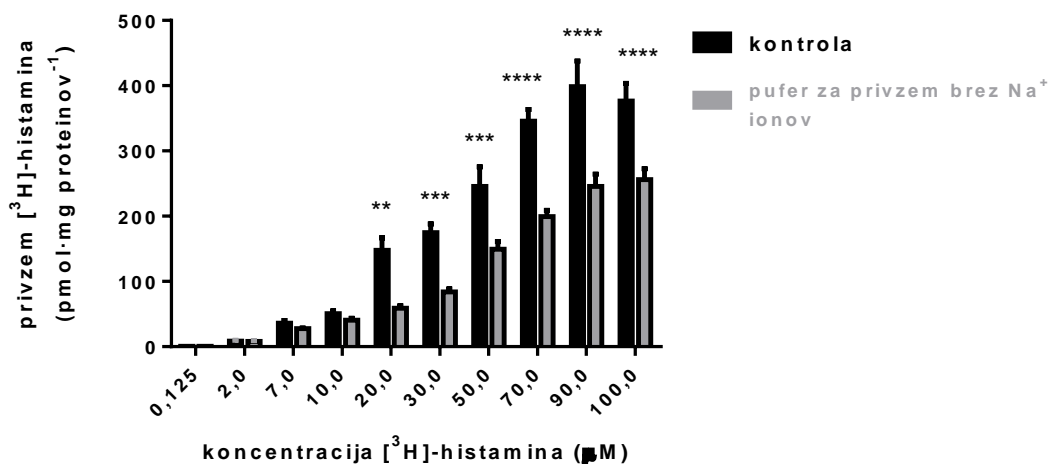
Vsak stolpec predstavlja srednjo vrednost ± standardno napako srednje vrednosti (N=4). Statistično pomembna razlika: \* za  $p \leq 0,05$  in \*\*\*\* za  $p \leq 0,0001$ , dvosmerna ANOVA in Bonferronijev post hoc- test. Število potrebnih ponovitev: N=4.

Vpliv inhibicije dihalne verige smo nato preverili še z NaN<sub>3</sub>. Tudi graf na Sliki 12 kaže zmanjšanje privzema histamina v celotnem koncentracijskem območju, če celice izpostavimo 1 mM NaN<sub>3</sub>. Vrednosti privzema so znašale pri uporabljenem histaminu v koncentraciji 10 µM za kontrolo  $50,6 \pm 4,4$  pmol·mg proteinov<sup>-1</sup>, za vzorec  $16,1 \pm 3,0$  pmol·mg proteinov<sup>-1</sup> ter pri 100 µM histamina za kontrolo  $376,5 \pm 27,2$  pmol·mg proteinov<sup>-1</sup> in za vzorec  $99,5 \pm 20,4$  pmol·mg proteinov<sup>-1</sup>. Rezultati kažejo, da inhibicija dihalne verige zmanjša privzem histamina. Izpostaviti velja, da je za primerljiv učinek zadostovala 10-krat nižja koncentracija KCN kot NaN<sub>3</sub>.

### Vpliv Na<sup>+</sup> in K<sup>+</sup> ionov na privzem histamina

V nadaljevanju našega dela smo preverili, ali je privzem histamina odvisen od koncentracije Na<sup>+</sup> in K<sup>+</sup> ionov v pufru za privzem. Puffer za privzem v *in vitro* razmerah simulira sestavo zunajcelične tekočine. S spremembo njegove sestave lahko raziskujemo vpliv ionov na privzem histamina. Elektrokemijski potencial Na<sup>+</sup> (in Cl<sup>-</sup> ionov) porušimo, če NaCl v mediju zamenjamo z manitolom. Za preverjanje odvisnosti privzema od K<sup>+</sup> ionov smo pripravili medij za privzem s povišano in znižano koncentracijo K<sup>+</sup>. Priprava medija je opisana v poglavju Metode.

Astrociti so bili 60 min izpostavljeni puftru za privzem brez Na<sup>+</sup> ionov pri 37°C in 30 min mediju s znižano in z zvišano koncentracijo K<sup>+</sup> ionov, nato pa 20 min različnim koncentracijam [<sup>3</sup>H]-histamina pri 37°

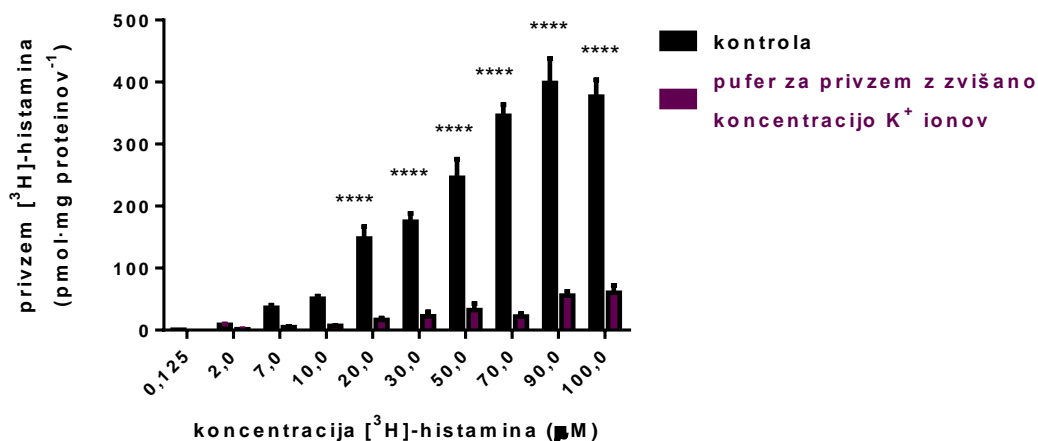


Slika 13: Koncentracijska odvisnost privzema [<sup>3</sup>H]-histamina v pufru za privzem brez Na<sup>+</sup> ionov

Vsak stolpec predstavlja srednjo vrednost ± standardno napako srednje vrednosti (N=6). Statistično pomembna razlika: \*\* za  $p \leq 0,01$ , \*\*\* za  $p \leq 0,001$  in \*\*\*\* za  $p \leq 0,0001$ , dvosmerna ANOVA in Bonferronijev post hoc- test.

Na Sliki 13 vidimo, da je prišlo v pufru za privzem brez Na<sup>+</sup> ionov do zmanjšanja privzema histamina. Pri uporabljenem histaminu v nižjih koncentracijah (0,125 – 10 μM) je bila razlika v privzemu manjša, pri koncentracijah histamina, ki so višje od 20 μM pa se je razlika očitneje izrazila. Vrednosti privzema so znašale pri 10 μM za kontrolo  $50,6 \pm 4,4$  pmol·mg protein<sup>-1</sup>, za vzorec  $40,8 \pm 2,8$  pmol·mg protein<sup>-1</sup> ter pri 100 μM histamina za kontrolo  $376,5 \pm 27,2$  pmol·mg protein<sup>-1</sup> in za vzorec  $256,0 \pm 16,7$  pmol·mg protein<sup>-1</sup>. Rezultati kažejo, da je privzem histamina v astrocite le deloma odvisen od Na<sup>+</sup> ionov. Večji delež privzema histamina pa je kot kaže neodvisen od Na<sup>+</sup> ionov.

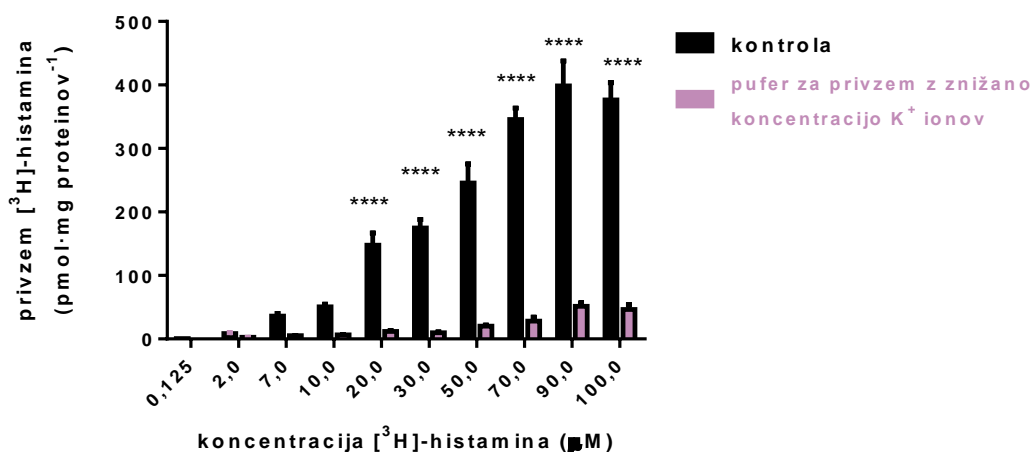




Slika 14: Koncentracijska odvisnost privzema [<sup>3</sup>H]-histamina v pufru za privzem z zvišano koncentracijo K<sup>+</sup> ionov na 50 mM

Vsak stolpec predstavlja srednjo vrednost ± standardno napako srednje vrednosti (N=6). Statistično pomembna razlika: \*\*\*\* za  $p \leq 0,0001$ , dvosmerna ANOVA in Bonferronijev post hoc- test

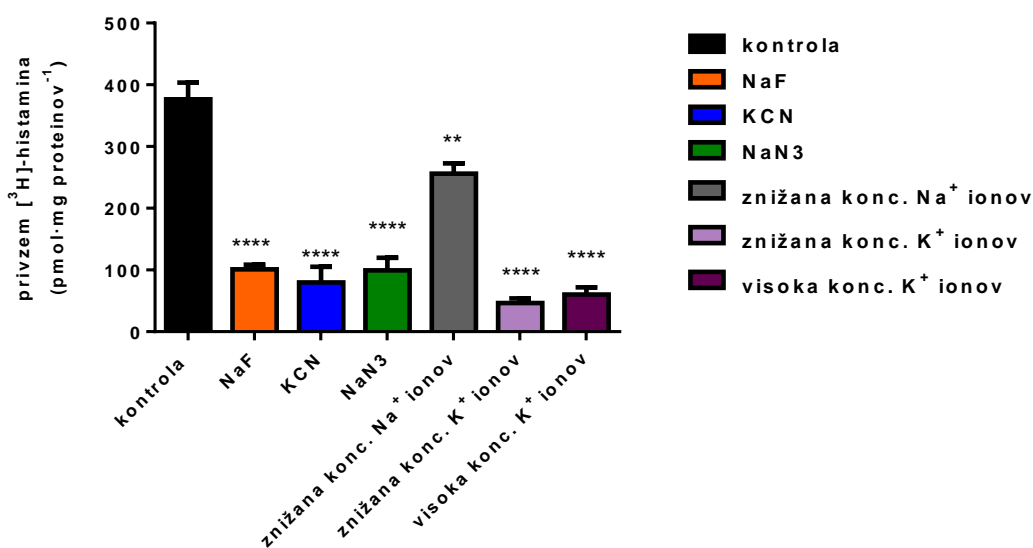
Vrednosti privzema so znašale pri uporabljenem histaminu v koncentraciji 10 μM za kontrolo  $50,6 \pm 4,4$  pmol·mg proteinov<sup>-1</sup>, za vzorec  $6,95 \pm 0,4$  pmol·mg proteinov<sup>-1</sup> ter pri 100 μM histamina za kontrolo  $376,5 \pm 27,2$  pmol·mg proteinov<sup>-1</sup> in za vzorec  $60,2 \pm 11,8$  pmol·mg proteinov<sup>-1</sup>.



Slika 15: Koncentracijska odvisnost privzema [<sup>3</sup>H]-histamina v pufru za privzem z nižano koncentracijo K<sup>+</sup> ionov na 1,2 mM

Vsak stolpec predstavlja srednjo vrednost  $\pm$  standardno napako srednje vrednosti ( $N=6$ ). Statistično pomembna razlika: \*\* za  $p \leq 0,01$  in \*\*\*\* za  $p \leq 0,0001$ , dvosmerna ANOVA in Bonferronijev post hoc- test.

Vrednosti privzema so znašale pri uporabljenem histaminu v koncentraciji  $10 \mu\text{M}$  za kontrolo  $50,6 \pm 4,4 \text{ pmol}\cdot\text{mg proteinov}^{-1}$ , za vzorec  $6,3 \pm 0,5 \text{ pmol}\cdot\text{mg proteinov}^{-1}$  ter pri  $100 \mu\text{M}$  histamina za kontrolo  $376,5 \pm 27,2 \text{ pmol}\cdot\text{mg proteinov}^{-1}$  in za vzorec  $46,4 \pm 7,5 \text{ pmol}\cdot\text{mg proteinov}^{-1}$ . Naši rezultati kažejo, da je privzem histamina zelo odvisen od koncentracije  $\text{K}^+$  ionov.



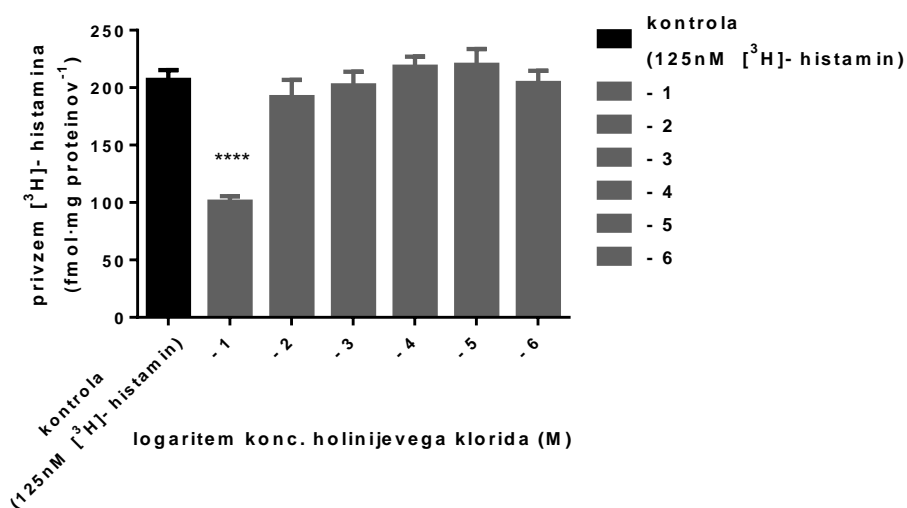
Slika 16: Primerjava privzema histamina pri koncentraciji  $100 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-histamina

Vsak stolpec predstavlja srednjo vrednost  $\pm$  standardno napako srednje vrednosti ( $N=4$  za NaF, KCN, NaN<sub>3</sub> in  $N=6$  za ostale vzorce). Statistično pomembna razlika: \*\* za  $p \leq 0,01$  in \*\*\*\* za  $p \leq 0,0001$ , enosmerna ANOVA in Bonferronijev post hoc- test.

Slika 16 povzema predhodne grafe in prikazuje statistično značilno znižanje privzema histamina pri izbrani koncentraciji  $100 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-histamina. Statistično značilno znižanje opazimo v vseh primerih pri koncentracijah, višjih od  $20 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-histamina, vendar zaradi preglednosti prikazujemo vrednosti pri koncentraciji  $100 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-histamina. Ostale vrednosti so razvidne v predhodnih grafih.

## Vpliv holinijevega klorida

Holinijev klorid lahko uporabimo kot nadomestek za  $\text{Na}^+$  ione, kadar potrebujemo medij brez  $\text{Na}^+$  ionov. Predhodne raziskave naših sodelavcev so že pokazale, da zamenjava  $\text{NaCl}$  s holinijevim kloridom povzroči zmanjšanje privzema histamina [15]. Kot organski kation pa je holinijev klorid substrat za nekatere prenašalce organskih kationov, kar bi lahko vplivalo na interpretacijo rezultatov. V našem poskusu smo mediju za privzem dodali holinijev klorid v različnih koncentracijah, da bi preverili ali vpliva na privzem histamina tudi v prisotnosti  $\text{Na}^+$  ionov.



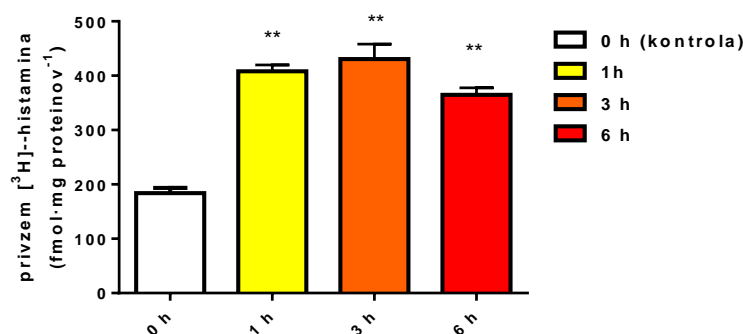
Slika 17: Privzem 125 nM [<sup>3</sup>H]-histamina ob dodatku holinijevega klorida

Stolpci predstavljajo srednjo vrednost privzema ± standardno napako (N=6). Statistično pomembna razlika: \*\*\* za  $p \leq 0,001$ , enosmerna ANOVA in Bonferronijev post hoc- test.

Astrocite smo inkubirali 60 min v pufri za privzem z dodatkom holinijevega klorida različnih koncentracij, nato pa 20 min z 125 nM [<sup>3</sup>H]-histaminom. Vse poskuse smo izvedli pri 37 °C.

Vrednosti privzema so znašale za kontrolo  $206,8 \pm 8,4$  fmol·mg proteinov<sup>-1</sup> za koncentracijo holinijevega klorida  $10^{-1}$  M pa se privzem zmanjša na  $100,8 \pm 8,4$  fmol·mg proteinov<sup>-1</sup>.

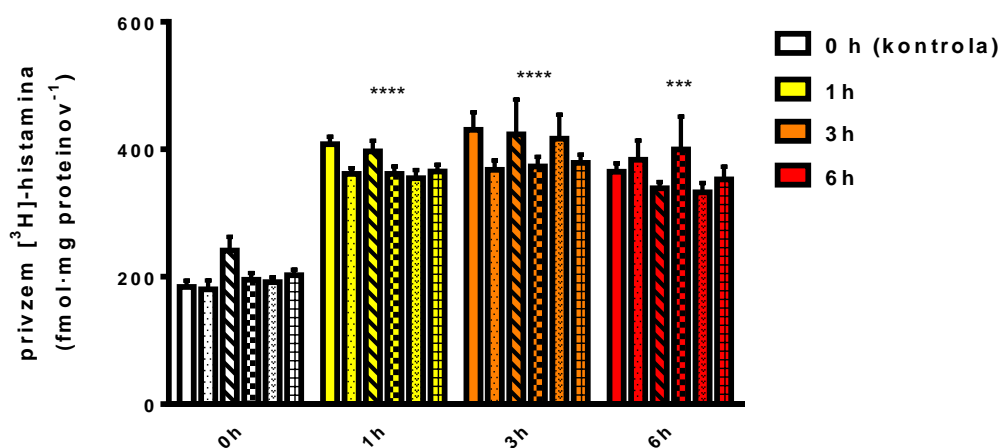
## Vpliv ishemije na privzem histamina



Slika 18: Vpliv ishemije na privzem 125 nM [<sup>3</sup>H]-histamina

Astroците smo inkubirali 0h, 1h, 3h ali 6h v hipoksičnih pogojih in odtegnitvi hranil pri 37°C. Prikazane so srednje vrednosti ± standardne napake srednjih vrednosti (N=3). Statistično pomembna razlika: \*\* za  $p \leq 0,01$ , enosmerna ANOVA in Bonferronijev post hoc- test. Število potrebnih ponovitev: N=1

Izpostavljenost celic pogojem, ki simulirajo ishemijo, nepričakovano poveča privzem histamina. Vrednost privzema za kontrolo znaša  $183,9 \pm 9,8$  fmol·mg proteinov<sup>-1</sup>, za celice izpostavljene ishemičnim pogojem za 1 h, 3 h in 6 h pa smo dobili naslednje vrednosti privzema v doslednem vrstnem redu:  $408,2 \pm 11,7$  fmol·mg proteinov<sup>-1</sup>,  $430,6 \pm 27,6$  fmol·mg proteinov<sup>-1</sup> in  $364,8 \pm 13,0$  fmol·mg proteinov<sup>-1</sup>.



Slika 19: Vpliv ishemije in ouabaina na privzem 125 nM [<sup>3</sup>H]-histamina

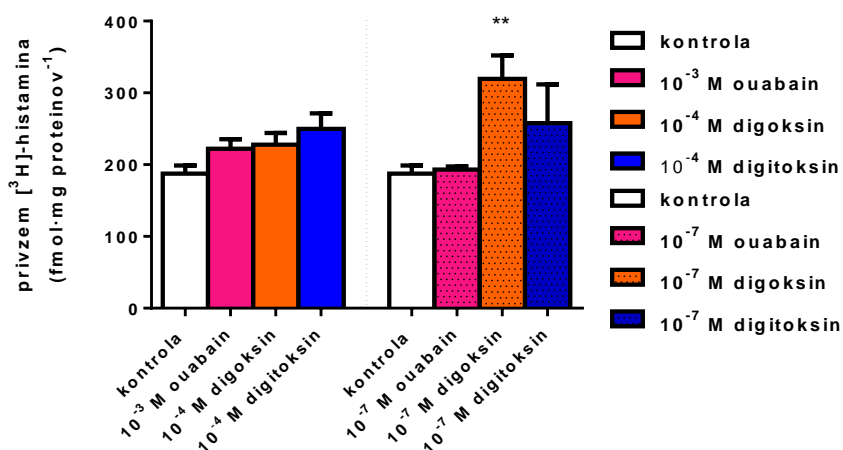
Celice so bile izpostavljene ishemiji 0h, 1h, 3h in 6 h. Stolpci za vsak časovni interval predstavljajo naknadno inkubacijo z ouabainom v doslednem vrstnem redu: 0 M (kontrola),  $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $0,5 \times 10^{-7}$  M,  $0,5 \times 10^{-6}$  M. Prikazane so srednje vrednosti ±

standardne napake srednjih vrednosti ( $N=3$  za kontrolo in  $N=6$  za ostale koncentracije ouabaina). Statistično pomembna razlika: \*\*\* za  $p \leq 0,001$  in \*\*\*\* za  $p \leq 0,0001$ , enosmerna ANOVA in Bonferronijev post hoc- test.

Na zgornjem grafu lahko opazimo značilno povečanje privzema v vseh primerih, ko smo celice izpostavili hipoksiji. Inkubacija celic s subinhibitornimi koncentracijami ouabaina ni povzročila statistične razlike v privzemu histamina v nobenem primeru.

### Vpliv različnih kardiotioničnih glikozidov na privzem histamina

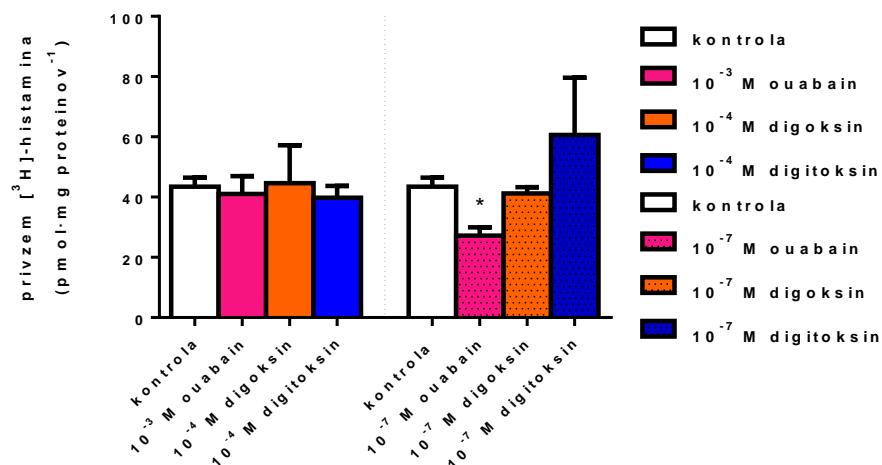
Za namen preverjanja odvisnosti privzema histamina od inhibicije NKA smo celice inkubirali s kardiotioničnimi glikozidi (KG). Uporabili smo jih v koncentracijah, ki delujejo inhibitorno in v koncentracijah, v katerih pričakujemo, da aktivirajo signalno funkcijo NKA. Za privzem smo uporabili [ $^3\text{H}$ ]- histamin v koncentracijah 125 nM in 50  $\mu\text{M}$ .



Slika 20: Privzem 125 nM [ $^3\text{H}$ ]-histamina

Astrocite smo inkubirali 20 min z ouabainom, digoksinom ali digitoksinom, nato pa 20 min z 125 nM [ $^3\text{H}$ ]-histaminom. Vse poskuse smo izvedli pri 37  $^{\circ}\text{C}$ . Stolpci predstavljajo srednjo vrednost privzema  $\pm$  standardno napako srednje vrednosti ( $N=6$ ). Statistično pomembna razlika: \*\* za  $p \leq 0,01$ , enosmerna ANOVA in Bonferronijev post hoc- test.

Za kontrolo smo dobili vrednost privzema  $187,57 \pm 11,20$  fmol/mg proteinov $^{-1}$ , ostale vrednosti se od kontrole statistično ne razlikujejo, razen v primeru 10 $^{-7}$  M digoksina, kjer je vrednost privzema znašala  $319,53 \pm 32,55$  fmol/mg proteinov $^{-1}$ , kar je 170,4 % vrednosti glede na kontrolo.



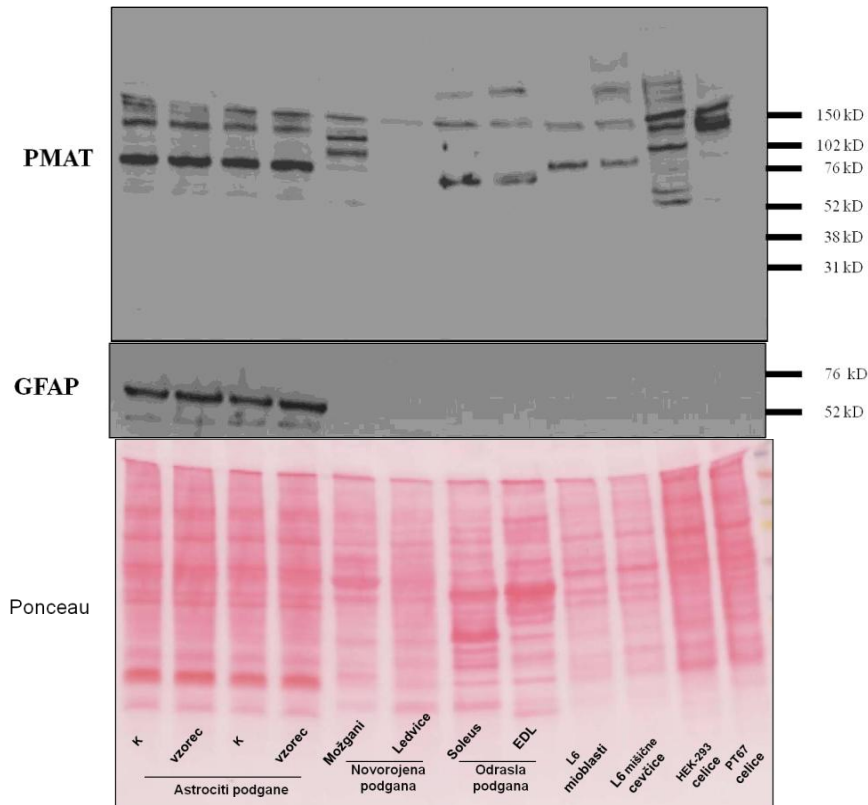
Slika 21: Privzem  $50 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-histamina

Astrocyte smo inkubirali 20 min z ouabainom, digoksinom ali digitoksinom nato pa 20 min s  $50 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-histaminom. Vse poskuse smo izvedli pri  $37^\circ\text{C}$ . Stolpci predstavljajo srednjo vrednost privzema  $\pm$  standardno napako srednje vrednosti ( $N=9$ ). Statistično pomembna razlika: \* za  $p \leq 0,05$ , enosmerna ANOVA in Bonferronijev post hoc- test.

Statistično značilne razlike v privzemu smo opazili v primeru inkubacije z  $10^{-7}$  M ouabainom. Privzem kontrole je znašal  $43,46 \pm 5,24$  pmol/mg proteinov<sup>-1</sup>, vzorca pa  $27,24 \pm 4,66$  pmol/mg proteinov<sup>-1</sup>, kar je 62,7 % vrednosti glede na kontrolo.

### Membranski prenašalec za monoamine (PMAT)

Spodnje slike prikazujejo prenos western. Spodaj je prikaz barvanja z barvilom Ponceau S in v sredini imunodetekcija GFAP, ki je značilen označevalec astrocitov. Mobilnost GFAP na gelu (nekoliko nad označevalcem 52 kD) je bila nekoliko manjša od pričakovane (50 kD), vendar je lepo razvidno, da z uporabo specifičnega protitelesa proti GFAP zaznamo signal samo v astrocitih. Pri daljši ekspoziciji filma je bil šibek signal prisoten tudi v homogenizatu možganskega tkiva. Naš namen je bil dokazati prisotnost PMAT (zgoraj) v astrocitih novorojene podgane. Pričakovanega pasu pri 58 kD [53] nismo opazili, prav tako smo ugotovili, da uporabljeno protitelo ni izkazalo želene specifičnosti, saj kljub ponovitvi poskusa namesto enega opazimo več dodatnih pasov.



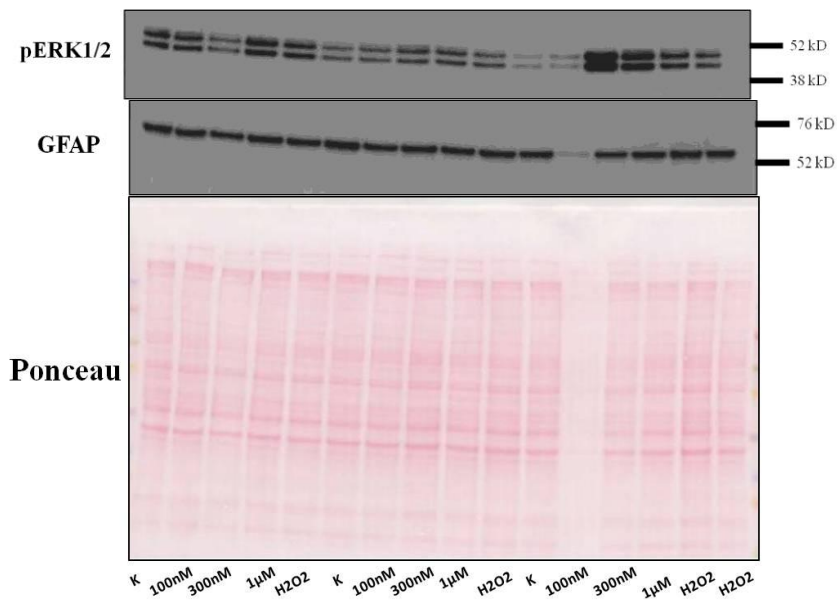
Slika 22: Barvanje z barvilom Ponceau S, imunodetekcija GFAP in PMAT

Slike so bile posnete v Laboratoriju za molekularno nevrobiologijo, Inštitut za patološko fiziologijo, UL, Medicinska fakulteta.

Nanos vzorcev: **1**-Kontrola (K), **2**- Vzorec, **3**- Kontrola (K), **4**- Vzorec. Pozitivna kontrola [54]: Novorojena podgana (homogenizati tkiv): **5**- Možgani novorojene podgane, **6**- Ledvice. Odrasla podgana (homogenizati tkiv): **7**- Mišica soleus (Soleus), **8**-Mišica extensor digitorum langus (EDL). Celične kulture: **9**- L6 mioblasti, **10**- L6 mišične cevčice, **11**- HEK 293 celice, **12**- PT67 celice. Astrociti v stolpcih vzorcev **2** in **4** so bili 24 h izpostavljeni raztopini lipopolisaharida v koncentraciji 1  $\mu\text{g/mL}$ .

### Signalna pot ERK1/2

Slika 23 prikazuje prenos western, s katerim smo želeli dokazati, da ouabain v astrocitih aktivira znotrajcelično signalno pot ERK1/2. Celice smo inkubirali z različnimi koncentracijami ouabaina. Ob povečanju koncentracije ouabaina se ojačita pasova pri 42 kD in 44 kD, ki predstavljata pERK1/2, vendar rezultat ni konsistenten v vseh ponovitvah. GFAP je prisoten v vseh vzorcih.



Slika 23: Barvanje z barvilom Ponceau S, imunodetekcija GFAP in pERK1/2

Slike so bile posnete v Laboratoriju za molekularno nevrobiologijo, Inštitut za patološko fiziologijo, UL, Medicinska fakulteta.

Nanos vzorcev: **1, 6, 11**- kontrola (K), **2, 7, 12**- 100 nM ouabain **3, 8, 13**- 300 nM ouabain, **4, 9, 14**- 1 µM ouabain. Pozitivna kontrola : **5, 15, 16**- 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15 min).



## RAZPRAVA

### Inhibicija glikolize in citokrom-c-oksidge

Glikoliza je pomemben celični proces, katere končni produkt sta v aerobnih razmerah dve molekuli ATP in dve molekuli piruvata. S fluoridnimi ioni smo inhibirali encim enolazo in preprečili nastanek piruvata. Fluoridni ioni zavirajo tudi piruvat-dehidrogenazo. S tem smo zavirali tudi porabo piruvata, ki se nahaja v celičnem mediju. V normalnih razmerah se piruvat prenese v mitohondrijski matriks, kjer ga kompleks piruvat-dehidrogenaza oksidativno dekarboksilira do acetil koencima A (acetyl CoA), ki nadalje vstopa v cikel trikarboksilnih kislin. Produkt cikla trikarboksilnih kislin je reducirana oblika koencima nikotinamidnukleotida ( $\text{NADH} + \text{H}^+$ ), ki omogoči sklopitev oksidoredukcijskih členov v dihalni verigi na notranji mitohondrijski membrani in prenos elektronov na molekularni kisik ( $\text{O}_2$ ).  $\text{O}_2$  je končni prejemnik elektronov v dihalni verigi in je vezan na zadnji encim v dihalni verigi citokrom-c-oksidge [32, 48]. Citokrom-c-oksidge smo inhibirali s cianidnimi in azidnimi ioni. Prenos elektronov vzdolž dihalne verige je sklopljen s tokom protonov ( $\text{H}^+$ ) v medmembranski prostor mitohondrija, s čimer se ustvari elektrokemijski potencial, ki poganja ATP-sintetazo, da sintetizira ATP [32, 48]. Molekule ATP se porabljajo v vseh celičnih procesih, za katere je potrebna energija. Sorazmerno veliko jih porabi encim NKA, ki ustvarja transmembranski elektrokemijski potencial, ki poganja številne procese, tudi privzem nevrotransmitorjev.

Z izpostavitvijo celic izbranim substancam, ki okvarijo normalno celično presnovo, smo dosegli, da ATP ni nastajal, oziroma je nastajal v manjšem obsegu. To potrjujejo dobljeni rezultati.

Predinkubacija celic povzroči zmanjšanje privzema, in sicer so vrednosti v odstotkih glede na kontrolo: za 1 mM NaF 26,6%, z 0,1 mM KCN 21,6% in 1 mM  $\text{NaN}_3$  26,4% pri koncentraciji 100  $\mu\text{M}$  histamina. Med posameznimi inhibitorji pa ni značilnih razlik, kar je tudi pričakovan rezultat, saj inhibiramo isti proces, to je nastanek ATP, čeprav na dveh različnih stopnjah. Če bi študirali metabolne procese namesto privzema histamina, bi različen vpliv inhibicije glikolize in inhibicije dihalne verige z ustrežno metodo verjetno uspeli zaznati.

Čeravno smo ugotovili, da inhibicija glikolize in dihalne verige povzroči zmanjšanje privzema, pa zaradi udeležnosti ATP v številnih nadaljnjih celičnih procesih ne moremo z gotovostjo trditi, kateri izmed okrnjenih procesov je odločilen za zmanjšanje privzema. Celični procesi so močno povezani in vedno ne moremo inhibirati zgolj enega celičnega procesa. Primer so fluoridni ioni, ki ne zavirajo samo celične glikolize, temveč tudi NKA [44]. Menimo, da je najverjetnejši vzrok zmanjšanje transmembranskega elektrokemijskega potenciala zaradi okrnjenega delovanja encima NKA, ki za črpanje ionov porabi precejšen delež v celici proizvedenih molekul ATP. Iz tega pa lahko sklepamo, da je privzem histamina energijsko odvisen proces. Privzem neurotransmitorjev in drugih snovi je namreč največkrat odvisen od elektrokemijskega potenciala različnih ionov, predvsem  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  in  $\text{Cl}^-$ , pa tudi  $\text{HCO}_3^-$  ionov.

### **Vpliv $\text{Na}^+$ in $\text{K}^+$ ionov na privzem histamina**

Histamin se pri fiziološki vrednosti pH pretežno nahaja v obliki monokationa [22], kar mu preprečuje, da bi skozi celično membrano prehajal z difuzijo, zato se v celico privzema preko prenašalca. Specifični prenašalec za histamin še ni odkrit (*privzema<sub>1</sub>*), bili pa so ovrednoteni določeni nespecifični prenašalci (*privzema<sub>2</sub>*). Nespecifični prenašalci imajo različne afinitete do določenih topljencev, ki so si med sabo podobni. Ena izmed pomembnih lastnosti substratov za tovrstne prenašalce je njihov električni naboj (kationi ali anioni). Prenos topljencev preko nespecifičnih prenašalcev poteka v smeri koncentracijskega gradienta od višje koncentracije v zunajcelični tekočini v notranjost celice. Proces je lahko tudi dvosmeren. Dosedanje raziskave, vključno z delom našega laboratorija, kažejo, da se histamin v astrocite privzema s kombinacijo *privzema<sub>1</sub>* in *privzema<sub>2</sub>* [15].

Pri gojenju celičnih kultur je ključnega pomena, da uporabljamo medij, ki po elektrolitski sestavi in pH vrednosti posnema fiziološko sestavo telesnih tekočin. Tako se lahko vzpostavijo ustrezni elektrokemijski gradienti, ki so potrebni, da celice preživijo. Medij za privzem namreč v *in vitro* razmerah posnema ionsko sestavo zunajcelične tekočine. V enem izmed poskusov smo NaCl v pufri za privzem zamenjali z manitolom in tako pripravili medij brez  $\text{Na}^+$  ionov. S tem smo porušili elektrokemijski gradient  $\text{Na}^+$  ionov, ki je potreben za privzem določenih snovi v celico in rezultat je bil zmanjšanje privzema

histamina. Pri 100  $\mu\text{M}$  histamina je znašal privzem vzorca 68,0 % vrednosti kontrole, kar nakazuje na *privzem*<sub>1</sub>. Posledično smo spremenili tudi vsebnost  $\text{Cl}^-$  ionov, vendar ta gradient za naš namen ni bil bistven. V kolikor bi želeli preučevati vpliv posameznih ionov, na primer samo  $\text{Na}^+$  ali samo  $\text{Cl}^-$  ionov, bi v prvem primeru lahko  $\text{NaCl}$  nadomestili z *N*-metil-D-glukaminom (NMDG) ali holinijevim kloridom, v drugem primeru z natrijevim glukonatom. Enega izmed poskusov smo zasnovali tako, da smo v medij za privzem dodali različne koncentracije holinijevega klorida. Ugotovili smo, da holinijev klorid samo v koncentraciji 0,1 M povzroči značilno znižanje privzema histamina. Holin se v holinergične živčne celice privzema z visokoafinitetnim prenašalcem za holin (SLC5A7) [55] in ne predvidevamo, da si holin in histamin delita isti specifični prenašalec. Vpliv je verjetno zgolj osmotsko-elektrolitski, čeprav ne moremo povsem izključiti dejstva, da si histamin in holinijev klorid ne delita istega prenašalca. Ob inhibiciji z 0,1 M holinijevim kloridom znaša vrednost privzema 48,8 % glede na kontrolo. Na podlagi tega bi zato lahko sklepali, da bi prenašalec za histamin morda lahko imel zelo nizko afiniteto do holina.

Za preučevanje odvisnosti privzema od  $\text{K}^+$  ionov smo pripravili pufer za privzem z zvišano koncentracijo kalijevih ionov na 50 mM in pufer z znižano koncentracijo  $\text{K}^+$  ionov na 1,2 mM. Naši rezultati kažejo, da imajo  $\text{K}^+$  ioni močan vpliv na privzem histamina. Koncentracija  $\text{K}^+$  ionov ima bistven vpliv na vrednost membranskega potenciala celice. Iz enačbe za membranski potencial namreč sledi, da porast zunajcelične koncentracije  $\text{K}^+$  ionov povzroči depolarizacijo membrane. Depolarizacija membrane pa vpliva na razliko elektrokemijskega potenciala za nabite molekule. Če se celica depolarizira, se zmanjša tudi »gonilna sila«, ki poganja transport pozitivno nabitega histamina v notranjost celice. Znano je, da pride ob povečanju koncentracije  $\text{K}^+$  ionov na 60 mM (ob delni nadomestitvi  $\text{Na}^+$  ionov s  $\text{K}^+$  ioni) do zmanjšanja privzema histamina v kulturo astrocitov [56]. Zmanjšanje privzema v primeru pufera z znižano koncentracijo  $\text{K}^+$  ionov na 1,2 mM pa je nepričakovano. Smiselno bi bilo nadaljevati raziskave v smeri ugotavljanja vpliva inhibitorjev  $\text{K}^+$  kanalčkov, recimo z uporabo  $\text{BaSO}_4$  ali  $\text{BaCl}_2$  [20].

### **Ishemija (hipoksija in odtegnitev glukoze)**

Čeprav raziskovalci odkrivajo številne nove funkcije astrocitov, ne smemo pozabiti, da je ena izmed njihovih osnovnih nalog ohranjanje ustreznega zunajceličnega okolja za

delovanje živčnih celic. V našem raziskovalnem delu smo kulture astrocitov izpostavili hipoksiji in odtegnitvi hranil (glukoza) in na ta način simulirali razmere ob možganski kapi (ishemija). Astrociti imajo namreč v primeru možganske kapi pomembno vlogo pri podaljševanju življenjske dobe živčnih celic, saj lahko zaradi svojih (sicer skromnih) zalog glikogena vsaj za zelo kratek čas oskrbujejo živčne celice z laktatom, ki je produkt iz glikogena sproščene glukoze v anaerobnih razmerah [8].

Astrocitne kulture smo izpostavili hipoksičnim pogojem za 1 h, 3 h in 6 h. Glede na to, da omenjeni pogoji prizadenejo vitalne celične procese zaradi motene energijske presnove ter odpovedi delovanja  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, smo pričakovali zmanjšanje privzema histamina.

Glede na naše rezultate, ki so pokazali značilno povečanje privzema histamina v astrocite, smo morali prvotno hipotezo ovreči. Rezultati namreč kažejo značilen vpliv hipoksije na privzem histamina, medtem ko privzem ni odvisen od uporabljenih časovnih intervalov. Predvidevamo, da so se učinki hipoksije izrazili že po 1 h. To je za nas presenetljivo dejstvo, saj so astrocitne kulture relativno odporne celice. Sklepamo, da pri poskusu že po 1 h pride do ireverzibilnih poškodb v celični membrani, kar zmanjša njeno selektivnost in skozi jo lahko številne molekule, tudi histamin v obliki (mono)kationa, prehajajo že z enostavno difuzijo. Ne smemo pa spregledati dejstva, da je prenos histamina v astrocite dvosmeren proces. Pod določenimi pogoji pride tudi do sproščanja histamina iz astrocitov [56], vendar v naši raziskavi sproščenega histamina nismo merili.

Po hipoksiji smo celice inkubirali s subinhibitornimi koncentracijami ouabaina. Značilnega vpliva na privzem nismo zaznali pri nobeni izmed uporabljenih koncentracij. Glede na to, da predvidevamo, da je prišlo do poškodb v celični steni že po enourni izpostavljenosti hipoksiji, so to pričakovani rezultati.

Pomembno je tudi poudariti razliko med »kemično hipoksijo«, ki jo dosežemo z inhibicijo enolaze in/ali citokrom-c-oksidge in hipoksijo, kjer celicam odtegnemo glukozo in zmanjšamo delež  $\text{O}_2$  v atmosferi. Celice, izpostavljene kemični hipoksiji, imajo dovolj hranil in kisika, vendar zaradi inhibiranih encimov teh hranil ne morejo ustrezno presnavljati. Zaradi tega tudi ne morejo uporabiti znotrajcelične zaloge glikogena, medtem ko celice, ki jim zmanjšamo delež  $\text{O}_2$  v atmosferi in odtegnemo glukozo, še lahko

uporabijo omejeno zalogo glikogena, ki ga z normalno delujočimi encimi v procesu glikolize presnovijo po anaerobni poti do laktata in pri tem sintetizirajo nekaj ATP.

Druga, čeprav manj verjetna razlaga povečanega privzema bi lahko bilo povečanje števila prenašalcev za histamin. Hipoksija in odtegnitev glukoze sta namreč za celice dejavnika, ki vplivata na celično presnovo in izražanje genov. Glede na to, da so celice po izpostavljenosti hipoksiji in odtegnitvi glukoze živele še 21 h (čez noč) in niso kazale vidnih znakov nekroze tudi te možnosti ne moremo povsem izključiti.

### **Kardiotonični glikozidi**

Privzem histamina v astrocite iz možganske skorje novorojenih podgan je občutljiv na inhibicijo z ouabainom. To so dokazali sodelavci iz laboratorija ob uporabi  $10^{-3}$  M ouabaina ob študiji privzema 125 nM [ $^3$ H]-histamina v astrocite [15]. Glede na literaturne podatke za inhibicijo NKA z ouabainom v kulturi mišičnih celic, je NKA v uporabljeni koncentraciji popolnoma inhibiran [57].

V diplomskem delu pa smo se želeli osredotočiti na morebiten vpliv ouabaina in drugih (razpoložljivih) kardiotoničnih glikozidov na NKA v nižjih koncentracijah. Znano je, da ouabain v nanomolarnih koncentracijah aktivira signalno funkcijo NKA. Poskuse privzema smo izvedli z ouabainom v koncentraciji  $10^{-3}$  M ter z digoksinom in digitoksinom v koncentraciji  $10^{-4}$  M, saj zaradi slabe topnosti slednjih nismo uspeli pripraviti koncentracije  $10^{-3}$  M na način, ki ne bi vplival na celične kulture. Signalno funkcijo NKA smo želeli aktivirati s koncentracijami ouabaina in dveh drugih KG reda  $10^{-7}$  M.

Pri privzemu 125 nM [ $^3$ H]-histamina v astrocite nismo opazili pričakovanih rezultatov. Pri višjih koncentracijah ( $10^{-3}$  M oz.  $10^{-4}$  M ) namreč ni bilo statističnih razlik v privzemu, čeprav bi pričakovali inhibicijo NKA in zmanjšan privzem histamina vsaj v primeru inhibicije z  $10^{-3}$  M ouabainom. Pri nižjih koncentracijah KG smo sicer opazili značilno povečanje privzema ob uporabi  $10^{-7}$  M digoksina. Privzem je znašal 170,4 % glede na kontrolno vrednost.

V naslednjem koraku smo se odločili izvesti poskus s povečanjem koncentracije [ $^3$ ]-histamina na 50  $\mu$ M. Naša hipoteza je bila, da bi se ob uporabljeni večji koncentraciji histamina utegnile minimalne razlike v privzemu bolje izraziti. Dobljeni rezultati so pri

nižjih koncentracijah spet presenetljivi, saj smo pričakovali, da bo  $10^{-3}$  M ouabain inhibiral privzem histamina, vendar razlik pri nobenem izmed uporabljenih KG ne opazimo. Smo pa do neke mere potrdili našo hipotezo, saj je  $10^{-7}$  M ouabain znižal privzem histamina. V primeru inkubacije z  $10^{-7}$  M ouabainom znaša privzem 62,7 % privzema kontrole in je statistično značilno nižji.

Glede na opravljene študije kulture astrocitov podgane prevladujoče izražajo  $\alpha 1$  izoobliko podenote NKA, nekatere tudi hkrati  $\alpha 1$  in  $\alpha 2$ . Izooblika  $\alpha 2$  je bolj občutljiva na inhibicijo z ouabainom in jo v kulturi mišičnih celic lahko inhibiramo z 1  $\mu$ M ouabainom, medtem ko z 500  $\mu$ M ouabainom inhibiramo obe podenoti. Glede na rezultate sklepamo, da naše astrocitne kulture verjetno prevladujoče izražajo  $\alpha 1$  izoobliko podenote NKA (manj občutljiva na ouabain). Pričakovali bi namreč, da bo NKA ob izpostavljenosti  $10^{-3}$  M ouabainu inhibirana in privzem histamina zmanjšan.

Dobljeni rezultati nam ne omogočajo, da bi sklepali na prisotnost določene izooblike NKA, saj bi pričakovali inhibicijo vseh izooblik pri uporabljenih koncentracijah KG. Za natančno študijo prisotnih izooblik NKA bi morali uporabiti metode molekularne biologije, recimo uporabo protiteles proti izbrani izoobliki ali detektirati prisotnost ustrezne mRNA.

### **Membranski prenašalec za monoamine (PMAT)**

Poskus dokaza prisotnosti PMAT s prenosom western ni dal zelenih rezultatov. Namesto pričakovanega pasu pri 58 kD je naš rezultat več pasov, pri čemer ne moremo z gotovostjo trditi, da je pas pri 58 kD prisoten. Poskus smo večkrat ponovili in prišli do sklepa, da uporabljeno primarno protitelo ne izkazuje ustrezne specifičnosti. Odsotnost omenjenega pasu pri 58 kD pa je vendarle v skladu z dosedanjimi študijami, ki z uporabo imunohistokemijskih metod navajajo prisotnost PMAT le v kulturi človeških astrocitov [21], medtem ko v astrocitih podgane njegova prisotnost ni dokazana [3]. Menimo, da bi bilo za natančno razjasnitev dileme potrebno poskus ponoviti s protitelesom drugega proizvajalca. Poleg tega bi izražanje PMAT v astrocitih lahko potrdili ali ovrgli tudi z merjenjem PMAT mRNA z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (angl. *real-time PCR*).

## **ERK1/2**

Izpostavljenost astrocitov ouabainu aktivira znotrajcelično signalno pot ERK 1/2. Aktivacijo signalne poti smo dokazali s protitelesom pERK1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>), ki potrjuje prisotnost fosforilirane beljakovine ERK1/2 (pERK1/2). Ob inkubaciji z višjo koncentracijo ouabaina bi pričakovali sorazmerno višje izražanje ERK1/2, vendar naši rezultati v tem pogledu niso povsem konsistentni. Ob gojenju celičnih kultur smo naleteli na nepričakovan zaplet, saj so celice začele odmirati. To je razvidno iz nanosa enega izmed vzorcev, ki ima nižjo koncentracijo proteinov kot ostali. Zaradi navedenih težav, ki so pogoste pri delu s primarnimi celičnimi kulturami, menimo da bi bilo za dokončne zaključke potrebno poskus ponoviti. Dobljeni rezultati pa vseeno verjetno nakazujejo na aktivacijo znotrajcelične poti ERK1/2.

## SKLEP

Zaključimo lahko, da zaviranje energijsko odvisnih celičnih procesov zmanjša privzem histamina v astrocite. Privzem histamina je odvisen od  $K^+$  ionov in v manjši meri od  $Na^+$  ionov. Privzem histamina po vsej verjetnosti ne poteka preko membranskega prenašalca za monoamine (PMAT), ouabain pa v astrocitih najverjetneje sproži znotrajcelično signalno pot ERK1/2.

Potrdili smo naslednje hipoteze:

1. Privzem histamina je odvisen od nastajanja ATP v celicah. V razmerah zmanjšanega nastajanja ATP se bo privzem histamina zmanjšal.
2. Ouabain bo v koncentracijah, ki aktivirajo celične signalne poti vplival na privzem histamina v celično kulturo astrocitov.
3. Privzem histamina je odvisen od zunajcelične koncentracije  $Na^+$  in  $K^+$  ionov.
4. Ouabain aktivira znotrajcelično signalno pot ERK1/2.

Zavrgli smo naslednje hipoteze:

1. Ouabain bo zaviral delovanje  $Na^+/K^+$ -ATPaze in zmanjšal privzem histamina.
2. Privzem histamina se bo po hipoksiji in odtegnitvi glukoze zmanjšal.

Naši rezultati ne podpirajo tretje hipoteze, vendar pa bi bilo za dokončno opredelitev potrebno narediti dodatne poskuse.

3. Kulture astrocitov novorojene podgane izražajo membranski prenašalec za monoamine (PMAT).

Specifični membranski prenašalec za histamin ostaja neodkrit. Potrebne bodo nadaljnje raziskave vplivov na privzem, ki bodo dale nove kandidate za prenos histamina preko membrane. Odkritje specifičnega prenašalca bi bil namreč velik korak do boljšega razumevanja histaminergičnega sistema in dobra osnova za načrtovanje novih zdravil, ki bi v tem sistemu delovala.



## LITERATURA

1. Allen N, Barres B: **Neuroscience: Glia more than just brain glue.** *Nature* 2009, **457(7230):**675-677.
2. Kahlert S, Reiser G: **Glial perspectives of metabolic states during cerebral hypoxia-calcium regulation and metabolic energy.** *Cell calcium* 2004, **36(3-4):**295-302.
3. 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(3):**1193-1211.
4. 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.
5. Parpura V, Verkhratsky A: **The astrocyte excitability brief: from receptors to gliotransmission.** *Neurochemistry international* 2012, **61(4):**610-621.
6. Kržan M: **Funkcija astrocitov.** *Zdr Vest* 2001, **70:**553-559.
7. Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H, Seino S: **Molecular biology of mammalian glucose transporters.** *Diabetes care* 1990, **13(3):**198-208.
8. Rose CR, Waxman SG, Ransom BR: **Effects of glucose deprivation, chemical hypoxia, and simulated ischemia on Na<sup>+</sup> homeostasis in rat spinal cord astrocytes.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1998, **18(10):**3554-3562.
9. Sonnewald U, Qu H, Aschner M: **Pharmacology and toxicology of astrocyte-neuron glutamate transport and cycling.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2002, **301(1):**1-6.
10. Dringen R, Pfeiffer B, Hamprecht B: **Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1999, **19(2):**562-569.
11. Kandel E, Schwartz J, TM J: **Principles of Neural Science**, 4th edn. New York: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2000.
12. Perea G, Araque A: **Glial calcium signaling and neuron-glia communication.** *Cell calcium* 2005, **38(3-4):**375-382.
13. Marsden WN: **Stressor-induced NMDAR dysfunction as a unifying hypothesis for the aetiology, pathogenesis and comorbidity of clinical depression.** *Medical hypotheses* 2011, **77(4):**508-528.
14. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ: **Rang and Dale's Pharmacology.** Edinburgh: Elsevier Saunder: Elsevier; 2007.
15. Perdan-Pirkmajer K, Pirkmajer S, Cerne K, Krzan M: **Molecular and kinetic characterization of histamine transport into adult rat cultured astrocytes.** *Neurochemistry international* 2012, **61(3):**415-422.
16. Osredkar D, Burnik-Papler T, Pecavar B, Kralj-Iglic V, Krzan M: **Kinetic and pharmacological properties of [(3)H]-histamine transport into cultured type 1 astrocytes from neonatal rats.** *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* 2009, **58(2):**94-102.

17. Takeda H, Inazu M, Matsumiya T: **Astroglial dopamine transport is mediated by norepinephrine transporter.** *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2002, **366**(6):620-623.
18. Perdan-Pirkmajer K, Pirkmajer S, Raztresen A, Krzan M: **Regional Characteristics of Histamine Uptake into Neonatal Rat Astrocytes.** *Neurochemical research* 2013, **38**(7):1348-1359.
19. Engel K, Wang J: **Interaction of organic cations with a newly identified plasma membrane monoamine transporter.** *Molecular pharmacology* 2005, **68**(5):1397-1407.
20. Engel K, Zhou M, Wang J: **Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain.** *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(48):50042-50049.
21. Yoshikawa T, Naganuma F, Iida T, Nakamura T, Harada R, Mohsen AS, Kasajima A, Sasano H, Yanai K: **Molecular mechanism of histamine clearance by primary human astrocytes.** *Glia* 2013, **61**(6):905-916.
22. Williams DA, Lemke TL: **Foye's Principles of Medicinal Chemistry.** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002:794-812.
23. Watanabe T, Taguchi Y, Shiosaka S, Tanaka J, Kubota H, Terano Y, Tohyama M, Wada H: **Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker.** *Brain research* 1984, **295**(1):13-25.
24. Haas H, Panula P: **The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system.** *Nat Rev Neurosci* 2003, **4**:121-130.
25. Panula P, Nuutinen S: **The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease.** *Nat Rev Neurosci* 2013, **14**(7):472-487.
26. Yanai K, Tashiro M: **The physiological and pathophysiological roles of neuronal histamine: an insight from human positron emission tomography studies.** *Pharmacology & therapeutics* 2007, **113**(1):1-15.
27. Barnes WG, Hough LB: **Membrane-bound histamine N-methyltransferase in mouse brain: possible role in the synaptic inactivation of neuronal histamine.** *Journal of neurochemistry* 2002, **82**(5):1262-1271.
28. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.** [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27927/figure/A1020/>]. Dostop: 5.8.2013
29. Bagrov AY, Shapiro JI, Fedorova OV: **Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets.** *Pharmacological reviews* 2009, **61**(1):9-38.
30. Lang F: **Mechanisms and significance of cell volume regulation.** *Journal of the American College of Nutrition* 2007, **26**(5 Suppl):613S-623S.
31. McGrail KM, Phillips JM, Sweadner KJ: **Immunofluorescent localization of three Na,K-ATPase isozymes in the rat central nervous system: both neurons and glia can express more than one Na,K-ATPase.** *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 1991, **11**(2):381-391.
32. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: **Biochemistry**, 6th edn. New York: W.H. Freeman and Company, NY, 2006: 351-377; 2006.
33. **Sodium-Potassium pump** [<http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=118>]. Dostop: 14.2.2013

34. Hosoi R, Matsuda T, Asano S, Nakamura H, Hashimoto H, Takuma K, Baba A: **Isoform-specific up-regulation by ouabain of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in cultured rat astrocytes.** *Journal of neurochemistry* 1997, **69**(5):2189-2196.
35. **The Sodium-Potassium Pump** [<http://www.zuniv.net/physiology/book/images/n1-3.jpg>]. Dostop: 15.2.2013
36. Matsuda T, Murata Y, Kawamura N, Hayashi M, Tamada K, Takuma K, Maeda S, Baba A: **Selective induction of alpha 1 isoform of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase by insulin/insulin-like growth factor-I in cultured rat astrocytes.** *Archives of biochemistry and biophysics* 1993, **307**(1):175-182.
37. Cameron R, Klein L, Shyjan AW, Rakic P, Levenson R: **Neurons and astroglia express distinct subsets of Na,K-ATPase alpha and beta subunits.** *Brain research Molecular brain research* 1994, **21**(3-4):333-343.
38. Krivoi I, Vasiliev A, Kravtsova V, Dobretsov M, Mandel F: **Porcine kidney extract contains factor(s) that inhibit the ouabain-sensitive isoform of Na,K-ATPase (alpha2) in rat skeletal muscle: a convenient electrophysiological assay.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003, **986**:639-641.
39. Juhaszova M, Blaustein MP: **Na<sup>+</sup> pump low and high ouabain affinity alpha subunit isoforms are differently distributed in cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**(5):1800-1805.
40. Xie Z, Askari A: **Na(+)/K(+)-ATPase as a signal transducer.** *European journal of biochemistry / FEBS* 2002, **269**(10):2434-2439.
41. Pirkmajer S: **Molekularni mehanizmi odziva na hipoksijo v začetnih stopnjah regeneracije človeške skeletne mišice.** *PhD.* Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2011.
42. Schoner W: **Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones.** *European journal of biochemistry / FEBS* 2002, **269**(10):2440-2448.
43. Prassas I, Diamandis EP: **Novel therapeutic applications of cardiac glycosides.** *Nature reviews Drug discovery* 2008, **7**(11):926-935.
44. Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM: **Molecular mechanisms of fluoride toxicity.** *Chemico-biological interactions* 2010, **188**(2):319-333.
45. hoorn: **Purification and properties of enolase of human erythrocytes.**
46. Erecinska M, Silver IA: **Ions and energy in mammalian brain.** *Progress in neurobiology* 1994, **43**(1):37-71.
47. **Mitochondria** [<http://www.nature.com/scitable/topicpage/mitochondria-14053590>]. Dostop: 20.3.2013
48. Bajrović F, Bresjanac M, Grubič Z, Marš T, Ribarič S, Sketelj J, Šuput D, Živin M: **Seminarji iz patološke fiziologije**, 1 edn. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo; 2008.
49. Auer RN, Siesjo BK: **Biological differences between ischemia, hypoglycemia, and epilepsy.** *Annals of neurology* 1988, **24**(6):699-707.
50. Swanson RA, Choi DW: **Glial glycogen stores affect neuronal survival during glucose deprivation in vitro.** *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1993, **13**(1):162-169.
51. Schwartz JP, Wilson DJ: **Preparation and characterization of type 1 astrocytes cultured from adult rat cortex, cerebellum, and striatum.** *Glia* 1992, **5**(1):75-80.

52. Motulsky H: **Intuitive Biostatistics**. New York: Oxford university Press, Inc.; 1995.
53. **abcam®** [<http://www.abcam.com/SLC29A4-antibody-ab56554-references.html>]. Dostop: 3.8.2013
54. **UniProt** [<http://www.uniprot.org/uniprot/Q7RTT9>]. Dostop: 3.11.2013
55. Apparsundaram S, Ferguson SM, George Jr AL, Blakely RD: **Molecular Cloning of a Human, Hemicholinium-3-Sensitive Choline Transporter**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000, **276**(3):862-867.
56. Huszti Z, Imrik P, Madarasz E: **[3H]histamine uptake and release by astrocytes from rat brain: effects of sodium deprivation, high potassium, and potassium channel blockers**. *Neurochemical research* 1994, **19**(10):1249-1256.
57. Heiny JA, Kravtsova VV, Mandel F, Radzyukevich TL, Benziane B, Prokofiev AV, Pedersen SE, Chibalin AV, Krivoi, II: **The nicotinic acetylcholine receptor and the Na,K-ATPase alpha2 isoform interact to regulate membrane electrogenesis in skeletal muscle**. *The Journal of biological chemistry* 2010, **285**(37):28614-28626.