

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

**MAŠA NOVAK**

**DIPLOMSKA NALOGA**  
**UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

**Ljubljana, 2013**

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

**MAŠA NOVAK**

**VPLIV TELEMETILHISTAMINA NA PRIVZEM IN  
SPROŠČANJE HISTAMINA V ASTROCITE  
PODGANE V NORMALNIH RAZMERAH IN PO  
ODTEGNITVI KISIKA IN HRANIV**

**THE EFFECT OF TELEMETHYLHISTAMINE ON  
HISTAMINE UPTAKE AND RELEASE INTO RAT  
ASTROCYTES IN NORMAL CONDITIONS AND  
AFTER OXYGEN AND GLUCOSE DEPRIVATION**

**Ljubljana, 2013**

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

**Predsednica diplomske komisije:** izr. prof. dr. Saša Baumgartner, mag. farm.

**Član diplomske komisije:** asist. dr. Stane Pajk, mag. farm.

**Mentorica:** prof. dr. Mojca Kržan, dr. med.

## **Zahvala**

Najlepše se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mojci Kržan, dr. med., za vse odgovore in strokovne nasvete, potrpežljivost in usmerjanje pri eksperimentalnem delu ter izdelavi diplomske naloge.

Prav tako se zahvaljujem asistentki Jožici Košir za uvajanje v eksperimentalno delo, strokovne nasvete in vso pomoč pri izvedbi poskusov. Delo v laboratoriju je bilo, zahvaljujoč njej, vedno prijetno.

Hvala izr. prof. dr. Saši Baumgartner, mag. farm. in asist. dr. Stanetu Pajku, mag. farm. za pregled diplomske naloge.

Velika zahvala gre družini in prijateljem, še posebej pa mami, očetu, bratu in Aaronu, da so me vzpodbujali, me razvedrili in mi bili v oporo med celotnim študijem.

## **Izjava**

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

Ljubljana, januar 2013

---

Maša Novak

## VSEBINA

<b>POVZETEK</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b> .....	7
<b>UVOD</b> .....	8
1. Živčevje.....	8
1.1 Anatomska delitev živčevja.....	8
1.2 Funkcijska delitev živčevja.....	9
2. Celice živčevja .....	9
2.1 Nevroni .....	9
2.2 Živčno oporno tkivo .....	11
3. Možgani .....	15
3.1 Struktura .....	15
3.2 Hipotalamus.....	16
3.3 Možganska kap in astrociti .....	17
4. Sinapsa .....	19
4.1 Prenos živčnega impulza .....	19
4.2 Živčni prenašalci.....	20
4.3 Vezavna mesta .....	23
4.4 Načini inaktivacije živčnega prenašalca .....	23
5. Histaminergični sistem.....	26
5.1 Fiziološka vloga in lokacija histamina v možganih.....	26
5.2 Biosinteza in metabolizem histamina .....	27
5.3 Receptorji za histamin, njihovi agonisti in antagonisti.....	28
<b>NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE</b> .....	30
<b>MATERIALI IN OPREMA</b> .....	32
<b>METODE</b> .....	34
1. Poskusne živali.....	34
2. Priprava primarnih astrocitnih celičnih kultur .....	34
3. Simulacija možganske kapi v razmerah <i>in vitro</i> .....	35
4. Privzem histamina v astrocite ob prisotnosti tele-metil-histamina in pomanjkanju natrijevih ionov .....	36
5. Sproščanje histamina iz astrocitov ob prisotnosti tele-metil-histamina.....	37
6. Izračun koncentracije privzetega ali sproščenega histamina .....	38
7. Bradfordova metoda določanja proteinov v vzorcu .....	39
8. Analiza podatkov .....	40
<b>REZULTATI</b> .....	42
1. Privzem in sproščanje histamina iz astrocitov .....	42
2. Odvisnost privzema histamina v astrocite od prisotnosti natrijevih ionov .....	43

3. Privzem histamina v astrocite ob pomanjkanju kisika in hraniv .....	44
4. Vpliv tele-metil-histamina na privzem histamina v astrocite .....	45
5. Vpliv tele-metil-histamina na sproščanje histamina iz astrocitov.....	47
<b>RAZPRAVA</b> .....	50
<b>SKLEP</b> .....	54
<b>LITERATURA IN VIRI</b> .....	55
<b>PRILOGE</b> .....	I
PRILOGA I.....	I
PRILOGA II.....	II
PRILOGA III .....	III
PRILOGA IV .....	V

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Funkcijska delitev živčnih sistemov .....	9
Preglednica II: Vloga astrocitov med človekovim življenjem .....	12
Preglednica III: Delitev živčnih prenašalcev v širšem pomenu .....	22
Preglednica IV: Receptorji za histamin .....	29

## KAZALO ENAČB

Enačba 1: Število $\beta$ -razpadov radioaktivnega izotopa na minuto. ....	38
Enačba 2: Izračun koncentracije $^3\text{H}$ -histamina v vzorcu.....	39
Enačba 3: Beer-Lambertov zakon .....	39

## KAZALO SLIK

Slika 1: Osnovne lastnosti živčne celice .....	10
Slika 2: Celice živčnega opornega tkiva v centralnem živčnem sistemu .....	13
Slika 3: Možganske ovojnice.....	15
Slika 4: Glavne možganske strukture .....	16
Slika 5: Tridelna sinapsa .....	19
Slika 6: Sproščanje živčnega prenašalca iz veziklov presinaptičnega nevrona.....	21
Slika 7: Načini inaktivacije živčnega prenašalca v sinapsi .....	24
Slika 8: Histaminergični nevroni s projekcijami, ki potekajo v možganih .....	26
Slika 9: Biosinteza histamina .....	27
Slika 10: Metabolizem histamina .....	28
Slika 11: Delovne hipoteze.....	30
Slika 12: Mikrotiterski plošči z 12 razdelki, v katerih so zasajeni astrociti .....	36
Slika 13: Privzem in sproščanje $^3\text{H}$ -histamina iz astrocitov v fizioloških razmerah, po izpostavitvi 125 nM $^3\text{H}$ -histamina .....	42
Slika 14: Vpliv $\text{Na}^+$ ionov na privzem 125 nM $^3\text{H}$ -histamina v astrocite .....	43
Slika 15: Vpliv pomanjkanja $\text{Na}^+$ ionov na privzem 125 nM $^3\text{H}$ -histamina v astrocite v kontrolnih razmerah ter po 3- in 6-urni hipoksiji in pomanjkanju hraniv .....	44
Slika 16: Vpliv tele-metil-histamina na od natrijevih ionov odvisen (A) in neodvisen (B) privzem 125 nM $^3\text{H}$ -histamina v astrocite .....	45
Slika 17: Vpliv tele-metil-histamina in 3-urne ishemije na od natrijevih ionov odvisen (A) in neodvisen (B) privzem 125 nM $^3\text{H}$ -histamina v astrocite.....	46
Slika 18: Vpliv tele-metil-histamina in 6-urne ishemije na od natrijevih ionov odvisen (A) in neodvisen (B) privzem 125 nM $^3\text{H}$ -histamina v astrocite.....	47
Slika 19: Sproščanje $^3\text{H}$ -histamina iz astrocitov po izpostavitvi 125 nM $^3\text{H}$ -histamina v fizioloških razmerah ter po 3- ali 6-urni ishemiji .....	48
Slika 20: Količina sproščenega $^3\text{H}$ -histamina v kontrolnih razmerah (A) ter po predhodni izpostavitvi astrocitov 3-urni (B) ali 6-urni (C) ishemiji, 125 nM $^3\text{H}$ -histamina in tele-metil-histaminu .....	49
Slika 21: Histamin v obliki diprotonirane molekule .....	51

## POVZETEK

Histaminergični živčni sistem v možganih ima pomembno vlogo pri vzdrževanju budnosti, koncentracije, učenju in pomnjenju. Vpliva na regulacijo hranjenja in na energetsko bilanco. Vemo, da se histamin iz sinaptične špranje v veliki meri odstranjuje v astrocite. Preko katerih prenašalnih proteinov in na kakšen način ta proces poteka, še ni znano. Prav tako ni znano, ali se histamin preko enakih prenašalnih proteinov tudi vrača iz astrocitov v sinapso ter nato v presinaptični nevron.

V diplomskem delu smo s spreminjanjem eksperimentalnih pogojev proučevali, kakšne so lastnosti privzema in sproščanja histamina iz astrocitov. Vzgojili smo primarne kulture astrocitov in jih izpostavili 3- ali 6-urnim hipoksičnim razmeram in pomanjkanju hraniv. Na ta način smo želeli ugotoviti, ali je prenos histamina v astrocite energetsko pogojen proces. Zanimalo nas je tudi, kako bo dodatek tele-metil-histamina vplival na privzem in sproščanje histamina iz astrocitov. Predpostavili smo, da se tele-metil-histamin veže na isti prenašalni protein kot histamin in bo zmanjšal njegov privzem oziroma sproščanje. Da bi ugotovili, ali je prenos histamina v astrocite odvisen od prisotnosti  $\text{Na}^+$  ionov, smo pri poskusih uporabili pufer s holinijevim kloridom namesto pufera z  $\text{Na}^+$  ioni.

Pomanjkanje kisika in hraniv je povzročilo funkcionalno okvaro celične membrane astrocitov. Zaradi porušenega ionskega gradienta in pomanjkanja energije se je privzem histamina po 3-urni ishemiji zmanjšal. Ob daljši ishemiji se je zvečala tudi prepustnost celične membrane, zato se je privzem histamina v astrocite po 6-urni ishemiji zmanjšal v manjši meri. Pomanjkanje  $\text{Na}^+$  ionov je zmanjšalo privzem histamina. Dodatek tele-metil-histamina ni bistveno vplival na privzem ali sproščanje histamina iz astrocitov. Zaključimo lahko, da je privzem histamina v astrocite dvosmeren, od  $\text{Na}^+$  ionov odvisen proces, ki poteka preko prenašalnih proteinov s pasivnim in aktivnim prenosom. Prenašalni protein ni selektiven za histamin, vendar sklepamo, da ima veliko kapaciteto, saj tele-metil-histamin bistveno ne vpliva na količino privzetega ali sproščenega histamina.

**Ključne besede:** histamin, tele-metil-histamin, privzem in sproščanje histamina, astrocit, ishemija.

## ABSTRACT

Brain histaminergic nervous system has an important role in maintaining wakefulness, cognition, it is also involved in the learning process and memory. It influences feeding and maintains energy balance in the body. It is known that histamine clears from synaptic cleft in high percentage into astrocytes. How this process happens and which transport proteins are used, is still a mystery. It is also not known if histamine uses the same transport protein for release from astrocytes and if it is then taken up into presynaptic neuron.

In this thesis the experimental conditions were adjusted in such manner that the characteristics of histamine uptake and release from astrocytes could be studied. To start with, primary cultures of astrocytes were grown and exposed to hypoxic conditions and lack of nutrients for 3 or 6 hours. In this way it could be found out if histamine uptake and release from astrocytes is an energy dependant process. Furthermore, how tele-methyl-histamine affects uptake and release of histamine, was also in our interest. It was assumed that tele-methyl-histamine binds to the same carrier protein as histamine and thus reduces its uptake and release from astrocytes. To evaluate if lack of sodium ions in the uptake buffer affects the characteristics of histamine uptake, uptake buffer with choline chloride was used instead of sodium chloride.

Functional damage to the membrane of astrocytes was caused by oxygen and glucose deprivation. Reduction of histamine uptake after 3 hours of exposure to ischemia was caused by the absence of normal ion gradient together with the lack of energy. Histamine uptake decreased less after 6 hours of deprivation because higher permeability of the cell membrane was caused by oxygen and glucose deprivation. Histamine uptake was also decreased by the lack of sodium ions. On the other hand, histamine uptake or release was not majorly influenced by tele-methyl-histamine. It can be summarized that histamine uptake into astrocytes is a bidirectional, sodium-dependent process. Transport through the cell membrane occurs with the help of carrier proteins by which histamine is transported passively or actively. The carrier protein is not selective for histamine, but it can be assumed that it has a high capacity because binding of tele-methyl-histamine does not affect histamine's uptake or release.

**Key words:** histamine, tele-methyl-histamine, histamine uptake and release, astrocyte, ischemia.



## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	adenozin-tri-fosfat, z energijo bogata molekula
BSA	goveji serumski albumin (bovine serum albumine), protein
CPM	zaznano ionizirajoče sevanje radioaktivne snovi na minuto (counts per minute)
CO <sub>2</sub>	ogljikov dioksid
DAT	dopaminski prenašalni protein
DMEM	po Dulbeccu prirejena Eaglova raztopina (Dulbecco modified Eagle's medium)
DPM	hitrost razpadov radioaktivne snovi (disintegration per minute)
EAAT 1 – 5	prenašalni proteini za glutamat
EFF	učinkovitost (efficiency)
FBS	serum govejega zarodka (fetal bovine serum), krvna plazma po strjevanju krvi
GABA	gama-amino-maslena kislina, živčni prenašalec
GAT	prenašalni protein za GABA
GLYT	prenašalni protein za glicin
HEPES	hidroksi-etil-piperazin-etan-sulfonska kislina, sestavina pufra za privzem
HNMT	histamin-N-metil-transferaza
K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	kalijev dihidrogen fosfat, sestavina pufra za privzem
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATP-aza	prenašalni protein, ki aktivno prenaša Na <sup>+</sup> iz celice in K <sup>+</sup> v celico
NaOH	natrijev hidroksid, baza
NET	noradrenalinski prenašalni protein
NMDA	N-metil-D-aspartat, receptor za živčni prenašalec glutamat
OCT	prenašalec za organske katione (organic cation transporter)
O <sub>2</sub>	kisik
SERT	serotoninski prenašalni protein
SLC	prenašalni protein za topljence
TMH	tele-metil-histamin, metabolit histamina
UV-VIS	ultravijolčna-vidna absorpcijska spektroskopija

## UVOD

### 1. Živčevje

Živčevje je najbolj kompleksen organski sistem živih bitij. Sestavljen je iz specializiranih celic za prenos živčnega impulza – nevronov – in živčnega opornega tkiva s skupnim imenom celice glie (1). Njegova vloga je nadzor telesa in njegovega delovanja. Omogoča hiter prenos informacij iz okolja, procesiranje le-teh v možganskih centrih in odgovor organizma nanje. Prav tako omogoča koordinirano gibanje, čustvovanje, pomnjenje, mišljenje in druge kompleksne procese, ki so v življenju ljudi neprecenljivi.

#### 1.1 Anatomska delitev živčevja

Pri človeku delimo živčevje na dve skupini: centralni in periferni živčni sistem (2).

**Centralni živčni sistem** zajema možgane in hrbtenjačo. V njem se nahajajo funkcijski centri. Obdan je s tremi membranami oziroma možganskimi ovojnici. Vmesne prostore med možgani, hrbtenjačo in ovojnicami zaseda cerebrospinalna tekočina (likvor) (2). Centralni živčni sistem oskrbuje s krvjo preplet arterij in kapilar, ki potekajo po možganskih ovojnicah. Možganovina je zaščitena pred neposrednim vdorom snovi iz krvi s pregrado, ki jo gradijo med seboj tesno povezane endotelijske celice kapilar. Pregrada preprečuje pasivni prehod vodotopnih molekul iz krvnega obtoka v centralni živčni sistem. Ščiti centralni živčni sistem pred spremembami v koncentraciji ionov, ki lahko nastanejo zaradi dehidracije in diet. Pregrade med možgani in krvjo prav tako ne morejo pasivno prehajati nekateri hormoni in aminokisliline, ki lahko delujejo kot prenašalci živčnih signalov (1).

**Periferni živčni sistem** zajema ostalo živčevje – senzorične in motorične živce, živčne skupke oziroma ganglije (2). Motorične živce perifernega živčnega sistema funkcijsko delimo na avtonomne živce, ki delujejo neodvisno od naše volje, krčijo srce, žile, gladke mišice notranjih organov in oživčujejo žleze, ter na somatske živce, preko katerih lahko zavestno krčimo mišice. Avtonomne motorične živce delimo nato še na simpatične živce, ki so aktivnejši na primer v času telesne dejavnosti in v stanju vznemirjenja, ter na parasimpatične živce, ki so aktivnejši v času počitka, skrbijo za normalno delovanje organizma in varčujejo z energijo (2).

## 1.2 Funkcijska delitev živčevja

Ločimo več vrst živčnih sistemov glede na glavnega prenašalca živčnega impulza, kot prikazuje preglednica I.

*Preglednica I: Funkcijska delitev živčnih sistemov (1).*

vrsta živčnega sistema	primer
aktivirajoči	glutaminergični sistem
zavirajoči	gabanergični sistem
	glicinergični sistem
sistemi s projekcijami	dopaminergični sistem
	adrenergični sistem
	histaminergični sistem
	serotoninergični sistem
	holinergični sistem
	oreksinergični sistem

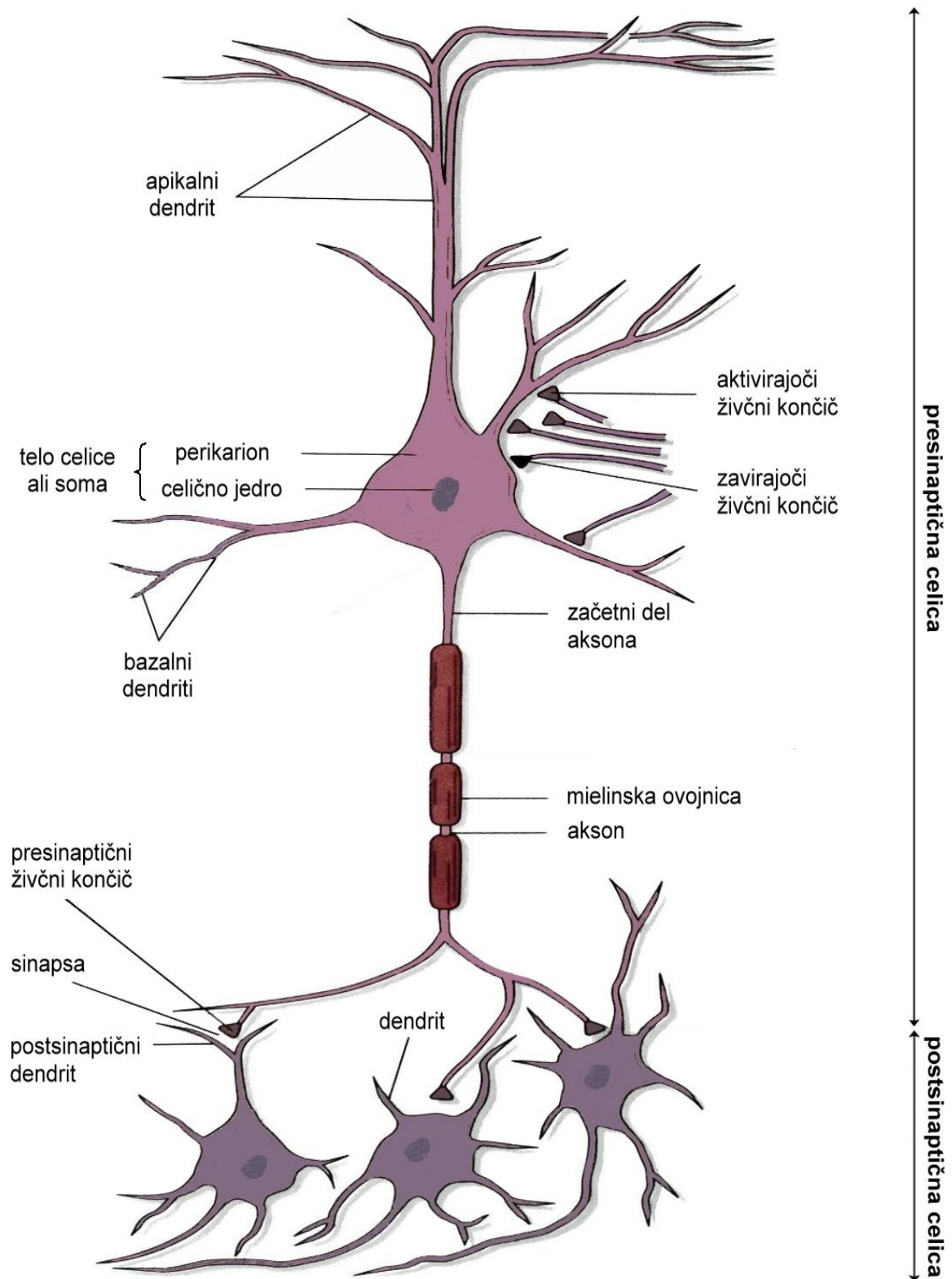
## 2. Celice živčevja

Živčni sistem gradijo v grobem dve vrsti celic: nevroni in glija.

### 2.1 Nevroni

Nevroni so specializirane celice za prenos živčnih impulzov. Omogočajo hitro komunikacijo med celicami. Komunikacija poteka preko elektro-kemičnega signala, ki se širi vzdolž celičnega podaljška – aksona. Signal sproži sproščanje kemičnega prenašalca v špranjo med nevronoma (sinapso), z vezavo na receptor nato prenese informacijo na naslednjo celico. Morfološko poznamo več vrst nevronov, glede na to, ali informacije samo prenašajo ali so vključeni v zaznavanje signalov iz okolja oziroma so vključeni v prenos signala na mišico, žleze ali druge organe (2).

Celice so zelo asimetrične, strukturno jih lahko razdelimo na telo ali somo, celično vlakno (nevrit ali akson) in na krajše izrastke ali dendrite. V somi se nahaja celično jedro in celični organeli. Tu poteka sinteza beljakovin. Dendriti so izrastki iz some, njihova glavna funkcija je sprejemanje informacij iz okolja oziroma od sosednjih nevronov. Najdaljši izrastek iz some se imenuje akson (3, 4).



**Slika 1:** Osnovne lastnosti živčne celice

(prirejeno po sliki: Principal features of a typical vertebrate neuron (1)).

Informacija se prenaša preko dendritov, telesa nevrona na akson do živčnega končiča in sinapse, kjer se prenese na naslednji nevron ali efektorsko celico. Večina nevronov ima le en akson, ki je lahko razvejan in tvori povezave z več celicami. Konec aksona imenujemo živčni končič, v katerem se nahajajo vezikli z živčnim prenašalcem (3, 4).

## 2.2 Živčno oporno tkivo

Živčevju nudi strukturno oporo, ga oskrbuje z energijo in pomaga pri presnavljanju snovi. Celice nevroglie oziroma živčnega opornega tkiva niso vzdružne. Vzdržujejo konstantno okolje in tvorijo mielin, ki obdaja podaljške živčnih celic (aksone). Mielin zaradi enakomerne prekinjenosti omogoča še hitrejši prenos impulza po živčnem vlaknu. Živčno oporno tkivo nudi tudi električno izolacijo živčnim celicam. Pomaga pri odstranjevanju odmrlih živčnih celic in pri uničevanju morebitnih mikroorganizmov (2). Glede na velikost celic živčnega opornega tkiva ločimo mikroglio in makroglio. Makroglio delimo še glede na lokacijo v telesu na centralno (astrociti, oligodendrociti, ependimske celice) in periferno makroglio (Schwannove celice, amfociti) (3).

### A) Centralna makroglija

- **Astrociti** so razvejane celice, ki razmejujejo možgane od možganske žilnice, obdajajo možganske žile in tako sotvorijo krvno-možgansko pregrado (3). Predstavljajo približno 50 odstotkov prostornine vseh celic v osrednjem živčevju. Poleg tega da ohranjajo homeostazo in primarno mikrookolje za ustrezno delovanje nevronov, aktivno vplivajo na dogodke pri možganski poškodbi in regeneraciji. Regulirajo tvorbo sinaps in jih vzdržujejo. Vzdržujejo tudi tesne stike v krvno-možganski pregradi. Spreminjajo lahko svojo obliko in funkcijo, saj imajo edinstveno sposobnost prilagajanja spremembam v mikrookolju, ki se pojavijo med človekovim razvojem in v odraslem obdobju ob možganskih poškodbah. V razvojnem obdobju astrociti omogočajo, da se živčevje pravilno razvija in hitreje obnavlja. V odraslem obdobju se ta vloga občutno zmanjša (5).

**Preglednica II:** Vloga astrocitov med človekovim življenjem (5).

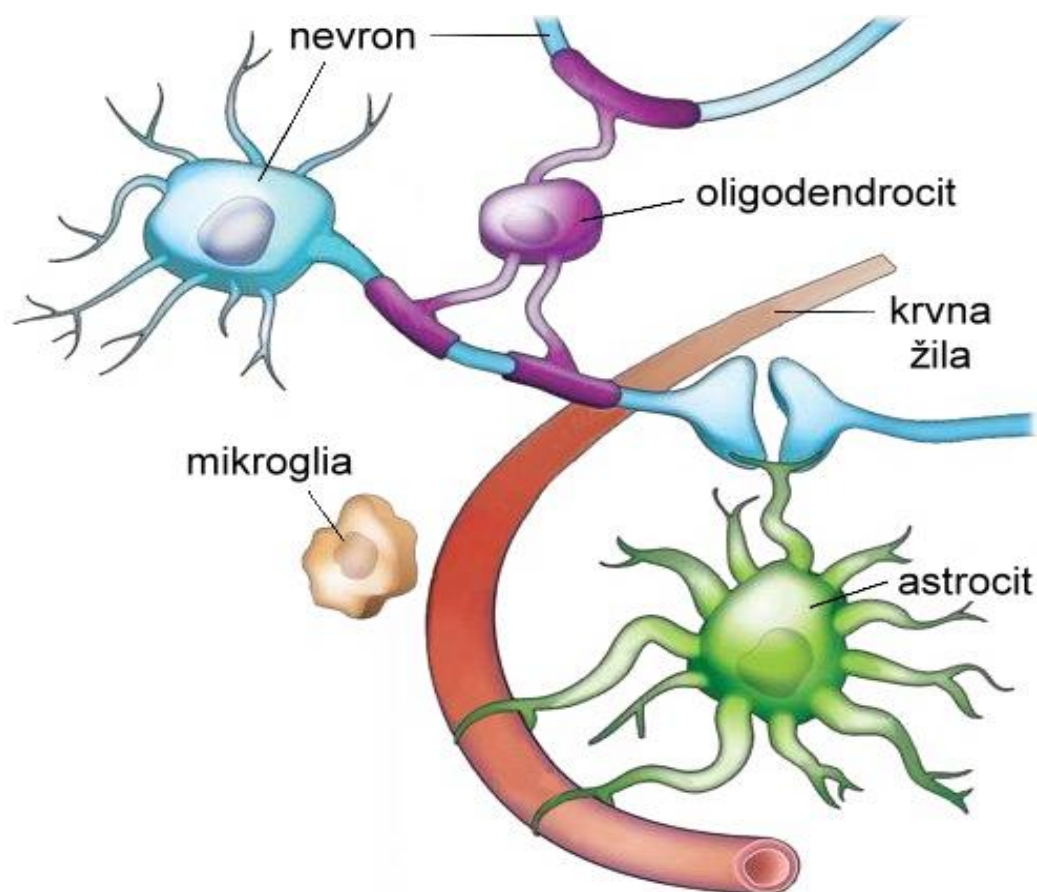
razvojno obdobje	usmerjanje rastočih nevronov
	tvorba sinaps
	sinteza nevrotrofičnih dejavnikov
odraslo obdobje	ohranjanje homeostaze
	vpliv na sinaptično plastičnost
	so del tridelne sinapse
po možganski poškodbi	nabrekanje
	reaktivna gliozna

Ločimo več vrst astrocitov: **protoplazmatske** v sivi substanci, **vlaknaste** v možganski belini in **specializirane** astrocite (na primer v malih možganih, mrežnici in hipofizi) (5).

Ena od pomembnejših funkcij astrocitov v odraslem obdobju je ohranjanje homeostaze. To izvajajo s privzemom prebitnih zunajceličnih kalijevih, amonijevih ionov in nekaterih nevrotrofitnih in tako ščitijo živčevje. Prevelike količine zunajceličnega kalija ali pa živčnega prenašalca glutamata lahko namreč povzročijo poškodbe zaradi prevelike vzdraženosti. Prebitne ione astrociti iz okolja privzemajo preko prenašalnih proteinov, ki se nahajajo v njihovi membrani, preko presledkovnih stikov ali pa preko specifičnih ionskih kanalov. Privzete ione astrociti nato odstranijo v kapilare. Nevrotrofitni glutamat privzamejo astrociti iz sinapse s pomočjo membranskih prenašalnih proteinov za glutamat. Glutamat z encimi pretvorijo v neaktivni glutamin in ga prenesejo nazaj v zunajcelični prostor, kjer ga nevron privzame in uporabi za ponovno sintezo glutamata (5). Zato lahko govorimo, da so astrociti in nevroni povezani v metabolno enoto (6). Aktivno sodelujejo pri inaktivaciji različnih živčnih prenašalcev (5).

Možgani kot vir energije uporabljajo le glukozo, ki jo v majhni meri skladiščijo v obliki glikogena. Največ glikogena v osrednjem živčevju je v astrocitih, ki izdelujejo glikogen iz glukoze, ki jo prejmejo iz možganskih žil. Te zaloge zadostujejo za pokrivanje izgub med fiziološkimi aktivnostmi. Na raven glikogena v astrocitih vplivajo živčni prenašalci. Monoamini spodbujajo razgrajevanje glikogena, glutamat sproži privzemanje glukoze v astrocit in izplavljanje laktata. Za vsako privzeto molekulo glutamata se hkrati privzame tudi ena molekula glukoze (5).

Pri patoloških procesih v osrednjem živčevju, kot so možganska kap, mehanske poškodbe, virusne okužbe, degenerativni procesi, preidejo astrociti iz mirujočega v reaktivno stanje in pripomorejo pri regeneraciji izgubljenega živčnega tkiva. Ta proces imenujemo reaktivna gliozna. V aktiviranem stanju fagocitirajo ostanke odmrlih celic, se množijo, da s tem napolnijo prazne prostore po poškodbi, in nabreknejo. Vsebujejo več glikogena in v večji meri izražajo rastne dejavnike, citokine, encime, molekule zunajceličnega matriksa, citoskeletne proteine in receptorje. Poleg odziva astrocitov na poškodbo z reaktivno glikozo poznamo še odziv z nabrekanjem. Nabrekanje lahko povzroči večja količina privzetega glutamata, aktivacija adenozijskih receptorjev, prebitek kalijevih ionov ali pa povečana koncentracija amoniaka v krvi. Najpogosteje je nabrekanje posledica kopičenja osmotsko aktivnih snovi v astrocitih (5).



**Slika 2:** Celice živčnega opornega tkiva v centralnem živčnem sistemu  
(prirejeno po sliki: *Glia–neuron interactions* (7)).

Po stimulaciji z nevrotansmitorji in drugimi signalnimi molekulami astrociti sproščajo različne živčne prenašalce, rastne dejavnike, citokine in molekule zunajceličnega matriksa, s katerimi aktivno vplivajo na dogajanje v osrednjem živčevju. So edine celice, katerih citoskelet gradi glialna fibrilarna kislina beljakovina, kar lahko izkoristimo za označevanje celic bodisi v razmerah *in vitro* ali *in vivo* (5).

- **Oligodendrociti** so celice živčnega opornega tkiva, ki tvorijo mielinske ovojnice okoli nevronov in tako skrbijo za hiter in učinkovit prenos živčnega impulza. Poznamo tudi posebno vrsto, imenovano satelitski oligodendrociti, ki niso pritrjeni na nevrone ter nimajo izolacijske funkcije, ampak v bližini nevrona uravnavaajo sestavo zunajcelične tekočine. Oligodendrociti se od astrocitov ločijo po večji gostoti citoplazme in jedra, po manjši velikosti, odsotnosti glikogena in intermediarnih filamentov v citoplazmi ter po prisotnosti mikrotubulov med različnimi celičnimi procesi (3).
- **Ependimske celice** obdajajo možganske ventrikle in centralni kanal hrbtenjače. Pomagajo možgansko-hrbtenjačni tekočini pri kroženju (3). So endotelijske celice možganskih kapilar. Tvorijo tesne stike in tako skupaj z astrociti in periciti tvorijo ter ohranjajo krvno-možgansko pregrado. Pregrada preprečuje pasivni prehod večjih vodotopnih molekul iz krvnega obtoka v centralni živčni sistem in ga tako ščiti (5).

## B) Periferna makroglia

- **Schwannove celice** imajo podobno funkcijo v obkrajnem živčnem sistemu kot oligodendrociti v centralnem. Tvorijo mielinske ovojnice okoli perifernih nevronov, izkazujejo tudi fagocitno aktivnost (3).
- **Amfociti** so majhne celice, ki obdajajo periferne nevrone in pomagajo vzdrževati konstantno kemijsko okolje okoli njih (3).

## C) Mikroglia

Tvorijo jo specializirani makrofagi, ki se gibljejo in fagocitirajo tujke (ostanke odmrlih celic, mikroorganizme) ter na ta način ščitijo živčevje. Delujejo tudi kot antigen-predstavitvene celice. Tako pomagajo pri imunskem odgovoru telesa na raznovrstne okužbe (3).

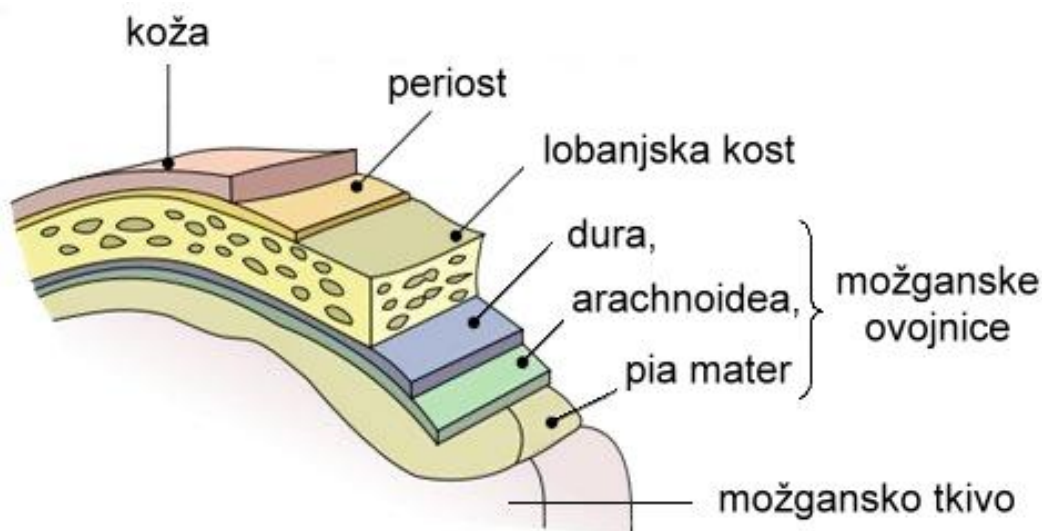


### 3. Možgani

Človekovi možgani so center živčnega sistema, kjer se zbirajo in obdelujejo informacije, ustvarjajo misli. Možgani nadzirajo, da telo motorično deluje usklajeno in omogočajo hotne gibe. Skrbijo za ohranjanje homeostaze v telesu ter da vsi telesni sistemi delujejo pravilno in tako ohranjajo telo pri življenju. Omogočajo mišljenje in pomnjenje (8).

#### 3.1 Struktura

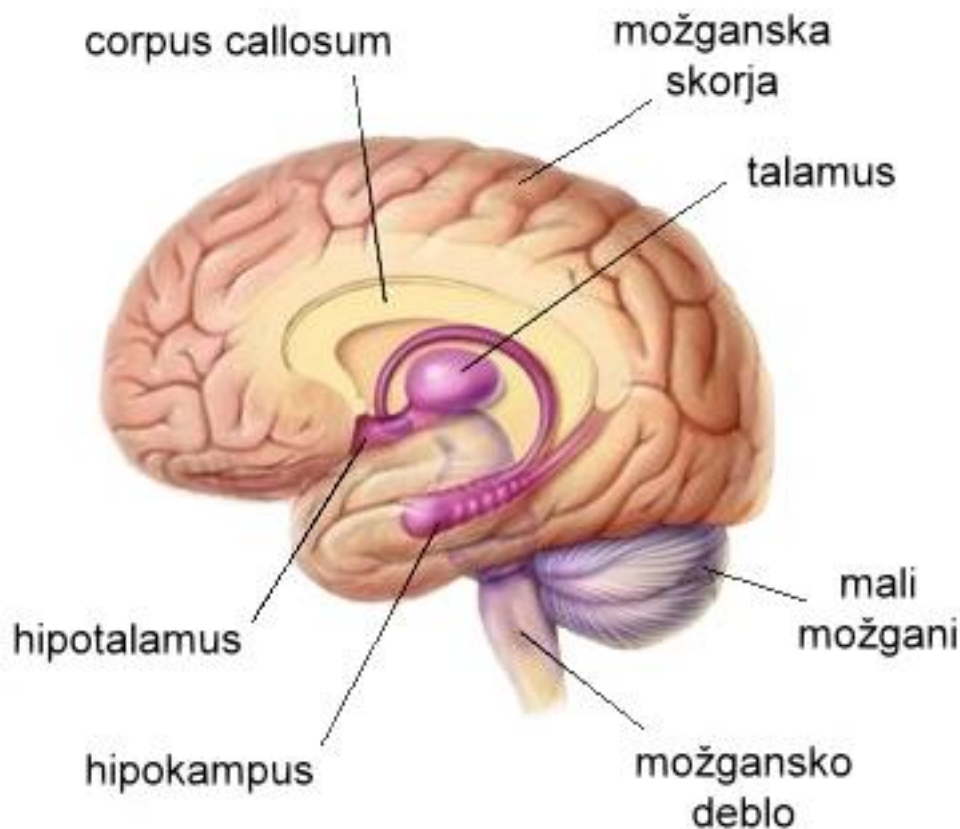
Človekove možgane obdaja in ščiti lobanjska kost. Kot del centralnega živčnega sistema so dodatno pred okoljem in preostalim telesom zaščiteni s tremi možganskimi ovojnicami. Od zunaj navznoter si sledijo: dura mater (trda ovojnica), arachnoidea mater (pajčevinasta ovojnica) in pia mater (mehka ovojnica). V prostoru med pajčevinasto in mehko ovojnico ter v ventrikularnem sistemu v možganih in hrbtenjači se nahaja cerebrospinalna tekočina – telesna tekočina, ki skrbi za njihovo mehanično in imunološko zaščito (8).



*Slika 3: Možganske ovojnice (prirejeno po sliki: Meninges-en (25)).*

Trda možganska ovojnica vsebuje večje možganske žile, ki se razvejijo v kapilare v najbolj notranji mehki ovojnici. Skozi trdo ovojnico potekajo tudi večji kanali z venozno krvjo, ki odteka iz možganov proti srcu (8).

Možgane lahko razdelimo na več struktur. V grobem jih delimo na: možgansko skorjo, male možgane, podaljšano hrbtenjačo, corpus callosum ter možganska jedra (na primer talamus, hipotalamus, hipokampus) (8).



*Slika 4: Glavne možganske strukture  
(prirejeno po sliki: NIA human brain drawing (26)).*

### 3.2 Hipotalamus

Hipotalamus je struktura v možganih, kjer se nahajajo celična jedra z različnimi funkcijami. Nahaja se pod talamusom in nad možganskim deblom ter je povezan s hipofizo. Med pomembnejše funkcije hipotalamusa sodi povezovanje živčnega sistema z žleznim sistemom, ki ga v možganih predstavlja hipofiza. Hipotalamus sintetizira in izloča nevrohormone (hipotalamusni sproščujoči hormoni), ki nato zavrejo ali vzpodbudijo sproščanje hormonov iz hipofize v kri. Izloča tiotropin-sproščujoči hormon, gonadotropin-

sproščujoči hormon, rastni hormon-sproščujoči hormon, kortikotropin-sproščujoči hormon, somatostatin, dopamin, vazopresin in oksitocin. Tako pomaga uravnati telesno temperaturo, žejo, lakoto, poželenje, krvni pritisk, srčno frekvenco, laktacijo, rast, metabolizem, spanje in dnevno-nočni ritem. Sodeluje prav tako pri odzivu organizma na stres (2, 8).

Ker usklajuje pomembne dnevno-nočne hormonske ritme, s tem močno vpliva na obnašanje človeka. Odzivati se mora tako na notranje kot na zunanje signale, zato je preko živčevja povezan s številnimi predeli možganov. Povezave tvori z možgansko skorjo, jedri podaljšane hrbtenjače in limbičnim sistemom (zajema hipokampus, amigdalo, forniks, limbični del možganske skorje, septum in jedra prednjega talamusa). Odziva se na zunanje dražljaje, kot so na primer svetloba in feromoni, ter na notranje dražljaje – krvne hormone, pirogene, živčne signale iz srca, želodca, reproduktivnega sistema in drugih predelov možganov (2, 8).

V hipotalamusu ločimo več skupkov jeder celic. Med drugim se v hipotalamusu nahajajo tudi jedra histaminergičnih nevronov, katerih projekcije segajo v druge predele možganov. Te najdemo predvsem v hrbtnem predelu hipotalamusa, natančneje v tuberomamilarnem jedru (slika 8). Od tu segajo aksoni nevronov do prednjega dela možganske skorje, limbičnega sistema in podaljšane hrbtenjače. Histaminergični nevroni hipotalamusa regulirajo spanje. Klasični H<sub>1</sub>-antagonisti, inhibitorji sinteze histamina ali uničenje samih nevronov povzroči zaspanost. Poleg tega da histamin v možganih ohranja budnost, deluje tudi zaviralno in preprečuje epileptične napade, ščiti pred poškodbami po možganski ishemiji in stresu (8, 9).

### **3.3 Možganska kap in astrociti**

Možganska kap je nenaden izpad možganskih funkcij, ki nastane zaradi nenadne motnje pretoka krvi v določenih delih možganov. Ishemična možganska kap nastopi ob zmanjšanem pretoku krvi zaradi krvnega strdka (tromboza) ali skupka maščob (embolija), ki zamaši žilo. Manj pogoste so hemoragične kapi, ki nastanejo zaradi krvavitve iz poškodovanih možganskih žil (10, 11).

Po možganski kapi se zaradi pomanjkanja kisika in hraniv okvari tudi delovanje celic živčnega opornega tkiva. Na astrocitih se to pokaže kot odpoved prenašalnih sistemov, kot je  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-aza, zaradi pomanjkanja energetske bogate molekule ATP, ki se sintetizira s pomočjo kisika in hraniv in omogoča energetske vezane procese v celici. To vodi do porušitve osmotskega ravnotežja znotraj celice in do nadaljnjih okvar. Okvari se tudi sama celična membrana, ki postane bolj prepustna za določene snovi (5).

Sposobnost astrocitov za uravnavanje koncentracije zunajceličnega kalija ali neurotransmitorjev, kot je glutamat, se zmanjša, kar lahko vodi do poškodb možganov zaradi prevelike vzdraženosti. Opazni znaki takšnih poškodb so izguba spomina, epileptični napadi, krči in motnje mišljenja. Privzemanje odvečnega glutamata in ohranjanje njegove zunajcelične koncentracije v mirovanju pod  $1 \mu\text{mol/L}$  je zato izrednega pomena za organizem. Pretirana vzdražnost živčnih celic z glutatom je lahko vzrok nekaterih neurodegenerativnih bolezni, kot so Alzheimerjeva in Huntingtonova bolezen. Zaradi prevelike koncentracije zunajceličnega glutamata propadajo nevroni tudi po možganski kapi, hipoksiji, hipoglikemiji in ob epileptičnem napadu (5).

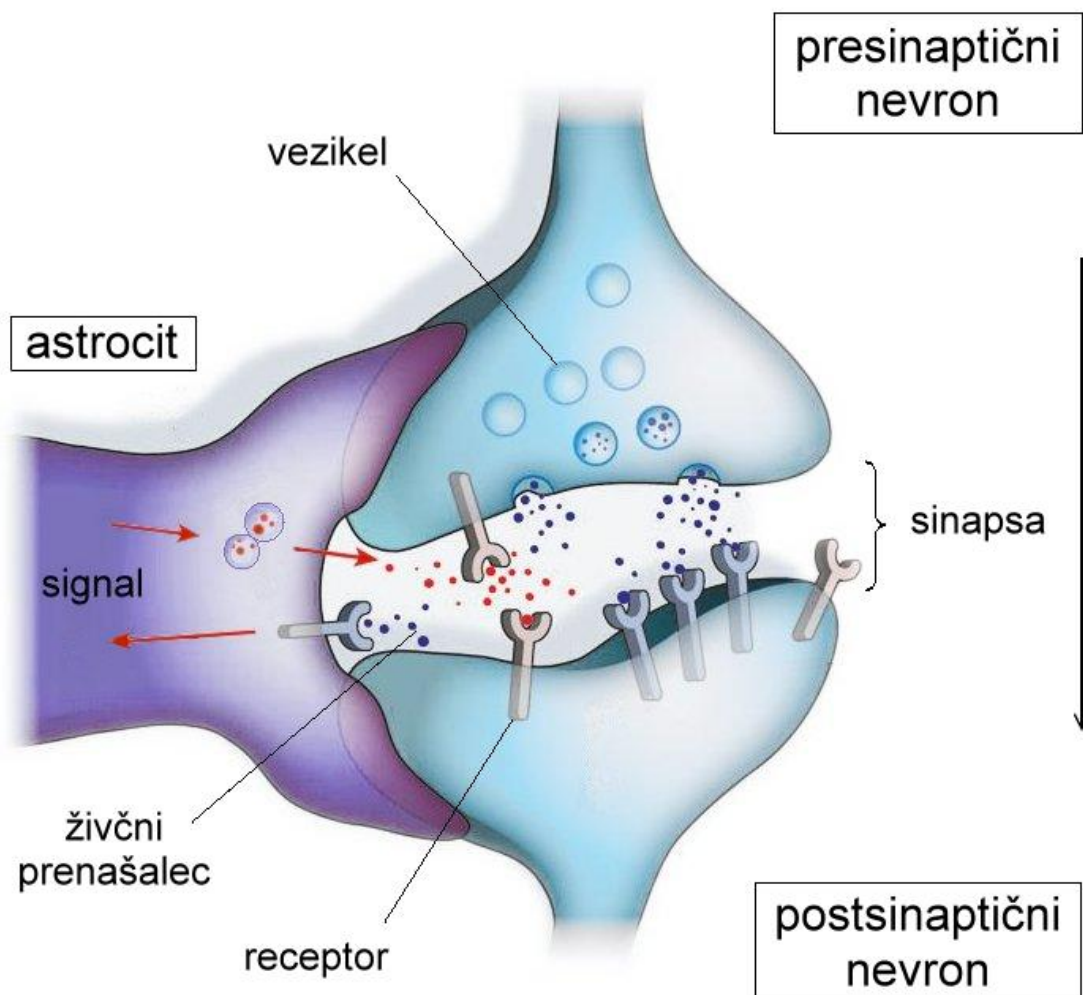
Astroцитi po možganski kapi težje privzemajo živčne prenašalce z aktivnim transportom zaradi pomanjkanja energetske bogatih molekul ATP in nedelovanja  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-aze, ki prenaša  $\text{K}^+$  ione iz sinaptične špranje v notranjost celice,  $\text{Na}^+$  ione pa v drugi smeri. Na ta način ustvarja osmotski gradient med notranjostjo in zunanostjo celice, ki je pomemben za normalno delovanje drugih prenašalnih sistemov. Prenasalni sistemi za neurotransmitor histamin še niso bili natančno opredeljeni. S simulacijo možganske kapi bi lahko pridobili informacije, ali se histamin v astrocite privzema s pomočjo aktivnega transporta in v odvisnosti od delovanja  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-aze.

## 4. Sinapsa

Sinapsa je stik membran dveh živčnih celic, med katerima se signal lahko prenaša bodisi električno ali preko kemičnega živčnega prenašalca – neurotransmitorja (4).

### 4.1 Prenos živčnega impulza

Večina nevronov prenaša signal preko aksonov. Signali se prenašajo po aksonih v obliki elektro-kemičnih valov, ki jih imenujemo akcijski potenciali. Na stiku dveh živčnih celic se signal lahko prenese bodisi električno ali kemično, tako ločimo električne in kemične sinapse. Slednje so pogostejše in lahko izzovejo več vrst odzivov živčne celice (4).



*Slika 5: Tridelna sinapsa (prirejeno po sliki: A tripartite synapse (7)).*

V kemični sinapsi ločimo dve vrsti celic: presinaptično celico, ki pošilja signal, in postsinaptično celico, ki sprejema signal. Sinapso obdaja tudi živčno oporno tkivo. V presinaptični celici se sintetizirajo kemični živčni prenašalci, ki jih celica shranjuje v drobnih okroglih tvorbah, ki se imenujejo vezikli. Tako shranjeni ostanejo vse dokler po aksonu ne prispe akcijski potencial, ki povzroči preko vdora  $\text{Ca}^{2+}$  ionov v celico spajanje veziklov s celično membrano. Posledično sledi sproščanje živčnega prenašalca v sinaptično špranjo. Prenášalec se nato veže na receptorske molekule v postsinaptični membrani in sproži odziv celice. Glede na tip receptorja, na katerega se prenašalec veže, lahko sproži aktivacijo postsinaptične celice, njeno inhibicijo ali pa le modulacijo njenega delovanja (3, 4).

Na membranah astrocitov najdemo enake receptorje kot na nevronih. Iz presinaptičnega nevrone sproščeni živčni prenašalec se lahko veže tudi na receptorje astrocitov in povzroči sproščanje različnih aktivnih substanc, med drugimi tudi ATP, ki modulira nadaljnjo aktivnost nevronov in proteinov, ki uravnavajo tvorbo novih sinaps in aktivnost nevronov (7).

Po vezavi na receptor se lahko nevrotansmitor ponovno privzame v presinaptični živčni končič in vgradi v vezikle – na ta način se ponovno uporabi, lahko ga nespremenjenega privzame živčno oporno tkivo ali pa ga encimi v sinaptični špranji razgradijo, razgradne produkte pa privzame presinaptični nevron oziroma živčno oporno tkivo (4).

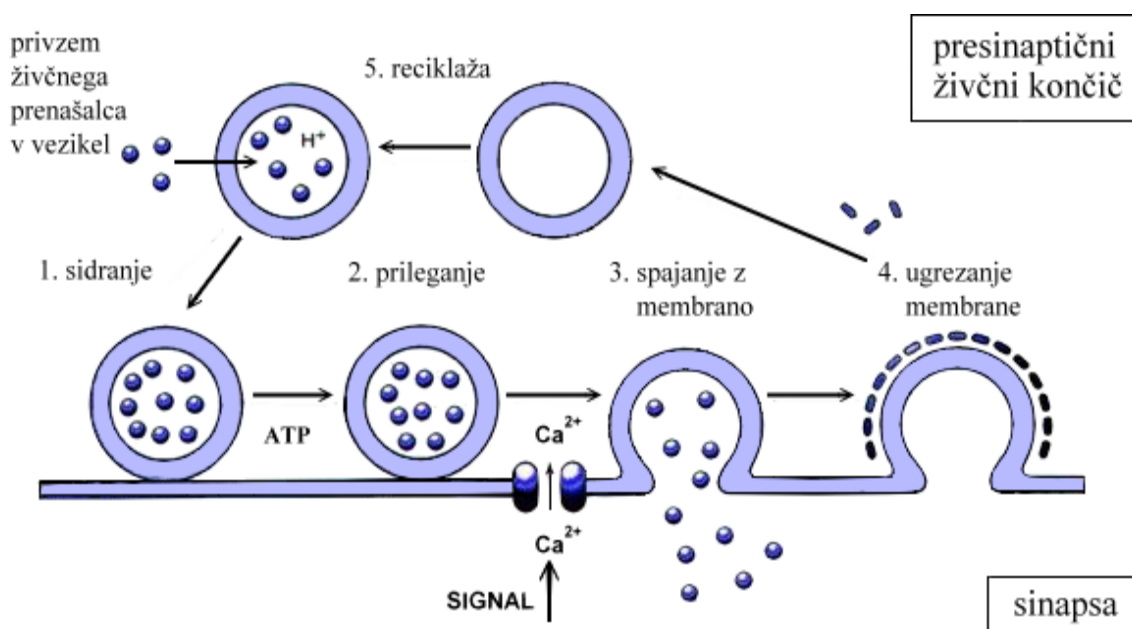
## 4.2 Živčni prenašalci

Nevrotansmitorji ali živčni prenašalci so heterogene biokemične snovi, ki omogočajo prenos sporočil med živčnimi celicami ter med živčnimi celicami in efektorskimi celicami žlez, mišic. Sprostijo se iz živčnega končiča, ko do sinapse dospe akcijski potencial. Po sprostitvi v sinaptično špranjo se vežejo na receptorje postsinaptične celice. Razgradijo se lahko že v sinaptični špranji s pomočjo encimov, ki poskrbijo za njihovo hitro inaktivacijo. Lahko pa se nespremenjeni privzamejo nazaj v nevron ali pa v celice živčnega opornega tkiva (na primer astrocite), kjer se razgradijo oziroma ponovno uporabijo (1, 3).

Obstaja na stotine različnih sinaps, saj obstaja več kot sto različnih živčnih prenašalcev, mnogi od njih se vežejo na več vrst receptorjev. V nekaterih sinapsah lahko najdemo tudi

več različnih živčnih prenašalcev, na primer **hitro delujočega** (glutamat, GABA) in **počasneje delujočega** živčnega prenašalca, ki ima predvsem modulatorno vlogo (peptidni prenašalci) (2).

Nevrotransmitorje lahko posplošeno delimo na **ekscitatorne** (aktivirajoče) in **inhibitorne** (deaktivirajoče). Odziv celice ni odvisen od živčnega prenašalca, ampak od receptorja, na katerega se le-ta veže. Živčni prenašalec glutamat se veže na več vrst receptorjev, vendar imajo po večini vsi aktivirajoče ali modulatorne učinke, zato je glutamat znan kot ekscitatorni živčni prenašalec. Podobno velja za GABA, ki se veže predvsem na receptorje, ki povzročajo hiperpolarizacijo membranskega potenciala, zato jo uvrščamo med inhibitorne živčne prenašalce (2).



*Slika 6: Sproščanje živčnega prenašalca iz veziklov presinaptičnega nevrona (prirejeno po sliki: The exocytotic cycle (1)).*

V ožjem smislu živčne prenašalce kemijsko delimo na:

- **aminokislina**, kamor spadajo: gama-amino-butirna kislina (GABA), glutamat, glicin, D-serin, aspartat (slednji trije se vežejo na NMDA – glutamatne receptorje);

- **monoamine in druge biogene amine:** dopamin, noradrenalin, adrenalin, histamin, serotonin;
- **neuropeptide**, to so peptidne molekule, ki učinkujejo v sinapsi. Mnogi od njih se sproščajo v sinaptično špranjo skupaj z endogenim živčnim prenašalcem, v nekaterih primerih pa imajo neuropeptidi glavno vlogo pri prenosu informacij. V to skupino uvrščamo med drugimi: endogene opioide ( $\beta$ -endorfin, enkefalini), galanin, substanco P, neuropeptid Y, somatostatin, nevrotsin, TRH (tirotropin sproščujoči hormon);
- **druge nevrotansmitorje:** acetilholin, adenzin, anandamid (kanabinoidni nevrotansmitor) (2).

Po širši definiciji bi med živčne prenašalce lahko prišteli tudi nekatere pline (dušikov monoksid, ogljikov monoksid) in ione, ki se ob akcijskem potencialu sprostijo iz presinaptičnega končiča, vendar se ti ne sprostijo iz veziklov (1).

**Preglednica III:** *Delitev živčnih prenašalcev v širšem pomenu (1, 2).*

vrsta nevrotansmitorja		predstavniki
nizkomolekularni	aminokisljine	glutamat, glicin, GABA, aspartat, D-serin
	derivati aminokisljin, monoamini	dopamin, noradrenalin, adrenalin, serotonin, histamin, melatonin
	derivati holina	acetilholin
	plini	NO, CO
visokomolekularni	neuropeptidi	substancia P, endorfini, enkefalini, oreksin in drugi
	lipidotopni nevrotansmitorji	endokanabinoidi, prostaglandini
	purini	adenozin, ATP
	nevrotropični faktorji	živčni rastni dejavnik (NGF), citokini in drugi



### 4.3 Vezavna mesta

V grobem delimo receptorje na dve skupini: **ionske kanale** (ionotropni) in **receptorje s sekundarnimi prenašalci** (metabotropni). Nahajajo se lahko na pre- in postsinaptični membrani. Ko se na ionski kanal veže prenašalec, se receptorju spremeni prostorska struktura in omogoči prehod določeni vrsti ionov skozi celično membrano. Glede na vrsto iona, ki vstopi ali izstopi iz celice, je učinek lahko aktivirajoč ali zavirajoč (2).

Pri vezavi prenašalca na receptor s sekundarnimi prenašalci pride do sosledja procesov znotraj celice, ki lahko vodijo do večje ali manjše vzdražnosti celice, lahko pa tudi do vpliva na prepisovanje genov. Metabotropni receptorji posredno vplivajo na ionske kanale. Učinek vezave je odvisen od vrste receptorja in ne od vrste živčnega prenašalca (2).

### 4.4 Načini inaktivacije živčnega prenašalca

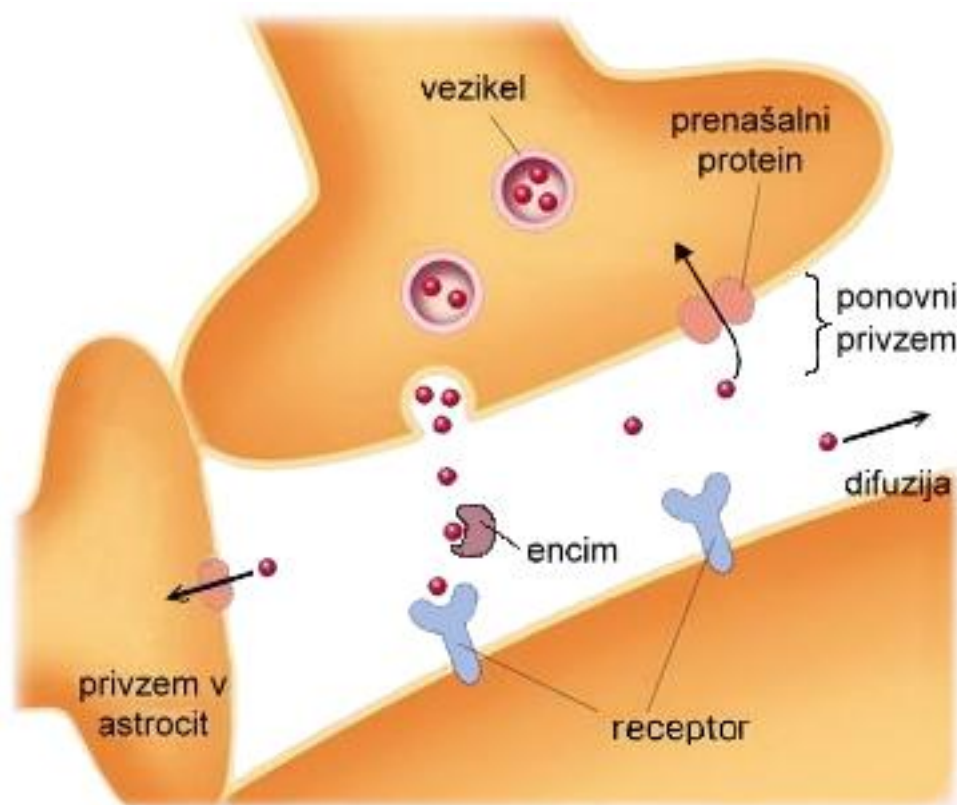
Nevrotransmitor se mora po opravljeni fiziološki funkciji hitro inaktivirati, da se prepreči prekomerno vzdraženost postsinaptičnega nevrona, ki lahko vodi v poškodbe nevronov. S hitro inaktivacijo živčnega prenašalca se omogoči prenos novih informacij in se prepreči izgubo občutljivosti receptorjev na prisotnost neurotransmitorja. Inaktivacijo živčnega prenašalca lahko izvršijo encimi z razgradnjo, iz sinaptične špranje lahko samostojno preidejo v okoliški zunajcelični prostor ali pa jih odstranijo prenašalni proteini s črpanjem v presinaptični nevron oziroma v celice glie (1).

- **Prenašalni proteini**

Prenašalni proteini oziroma prenašalci so membranski proteini, katerih glavna funkcija je prenos molekul v celice in iz njih. Molekulam lahko pasivno olajšajo prehod membrane ali pa jih aktivno prenašajo ob porabi z energijo bogatih molekul. Prenašalci omogočajo olajšan **pasiven prenos** molekulam z nabojem, ki lahko z njihovo pomočjo preidejo celično membrano v smeri elektrokemičnega gradienta. Za takšen prehod membrane ni potrebna dodatna energija. Za prenos proti elektrokemičnemu gradientu je potrebna kemična energija, ki jo celica najpogosteje pridobi ob hidrolizi molekule ATP (12).

Prenašalce, ki aktivno prenašajo molekule, lahko glede na vrsto uporabljene energije razdelimo na primarne in sekundarne. Med **primarne aktivne prenašalce** spada

družina transporterjev ABC (ATP-vezoče kasete) in ionske črpalke (ATP-aze). Prenašalci ABC ob vezavi ali hidrolizi ATP spremenijo svojo terciarno strukturo in prenesejo molekule v celico ali iz nje. Medtem ko ionske črpalke ob hidrolizi ATP prenesejo ione v celico oziroma v celične organele ali iz njih in tako ohranjajo elektrokemični gradient. **Sekundarni aktivni prenašalci SLC** uporabljajo prav ta elektrokemijski potencial kot vir energije za prenos molekul v nasprotni smeri gradienta in nimajo vezanih mest za ATP (13).



**Slika 7:** Načini inaktivacije živčnega prenašalca v sinapsi  
(prirejeno po sliki: *Release and Recycling of Neurotransmitters* (14)).

Prenašalni proteini za nevrotansmitorje so ključni člen pri zagotavljanju ustreznega sporazumevanja med nevroni. Živčni prenašalci se privzemajo z različnimi, sebi specifičnimi prenašalci. V splošnem jih delimo na **vezikularne znotrajcelične prenašalce**, ki skrbijo za prenos živčnih prenašalcev v vezikle, in **plazemske zunajcelične prenašalce**, ki odstranjujejo živčne prenašalce iz sinaptične špranje.

Med zunajceličnimi prenašalci prevladujeta dva tipa: visoko afinitetni glutamatni prenašalci in z  $\text{Na}^+$  ter  $\text{Cl}^-$  sklopljeni prenašalci. S slednjimi se iz sinaptične špranje odstranjujejo dopamin, serotonin, GABA, noradrenalin in glicin. Njihov prenos je odvisen od prisotnosti  $\text{Na}^+$  in pri večini tudi od  $\text{Cl}^-$  ionov v zunajcelični tekočini. Biogeni amini se lahko prenašajo tudi z organskimi kationskimi prenašalci (OCT), prenos ni odvisen od prisotnosti  $\text{Na}^+$  in  $\text{Cl}^-$  ionov, je nizko selektiven in visoko kapacitiven. Z eno vrsto prenašalca se lahko prenaša več različnih snovi, ki so si med seboj podobne po obliki in naboju, zato lahko pride med molekulami do interakcij, ki vplivajo tudi na privzemanje drugih prisotnih molekul (12, 15).

Na astrocitih najdemo prenašalne proteine za različne snovi. Dokazani so prenašalci za glicin, GABA, biogene amine in vsaj trije različni prenašalci za glutamat, ki so prisotni predvsem na izrastkih celic. Posledica vezava glutamata na te prenašalne proteine po sprostitvi v sinaptično špranjo je privzemanje glutamata in kalijevih ionov v astrocite, prav tako pa tudi v manjši meri sproščanje glutamata kot neurotransmitorja iz astrocitov. Sproščeni glutamat z vezavo na presinaptični živčni končič modulira sproščanje živčnega prenašalca iz nevrona ali pa z vezavo na postsinaptični nevron aktivira glutamatne receptorje. Tako lahko vidimo, da astrociti niso le oporne celice, ampak so enakopravni del tridelne sinapse (5).

Kljub temu da še niso dokazali specifičnega prenašalnega proteina, astrociti privzemajo tudi histamin (16) in vsebujejo encime za njegovo razgradnjo (6).

- **Encimi**

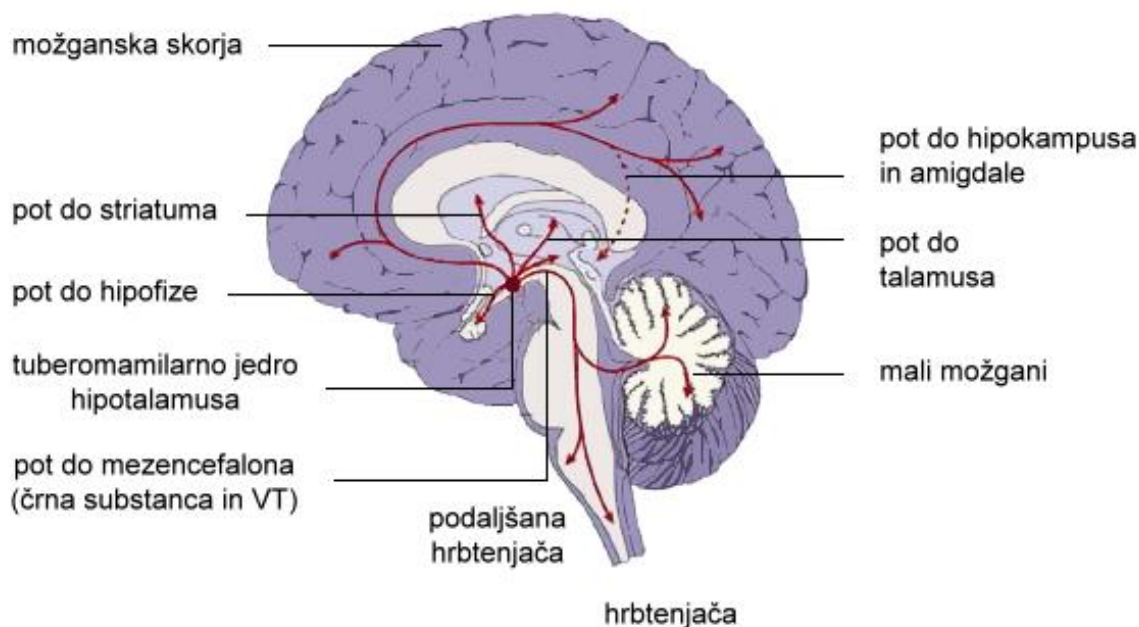
Po vezavi živčnega prenašalca na receptor je zelo pomembna njegova hitra in učinkovita inaktivacija. Na ta način se prepreči predolgo spodbudno ali zaviralno prevajanje signala. Živčni prenašalci se lahko inaktivirajo na različne načine, eden od njih je inaktivacija z encimi. Encimi katalizirajo reakcije, ki kemično spremenijo živčne prenašalce in jih tako naredijo neaktivne. Pri sinapsah, kjer je glavni prenašalec ekscitatorni acetilholin, se encim za njegovo inaktivacijo (acetilholin-esteraza) nahaja že v sami sinaptični špranji. Razgradni produkt holin se nato ponovno privzame v presinaptični nevron, kjer se uporabi za ponovno sintezo živčnega prenašalca acetilholina (2, 15).

Encimi, ki metabolizirajo živčne prenašalce, se lahko nahajajo tudi na membrani postsinaptičnega nevrona ali pa znotraj celic živčnega opornega tkiva (2). Pri živčnem prenašalcu histaminu se ta po vezavi na receptor postsinaptičnega nevrona privzame v astrocit, kjer se inaktivira s pomočjo encima histamin-N-metil-transferaze (HNMT) do produkta tele-metil-histamina (17).

## 5. Histaminergični sistem

### 5.1 Fiziološka vloga in lokacija histamina v možganih

Histamin je organska spojina, ki ima v telesu več funkcij. V centralnem živčnem sistemu deluje kot prenašalec živčnega impulza med histaminergičnimi nevroni. Jedra histaminergičnih nevronov najdemo v tuberomamilarnem jedru posteriornega hipotalamusa, njihove projekcije pa segajo v skoraj vse predele možganov in hrbtenjače, predvsem pa v prednji del možganske skorje, hipokampus, prednji del talamusa, striatum in amigdalo (slika 8).

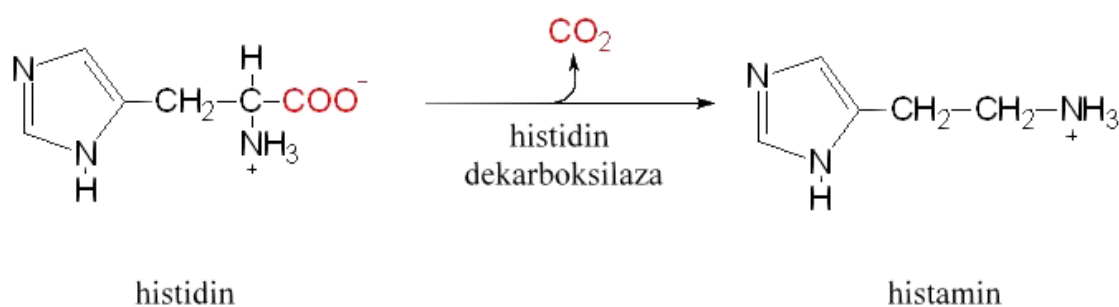


*Slika 8: Histaminergični nevroni s projekcijami, ki potekajo v možganih (prirejeno po sliki: Histaminergic projections in the CNS (1)).*

Projekcije so dvosmerne. Histaminergični nevroni tvorijo v hipotalamusu sinapse tudi z monoaminskimi in oreksigenimi nevroni. Projekcije pa tvorijo sinapse z monoaminskimi in holinergičnimi nevroni in tako sodelujejo pri vzdrževanju budnosti, koncentracije, učenju in pomnjenju. Vplivajo tudi na regulacijo hranjenja, na energetske bilanco, lokomocijo in neuroendokrino regulacijo. Poleg stimulatornega vpliva na druge nevrone izražajo tudi inhibitorne vpliv in tako ščitijo živčevje pred poškodbami ob epileptičnem napadu, stresu, poškodbi nevronov ali ob povečanju občutljivosti živčevja z zdravili (1, 9).

## 5.2 Biosinteza in metabolizem histamina

Biosinteza histamina poteka preko dekarboksilacije aminokislina histidina. Reakcijo katalizira encim L-histidin-dekarboksilaza (18).

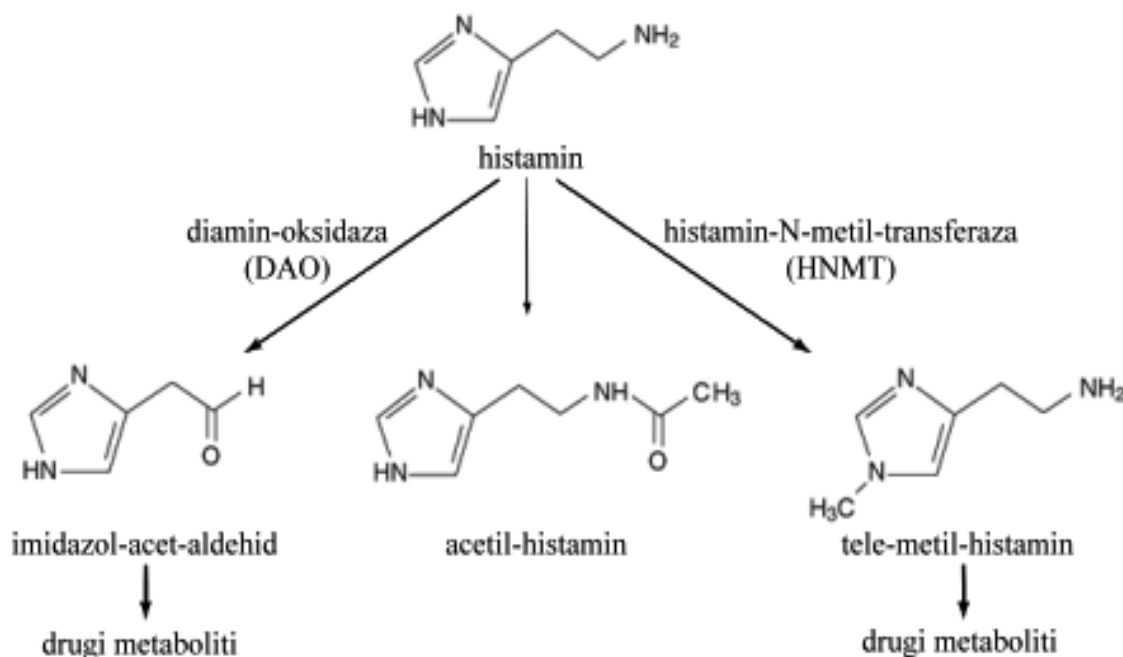


*Slika 9: Biosinteza histamina.*

Biosinteza poteka v možganih v presinaptičnih histaminergičnih nevronih, zunaj osrednjega živčevja pa v enterokromafinih celicah želodca in v celicah imunskega sistema – bazofilnih granulocitih, mastocitih. Po sintezi se histamin shrani v vezikle, iz katerih se sprosti ob signalu – akcijskem potencialu – oziroma iz mastocitov ob vezavi IgE protiteles po predhodnem stiku z antigenom. Spontano se histamin lahko sprosti tudi zaradi prisotnosti nekaterih zdravilnih učinkovin, kot so morfin (opioidni analgetik), kurare alkaloidi (hromila) in polimiksini (antibiotiki) (15, 18).

Po sprostitvi ga inaktivira encim **histamin-N-metil-transferaza** (HNMT), ki ima pomembno vlogo predvsem v centralnem živčnem sistemu, natančneje v živčnem opornem tkivu (astrociti) in v jetih (5). HNMT najdemo skoraj v vseh tkivih, je znotrajcelični

encim, zato ga ne najdemo v telesnih tekočinah (19). Da se histamin lahko razgradi s HNMT, mora vstopiti v celico (slika 10). Ker je histamin v fizioloških razmerah nabita molekula, za prehod preko celične membrane potrebuje pomoč prenašalnega proteina. Izven centralnega živčnega sistema lahko histamin inaktivira tudi **diamin-oksida**za, ki se kontinuirano sprošča iz mukusa prebavil in lahko potuje po telesu po limfatičnem krvnem obtoku (slika 10) (20).



*Slika 10: Metabolizem histamina*

*(prirejeno po sliki: Biosynthetic pathway of histamine (1)).*

Končni razgradni produkti, ki nastajajo predvsem v jetrih, se eliminirajo iz telesa skozi ledvice v urin. Ali obstaja tudi metabolična pot, kjer se histamin reciklira – predvsem v histaminergičnih nevronih in živčnem opornem tkivu – še ni dokazano.

### 5.3 Receptorji za histamin, njihovi agonisti in antagonisti

Do sedaj poznamo štiri različne receptorje, na katere se lahko po sprostitvi veže histamin. To so receptorji H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> in H<sub>4</sub>, ki so vsi sklopljeni s proteini G. Podtip H<sub>3</sub> so za razliko

od ostalih presinaptični avtoreceptorji. Vezava histamina ali agonista na receptor H<sub>3</sub> povzroči zavrtje sproščanja histamina iz presinaptičnega nevrona in zato opazimo H<sub>1</sub> antagonistom podobno delovanje na centralni živčni sistem (15, 18).

**Preglednica IV: Receptorji za histamin (povzeto po (15, 18)).**

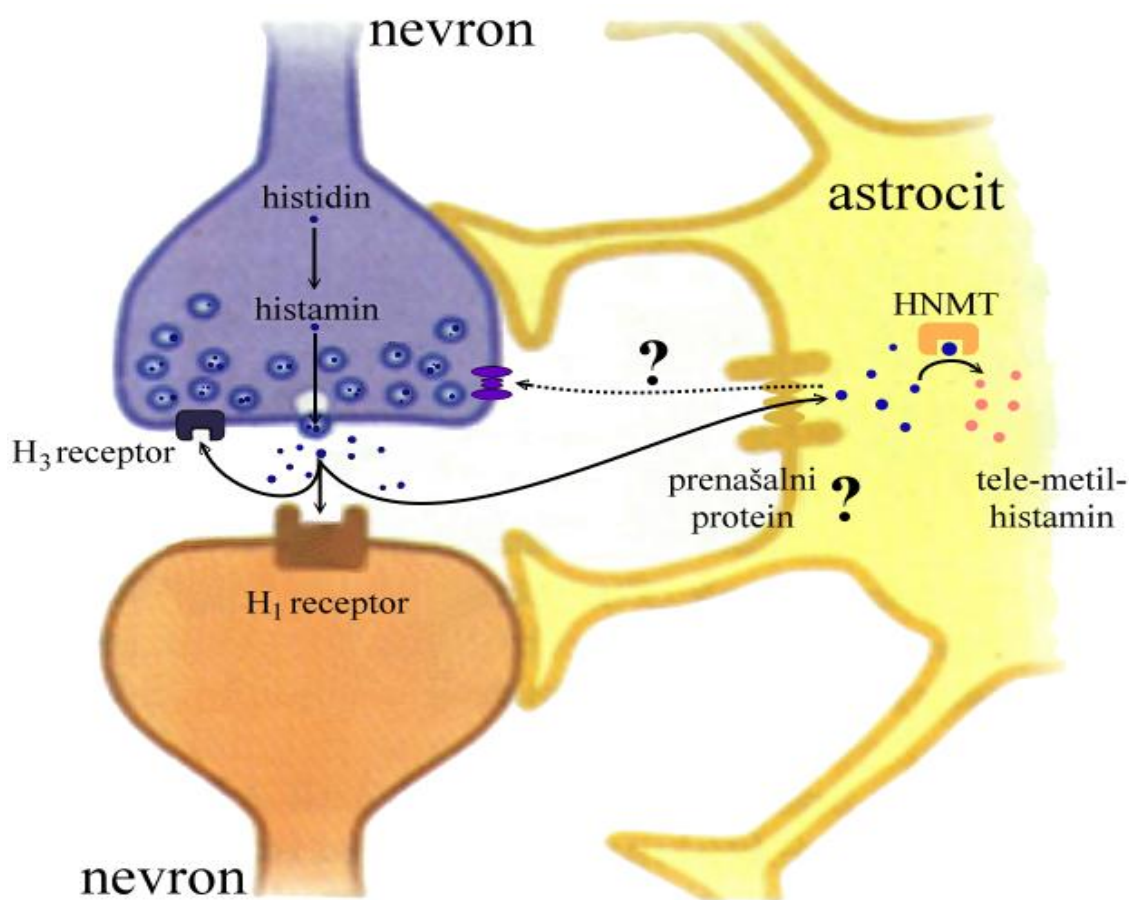
<b>vrsta receptorja</b>	<b>lokacija</b>	<b>učinki vezave agonista</b>	<b>učinki antagonist</b>
H <sub>1</sub> receptor	gladke mišice	konstrikcija bronhijev, ileuma	loratadin (Claritin®) – zdravljenje alergijskih reakcij – senenega nahoda, kožnih ekcemov, povzroča zaspanost
	endotelij žil	dilatacija in večja prepustnost endotelija žil, bolečina, srbenje, alergijske reakcije	
	centralni živčni sistem	ohranjanje budnosti, koncentracije, uravnavanje hranjenja, lokomocije, vpliv na nevrohipofizo, antiemetično delovanje	
H <sub>2</sub> receptor	parietalne celice želodca	stimulacija sekrecije želodčne kisline	ranitidin (Ranital®) – zdravljenje refluksa, preprečevanje ulkusa
	gladke mišice žil, srca	dilatacija žil, hitrejši srčni ritem	
H <sub>3</sub> receptor	centralni in periferni živčni sistem	zmanjšano sproščanje histamina, noradrenalina, acetilholina, serotonina	betahistin (Urutal®) – zdravljenje vrtočlavice, slabosti, poškodbe sluha
H <sub>4</sub> receptor	bazofilni granulociti	kemotaksa belih krvničk, izločanje nevtrofilcev iz kostnega mozga	tioperamid – zdravljenje astme, alergij
	kostni mozeg		
	priželjc		
	vranica		
	debelo črevo		
tanko črevo			

Z agonisti H<sub>1</sub> receptorjev in antagonist H<sub>3</sub> avtoreceptorjev lahko zdravimo motnje spanja, kot je narkolepsija in izboljšamo ravnotežje, sluh, koncentracijo pri starostnikih ter bolnikih z Alzheimerjevo boleznijo. Povečamo lahko tudi učinek antipsihotičnih zdravil, kar se v praksi uporablja kot pomožna terapija pri zdravljenju shizofrenije (1, 9).

## NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

V diplomskem delu bomo raziskali privzem in sproščanje histamina v astrocite novorojenih podgan. Znano je, da astrociti privzemajo histamin, vendar specifični prenašalni proteini, ki posredujejo ta proces, še niso znani (16). Vemo tudi, da se privzeti histamin znotraj astrocita metabolizira do tele-metil-histamina s pomočjo encima histamin-N-metil-transferaze (HNMT) (6). Raziskali bomo, ali obstaja krožna pot, torej ali se razgradni produkt histamina oziroma nemetabolizirani histamin s pomočjo istega prenašalnega proteina vračata iz astrocita nazaj v sinaptično špranjo in se tako (lahko) reciklira(ta).

Z boljšim poznavanjem prenašalnih sistemov za histamin na astrocitih bi lahko pridobili nove tarče za zdravljenje patoloških procesov v možganih. Preverili bomo tudi, ali ob patoloških pogojih (pomanjkanje kisika in hraniv) astrociti privzemajo histamin.



*Slika 11: Delovne hipoteze.*



**V diplomskem delu bomo preverili naslednje delovne hipoteze:**

- 1) Privzem histamina v astrocite je dvosmeren, od Na<sup>+</sup> odvisen proces.
- 2) Metabolit tele-metil-histamin zmanjša privzem in sproščanje histamina v normalnih razmerah.
- 3) Po izpostavitvi astrocitov pomanjkanju kisika in hraniv se bo zmanjšal privzem, sproščanje histamina pa se bo povečalo.
- 4) Metabolit tele-metil-histamin zmanjša privzem in sproščanje histamina iz astrocitov po izpostavitvi astrocitov pomanjkanju kisika in hraniv.

## MATERIALI IN OPREMA

Za pripravo primarnih astrocitnih celičnih kultur smo uporabili naslednje materiale:

- **raztopino za pripravo celičnih kultur**, ki je vsebovala: goveji serumski albumin (BSA, Sigma, ZDA), gentamicin (Gibco, Velika Britanija), raztopino Leibowitz-15 (Sigma, ZDA);
- **raztopino za gojenje celičnih kultur** s sestavo: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Velika Britanija), L-glutamin (Gibco, Velika Britanija), natrijev piruvat (Gibco, Velika Britanija), fetalni goveji serum (FBS, Lonza, ZDA), gentamicin (Gibco, Velika Britanija);
- **raztopino za čiščenje vzgojenih celičnih kultur**: uporabili smo 0,05 % raztopino tripsin-EDTA (Gibco, Velika Britanija).

Pri izvedbi poskusov smo uporabili:

- **<sup>3</sup>H-histaminijev diklorid**, 0,75  $\mu$ M, s specifično aktivnostjo 12,54 Ci/mmol oziroma 10,6 Ci/mmol (Perkin-Elmer, ZDA);
- **tele-metil-histamin** (Sigma, ZDA);
- **pufer za privzem s kalcijem** (normalen pufer), pH 7,4 in sestavo: 25 mM HEPES (Sigma, ZDA), 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Nemčija), 5,6 mM brezvodne D-(+)-glukoze (Merck, Nemčija), 1,7 mM kalcijevega klorida (Sigma, ZDA), 1,2 mM magnezijevega sulfata heptahidrata (Sigma, ZDA), 4,8 mM kalijevega klorida (Merck, Nemčija), 125 mM natrijevega klorida (Zorka Šabac) v bidestilirani vodi;
- **pufer za privzem brez kalcija**, pH 7,4 enake sestave kot pufer s kalcijem, le da ne vsebuje kalcijevega klorida;
- **pufer za privzem s kalcijem in holinijevim kloridom** (pufer s holinijevim kloridom), pH 7,4 in sestavo: 25 mM HEPES (Sigma, ZDA), 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Nemčija), 5,6 mM brezvodne D-(+)-glukoze (Merck, Nemčija), 1,7 mM kalcijevega klorida (Sigma, ZDA), 1,2 mM magnezijevega sulfata hepta-hidrata (Sigma, ZDA), 4,8 mM kalijevega klorida (Merck, Nemčija), 125 mM holinijevega klorida (Sigma, ZDA) v bidestilirani vodi.

Za proteinsko analizo vzorcev smo uporabili naslednje reagente:

- **Bio-Rad Protein Assay** (raztopina fosforne kisline in metanola, Bio-Rad, Velika Britanija),
- **Bio-Rad Protein Standard I** (liofilizirani goveji plazemski gama globulin, Bio-Rad, Velika Britanija).

Pri detekciji izotopa ( $^3\text{H}$ -histamina) v vzorcih smo uporabili:

- **scintilacijsko tekočino Aquasol** (zmes organskih topil, NEN, ZDA).

Uporabljali smo naslednjo opremo:

- **inkubator** (New Brunswick Scientific, Binder),
- **plastične posode za gojenje celic s perforiranim zamaškom** (TPP),
- **mikrotiterske plošče z 12 razdelki** (TPP),
- **mikrotiterske plošče s 96 razdelki** (BrandTech Scientific),
- **laboratorijski stresalnik** (Tehtnica Železniki),
- **laboratorijske igle** (TIK d. o. o.),
- **niteks membrana** (ZBF),
- **brezprašna komora z laminarnim pretokom zraka** (Iskra),
- **namizna centrifuga** (Sigma 3K18),
- **centrifugirke** (TPP, Eppendorf),
- **pipete** (Eppendorf, Gilson),
- **nastavki za pipete** (TPP, Eppendorf),
- **epruvete, viala** (Eppendorf),
- **hladilnik, zamrzovalnik** (Gorenje),
- **scintilacijski števec** (Perkin-Elmer),
- **spektrofotometer** (Tecan Group Ltd.),
- **tehtnica** (Sartorius),
- **vorteks** (Tehtnica Železniki).

## METODE

### 1. Poskusne živali

Za potrebe izvajanja poskusa na astrocitih smo pripravili primarne celične kulture iz neonatalnih podgan. Primarne kulture astrocitov smo vzgojili iz možganske skorje 3 dni starih podganjih mladičev obeh spolov. Izbrali smo podgane vrste *Rattus norvegicus*, sev Wistar in preparacijo izvedli po metodi Schwartzove in Wilsonove (21). Vsi postopki pridobivanja celic iz živali so bili izvedeni humano, v skladu z regulativami in dovoljenjem Veterinarske uprave Republike Slovenije za izvajanje poskusov na živalih št. 34401-1/2010/8. Upoštevali smo smernice za delo s poskusnimi živalmi, izdanih s strani Komiteja za zaščito živali Nacionalnih inštitutov za zdravje, Bethesda, ZDA. Uporabi živalskega tkiva se žal nismo morali izogniti, ker še ne obstajajo ustrezni neživalski modeli, ki bi omogočili preverjanje naših hipotez.

### 2.1 Priprava primarnih astrocitnih celičnih kultur

Po dekapitaciji 3 dni starih podganjih mladičev, ki jo je opravil laboratorijski tehnik z dovoljenjem za evtanazijo poskusnih živali, smo v aseptičnih pogojih iz lobanje previdno odstranili možgane in jih potopili v petrijevko s preparacijsko raztopino sestave: Leibowitz-15 raztopina, 1 mg/mL BSA, 25  $\mu$ M/mL gentamicina. Odstranili smo možganske ovojnice, nato pa še striatum, hipokampus, talamus, hipotalamus, hipofizo in možgansko deblo.

Na ta način očiščeno možgansko skorjo smo prestavili v centrifugirko s preparacijsko raztopino in centrifugirali 4 minute pri 1200 obratih na minuto in temperaturi 37 °C. Po centrifugiranju smo odlili supernatant, k usedlini dodali svežo preparacijsko raztopino ter vsebino premešali s pipeto. Nato smo suspenzijo ponovno centrifugirali pri enakih pogojih, odlili nastali supernatant in usedlini dodali svežo preparacijsko raztopino. S pomočjo pipete in injekcijskih igel različnih svetlin smo vzorec z možganskim tkivom še mehansko razdrobili. Uporabili smo igle s svetlinami: 0,9  $\mu$ m, 0,7  $\mu$ m in nazadnje še iglo s svetlino 0,5  $\mu$ m. Nadaljevali smo s filtracijo suspenzije skozi sterilno Niteks membrano z 0,75  $\mu$ m porami. Filtrat smo centrifugirali 4 minute pri 1200 obratih na minuto in temperaturi 37

°C. Pridobljeni supernatant smo odlili, usedlini pa dodali hranilno raztopino – raztopino za gojenje celičnih kultur s sestavo: DMEM z visoko koncentracijo glukoze, 10 volumskih % govejega fetalnega seruma, 2 mM L-glutamata, 1 mM piruvata in 25 µM/mM gentamicina. Pripravek smo premešali s pipeto in ga prelili v gojilno posodo. Le-to smo postavili v inkubator z atmosfero: 5% CO<sub>2</sub>, 95% zrak in temperaturo 37 °C.

Celične kulture smo nato več dni opazovali pod mikroskopom. Ko smo ugotovili, da so postale konfluentne, smo posodo čez noč postavili na stresalnik in stresali pri 150 obratih na minuto. Tako smo odstranili nečistote – celice mikroglije, ki se ne pritrdijo na stene gojilnih posod tako učinkovito kot astrociti. Z zamenjavo raztopine s svežo hranilno raztopino smo tako naslednje jutro te nečistote odstranili. Postopek čiščenja astrocitnih kultur s stresanjem preko noči in menjavo hranilne raztopine v jutranjih urah smo izvedli 3-krat v treh zaporednih dneh.

Takoj po tretjem čiščenju s stresanjem smo izvedli prvo pasažo. Odlili smo hranilno raztopino in celičnim kulturam dodali DMEM ter 0,05 % raztopino tripsin-EDTA (Gibco), ki je povzročila, da so se celične kulture odlepili od sten gojilne posode. Gojilno posodo smo za 20 minut postavili v inkubator, nato smo kulture astrocitov iz ene gojilne posode presadili v dve novi posodi, jim dodali hranilno raztopino in po 24 urah v inkubatorju zamenjali raztopino s svežo hranilno raztopino. Nato smo gojilni posodi ponovno postavili v inkubator za približno en teden.

Ko so celice ponovno postale konfluentne, smo ponovno odlepili celice s pomočjo tripsina in suspenzijo celic prenesli na mikrotiterske plošče z 12 razdelki. Te smo postavili v inkubator in jih po treh tednih uporabili za poskuse.

### **3. Simulacija možganske kapi v razmerah *in vitro***

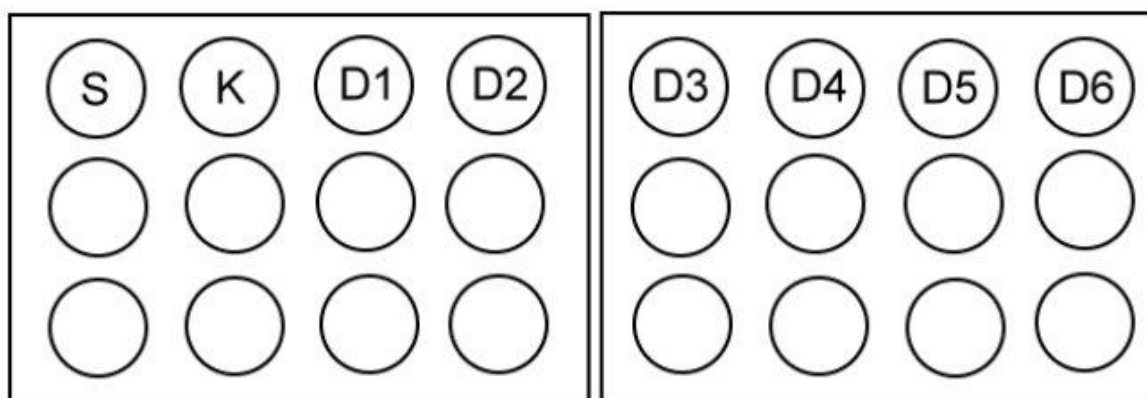
Simulacijo možganske kapi v razmerah *in vitro* smo izvedli tako, da smo celicam najprej odvzeli hranilno raztopino in jo nadomestili z DMEM brez glukoze in govejega fetalnega seruma. Nato smo jih inkubirali v mešanici 94 % N<sub>2</sub>, 0,2 % O<sub>2</sub> in 5 % CO<sub>2</sub> pri 37 °C.

Po treh ali šestih urah smo celicam zamenjali raztopino za hranilno raztopino z visoko koncentracijo glukoze in jih prestavili v inkubator s 5 % O<sub>2</sub>, ostalo zrak. V takšnih

razmerah smo jih inkubirali 21 ur pri 37 °C. Nato smo izvedli poskuse privzema in sproščanja histamina iz astrocitov.

#### 4. Privzem histamina v astrocitate ob prisotnosti tele-metil-histamina in pomanjkanju natrijevih ionov

Mikrotiterske plošče z astrociti smo vzeli iz inkubatorja bodisi po izpostavitvi 3- oziroma 6-urni hipoksiji in pomanjkanju hraniv ter reperfuziji ali brez izpostavitve. Odlili smo hranilno raztopino in prekate plošče dvakrat sprali z 1 mL pufru za privzem s kalcijem in holinijevim kloridom. Prvi stolpec na plošči s tremi paralelami smo uporabili kot slepi vzorec (slika 12). Vanj smo odmerili le po 600  $\mu\text{L}$  pufru za privzem. V drugi stolpec smo poleg 500  $\mu\text{L}$  pufru dodali še 100  $\mu\text{L}$ , 0,75  $\mu\text{M}$  izotopa histamina (radioaktivno označen histamin –  $^3\text{H}$ -histamin) s specifično aktivnostjo 12,54 Ci/mmol oziroma pri nekaterih poskusih z 10,6 Ci/mmol. V tretji stolpec in vse naslednje smo, poleg 440  $\mu\text{L}$  pufru in 100  $\mu\text{L}$  izotopa histamina, po naraščajoči koncentraciji od  $10^{-7}$  do  $10^{-4}$  M dodajali 60  $\mu\text{L}$  raztopine tele-metil-histamina, metabolita histamina. Plošče smo po dodatku pufru za privzem in tele-metil-histamina inkubirali 20 minut pri 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ , ostalo zrak. Po inkubaciji smo dodali izotop histamina in inkubirali še dodatnih 20 minut.



*Slika 12: Mikrotiterski plošči z 12 razdelki, v katerih so zasajeni astrociti. Stolpec oznake S – slepi vzorci v treh paralelah, K – kontrolni vzorci s  $^3\text{H}$ -histaminom v treh paralelah, D1 do D6 – vzorci s  $^3\text{H}$ -histaminom in naraščajočimi koncentracijami dodatka tele-metil-histamina v treh paralelah.*

Privzem smo po 20 minutah prekinili tako, da smo plošče vzeli iz inkubatorja in jih postavili na led. Nato smo prekate 4-krat sprali z 1 mL mrzlega pufru brez kalcija, saj  $\text{Ca}^{2+}$  povzroči sproščanje veziklov z nevrottransmitorjem (histaminom), ki so v manjši meri prisotni tudi v astrocitech, v zunajcelični prostor. Ta endogeni histamin bi povzročil napako pri rezultatih.

Celice smo nato denaturirali s 300  $\mu\text{L}$  0,5 M NaOH. Plošče smo prilepili na stresalnik za 10 minut pri 200 obratih na minuto. Nato smo iz vsakega prekata vzeli 250  $\mu\text{L}$  vzorca, ga vbrizgali v vialo in dodali 1500  $\mu\text{L}$  zmesi topil Aquasol (scintilacijska tekočina). Viale smo postavili v  $\beta$ -števec, ki je izmeril število  $\beta$ -razpadov radioaktivnega izotopa na minuto (priloga I) in preko enačbe (enačba 2) izračunali koncentracijo privzetega radioaktivnega histamina v astrocitech.

Iz vsakega prekata smo vzeli še 50  $\mu\text{L}$  vzorca in ga vbrizgali v epruveto. Z Bradfordovo metodo smo določili količino proteinov v vzorcih, ki so bili pokazatelji količine celic v posameznem vzorcu (priloga II, III).

Za primerjavo smo enak poskus izvedli tudi ob prisotnosti  $\text{Na}^+$  ionov, tako da smo namesto pufru za privzem s kalcijem in holinijevim kloridom uporabili normalen pufer za privzem s kalcijem.

## **5. Sproščanje histamina iz astrocitov ob prisotnosti tele-metil-histamina**

Poleg privzema histamina v astrocitech nas je zanimalo tudi, s katerimi transportnimi sistemi in v kolikšni meri se histamin po privzemu v astrocitech sprošča iz njih. V ta namen smo izvedli poskus sproščanja histamina iz astrocitov po privzemu v celice, ki niso bile izpostavljene hipoksiji in pomanjkanju hraniv.

Plošče smo vzeli iz inkubatorja (bodisi po izpostavitvi 3- oziroma 6-urni hipoksiji in pomanjkanju hraniv ter reperfuziji ali brez izpostavitve) in odlili hranilno raztopino. Prekate smo 2-krat sprali z 1 mL pufru za privzem s kalcijem. Nato smo v vsak prekat dodali ustrezen volumen pufru s kalcijem, tako da je bil končni volumen z vsemi dodatki

600  $\mu\text{L}$ . Plošče smo inkubirali 30 minut pri 37  $^{\circ}\text{C}$ , nato dodali 100  $\mu\text{L}$   $^3\text{H}$ - histamina v vse prekate razen prekatov za slepi vzorec in plošče inkubirali 20 minut pri 37  $^{\circ}\text{C}$ .

Po zaključeni inkubaciji smo vzorce 4-krat sprali z 1 mL pufru za privzem brez kalcija sobne temperature. V prekate smo ponovno dodali ustrezno količino na sobno temperaturo ogretega pufru brez kalcija, da je bil skupni končni volumen 600  $\mu\text{L}$ . Nato smo dodali 60  $\mu\text{L}$  raztopine tele-metil-histamina koncentracij od  $10^{-7}$  do  $10^{-4}$  M v ustrezne prekate. Plošče smo nato inkubirali 15 minut pri 37  $^{\circ}\text{C}$ .

Po inkubaciji smo odvzeli 500  $\mu\text{L}$  vzorca (supernatanta), preostanek tekočine smo zavrgli. V epici smo supernatantu dodali 1500  $\mu\text{L}$  scintilacijske tekočine in izmerili  $\beta$ -razpad  $^3\text{H}$ -histamina.

V prekate z astrociti smo dodali 300  $\mu\text{L}$  0,5 M NaOH in plošče pritrdili na stresalnik za 10 minut pri 200 obratih na minuto. Baza je lizirala celice in po stresanju smo iz prekatov odvzeli 250  $\mu\text{L}$  vzorca. V viali smo mu dodali 1500  $\mu\text{L}$  scintilacijske tekočine in izmerili  $\beta$ -razpad. Odvzeli smo še 50  $\mu\text{L}$  vzorca za določitev količine proteinov v vzorcu.

## 6. Izračun koncentracije privzetega ali sproščene histamina

Po izvedbi poskusov smo želeli določiti količino histamina, ki se je privzel v astrocite posameznega vzorca ali pa se je iz njih sprostil. Za namen detekcije histamina v vzorcu smo pri poskusih uporabili radioaktivno označen  $^3\text{H}$ -histamin, ki ob razpadu oddaja  $\beta$ -sevanje. Vzorcem smo dodali tudi scintilacijsko tekočino, to je zmes aromatskih topil z dodatkom scintilatorjev, za boljšo detekcijo sevanja. Scintilator je snov, ki sprejme energijo ionizirajočega sevanja in jo odda v obliki svetlobe. Tekočinski scintilacijski števec zazna svetlobo preko dveh fotopomnoževalnih celic in količino izrazi kot CPM (count per minute) oziroma kot število  $\beta$ -razpadov radioaktivnega izotopa na minuto DPM (disintegration per minute) (priloga I).

$$DPM = CPM/EFF$$

*Enačba 1: Število  $\beta$ -razpadov radioaktivnega izotopa na minuto.*



V idealnih pogojih vsakemu  $\beta$ -razpadu sledi svetlobni signal. Detektor upošteva le signale, ki dospejo do obeh fotopomnoževalnih celic, ostali se prezrejo in upoštevajo kot šum ozadja. Vrednosti DPM smo nato odšteli srednjo vrednost DPM slepega vzorca in preko enačbe 2 izračunali koncentracijo  $^3\text{H}$ -histamina v vzorcu (priloga IV).

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

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

*Enačba 2: Izračun koncentracije  $^3\text{H}$ -histamina v vzorcu.*

## 7. Bradfordova metoda določanja proteinov v vzorcu

Bradfordova metoda za določanje proteinov v vzorcu je spektrofotometrična analitična metoda. Temelji na spremembi absorbance barvila Coomassie Brilliant Blue G-250, ki v kislih pogojih po nekovalentni vezavi na proteine spremeni barvo iz rdeče v modro. Med barvilom in proteinom se tvorijo predvsem ionske in Van der Waalove vezi, ki stabilizirajo anionsko obliko barvila, ki je značilno modro obarvana. Maksimum absorbance kompleksa se nahaja pri 595 nm valovne dolžine. Porast absorbance vzorca pri 595 nm je proporcionalen količini nastalih kompleksov in torej tudi koncentraciji proteinov v vzorcu (22).

Odnos med absorbanco, debelino sloja vsebnika z raztopino, ki ga obsevamo, in koncentracijo raztopine opisuje Beer-Lambertov zakon.

$$A = d * c * \epsilon$$

*Enačba 3: Beer-Lambertov zakon, A = absorbanca, d = debelina (cm), c = koncentracija (mol/L),  $\epsilon$  = molarni absorptivni koeficient (L/mol\*cm).*

Molarni absorptivni koeficient ( $\epsilon$ ) je značilen za posamezno snov in ga določimo z merjenjem absorbance vzorca s snovjo znane koncentracije (23).

Slabost Bradfordove metode je, da je odnos med absorbanco in koncentracijo kompleksa linearen le v ozkem koncentracijskem območju (približno 0–2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), zato je bilo potrebno vzorce razredčiti pred meritvijo (22).

Vzorcem smo morali določiti količino proteinov, preko katerih smo lahko sklepali, koliko celic je posamezen vzorec vseboval. V dveh paralelah smo premešali in odpipetirali 8  $\mu\text{L}$  posameznega vzorca na mikrotitersko ploščo s 96 prekati. Nato smo vsakemu vzorcu dodali 152  $\mu\text{L}$  bidestilirane vode in 40  $\mu\text{L}$  BioRad reagenta (barvilo). Sočasno smo pripravili tudi slepi vzorec, ki je vseboval 160  $\mu\text{L}$  bidestilirane vode in 40  $\mu\text{L}$  BioRad reagenta in vzorce standardov, s končnimi volumni 200  $\mu\text{L}$  in koncentracijami: 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 1,6  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 6  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  BSA v bidestilirani vodi s 40  $\mu\text{L}$  BioRad reagenta. Prav tako smo jih nanegli v dveh paralelah na mikrotitersko ploščo, vzorce premešali in počakali 30 minut, da je reakcija stekla.

Ploščo smo nato vstavili v UV-VIS spektrofotometer in pomerili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm. Od pridobljenih vrednosti smo odšteli povprečno absorbanco slepega vzorca in podatke vnesli v računalniški program GraphPad Prism. Iz znanih koncentracij BSA in izmerjenih absorbanc standardnih vzorcev smo narisali umeritveno krivuljo in naredili linearno regresijo. Iz pridobljene premice in absorbanc vzorcev smo nato lahko izračunali koncentracije proteinov v vzorcih.

Pridobili smo podatke za koncentracijo proteinov na 8  $\mu\text{L}$  vzorca ( $\mu\text{g}$  proteinov/8  $\mu\text{L}$  vzorca), te smo preračunali na 250  $\mu\text{L}$  začetnega vzorca pri poskusu in iz dveh paralel izračunali povprečje (priloga II, III).

## 8. Analiza podatkov

Rezultat poskusov smo izrazili iz dveh pridobljenih podatkov – koncentracije  $^3\text{H}$ -histamina, določene s tekočinskim scintilacijskim števcem, in iz količine proteinov v 250  $\mu\text{L}$  vzorca, določene z Bradfordovo metodo. Rezultat je bila količina privzetega ali sproščenega  $^3\text{H}$ -histamina v astrocite kot fmol ali pmol/mg proteinov v 250  $\mu\text{L}$  vzorca

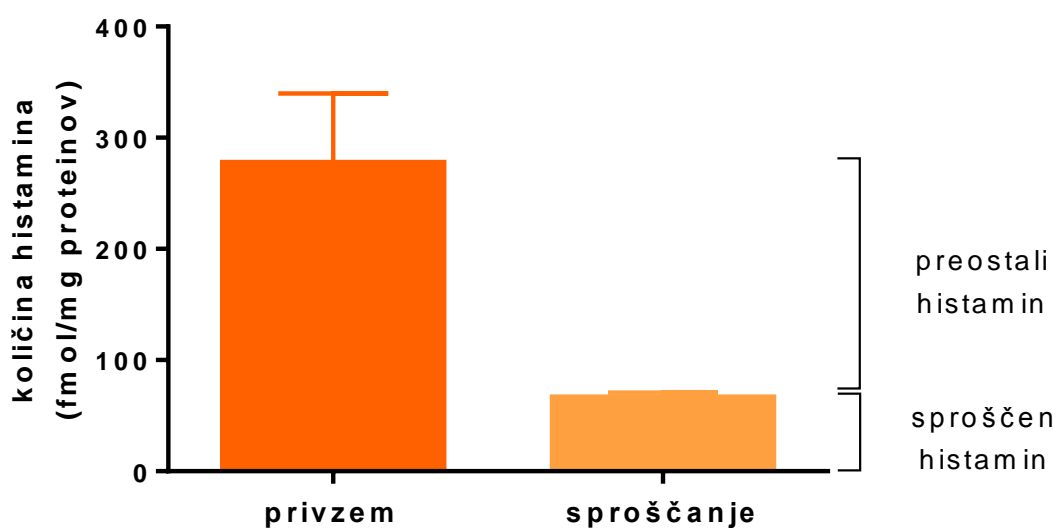
(priloga IV). Poskuse smo večkrat ponovili in vedno izvajali vsaj v treh paralelah. Prikazali smo jih kot srednjo vrednost  $\pm$  standardno napako aritmetične sredine.

V programu GraphPad Prism smo nadaljevali z analizo podatkov. Narisali smo grafe odvisnosti količine privzetega ali sproščenega histamina od koncentracije inhibitorja tele-metil-histamina. Analizirali smo tudi kontrolne vrednosti – privzem ali sproščanje histamina brez prisotnosti tele-metil-histamina. Za določanje statistično pomembnih razlik med vzorci in kontrolnimi vrednostmi poskusa smo uporabili neparni, parametrični Studentov t-test. Pri primerjavi skupin podatkov med seboj smo uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA) s sledečim Bonferronijevim primerjalnim testom. Stopnjo statistično pomembne razlike med vzorci so predstavljale vrednosti:  $p \leq 0,05$  označena z \*,  $p \leq 0,01$  označena z \*\* ali  $p \leq 0,001$  označena z \*\*\*.

## REZULTATI

### 1. Privzem in sproščanje histamina iz astrocitov

V diplomski nalogi smo opazovali lastnosti privzema (prehod iz zunajceličnega prostora v notranjost celice) in sproščanja  $^3\text{H}$ -histamina (prehajanje histamina iz notranjosti celic v zunajcelični prostor po predhodni izpostavitvi) iz primarnih kultur astrocitov. Iz slike 13 je razvidno, da se po izpostavitvi astrocitov  $125\text{ nM } ^3\text{H}$ -histamina bistveno več histamina privzame, kot sprosti iz astrocitov. Srednja vrednost količine histamina, ki se je privzela, je znašala  $277\text{ fmol/mg proteinov}$ , kar je 4,2-krat več, kot se ga je povprečno sprostito iz astrocitov. Rezultati poskusov so pokazali, da je prenos histamina v astroците dvosmeren proces, pri čemer je sproščanje bistveno manjše kot privzem.

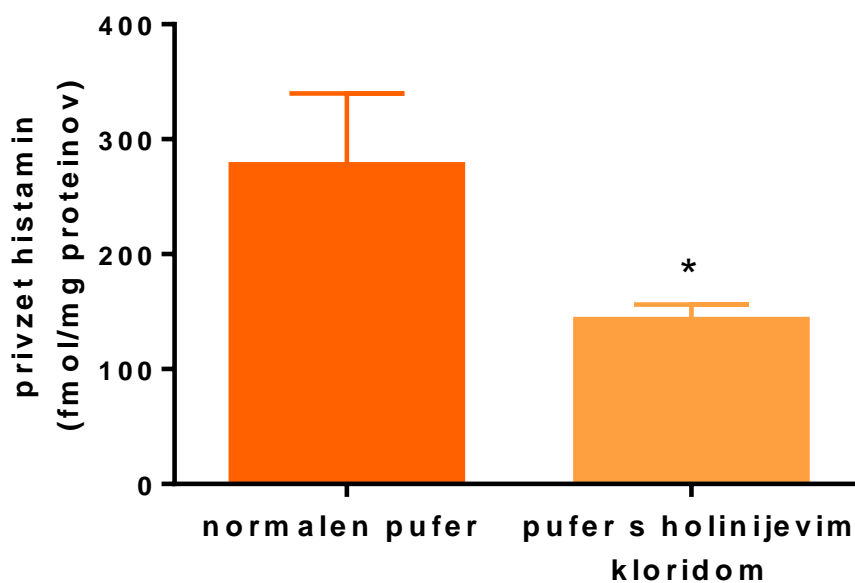


*Slika 13: Privzem in sproščanje  $^3\text{H}$ -histamina iz astrocitov v fizioloških razmerah, po izpostavitvi  $125\text{ nM } ^3\text{H}$ -histamina.*

*Rezultati so prikazani kot srednje vrednosti  $\pm$  standardne napake aritmetičnih sredin ( $n = 7$  za privzem,  $n = 6$  za sproščanje).*

## 2. Odvisnost privzema histamina v astrocite od prisotnosti natrijevih ionov

Prenos nevrotansmitorjev preko prenašalnih proteinov je navadno odvisen od gradienta natrijevih in kloridnih ionov. V ta namen smo v pufru za privzem natrijeve ione zamenjali s holinijevim kloridom, ki je ohranil enako osmolarnost in ni motil privzema. Astrocitov pri tem poskusu nismo izpostavili pomanjkanju kisika in hraniv, prav tako jim nismo dodali tele-metil-histamina. Iz rezultatov, ki so prikazani na sliki 14, je razvidno, da se v odsotnosti natrijevih ionov privzem histamina statistično pomembno zmanjša z 277 fmol/mg na 143 fmol/mg proteinov, torej za 52 %. Privzem histamina v astrocite je torej odvisen od prisotnosti  $\text{Na}^+$  ionov.

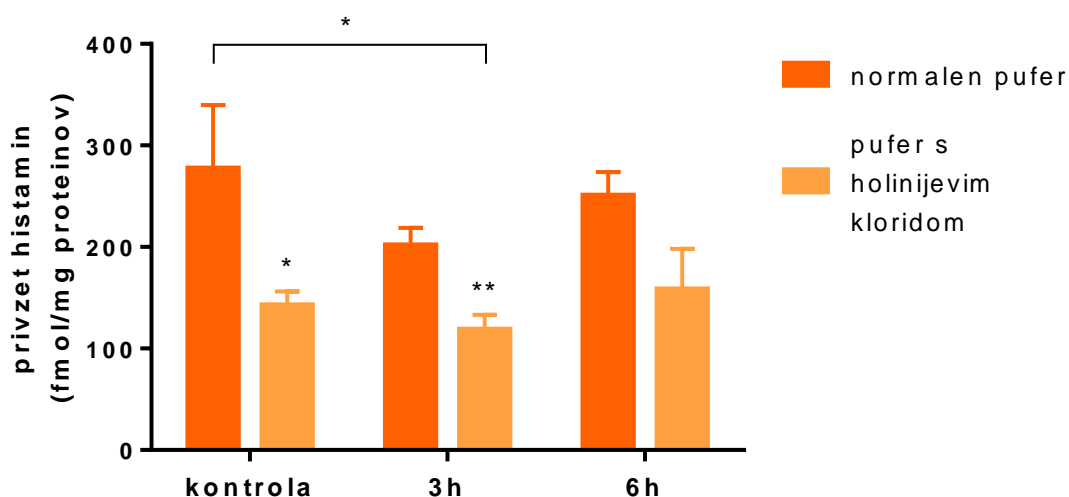


**Slika 14:** Vpliv  $\text{Na}^+$  ionov na privzem  $125 \text{ nM } ^3\text{H}$ -histamina v astrocite.

Prikazane so srednje vrednosti  $\pm$  standardne napake aritmetičnih sredin ( $n = 7$  za normalni pufer,  $n = 6$  za pufer s holinijevim kloridom). Statistično pomembno razliko smo označili z \*, kadar je  $p \leq 0,05$  (neparni, parametrični Studentov t-test).

### 3. Privzem histamina v astrocite ob pomanjkanju kisika in hraniv

Poleg vpliva prisotnosti  $\text{Na}^+$  ionov na lastnosti privzema histamina v astrocite nas je zanimal vpliv pomanjkanja kisika in hraniv na privzemanje in sproščanje histamina iz astrocitov. Odločili smo se uporabiti eksperimentalne pogoje, ki ponazarjajo posledice 3- ali 6-urne možganske kapi. Zanimal nas je vpliv celičnih okvar, povzročenih s pomanjkanjem kisika in hraniv, na lastnosti prenosa histamina v astrocite in iz njih.



**Slika 15:** Vpliv pomanjkanja  $\text{Na}^+$  ionov na privzem  $125 \text{ nM } ^3\text{H}$ -histamina v astrocite v kontrolnih razmerah ter po 3- in 6-urni hipoksiji in pomanjkanju hraniv.

Prikazane so srednje vrednosti  $\pm$  standardne napake aritmetičnih sredin ( $n = 7$  za normalni pufer,  $n = 6$  za pufer s holinijevim kloridom). Statistično pomembne razlike smo označili z \*, kadar je  $p \leq 0,05$ , \*\*, kadar je  $p \leq 0,01$  (neparni, parametrični Studentov  $t$ -test, enosmerna ANOVA in Bonferronijev post-test).

Iz slike 15 je razvidno, da izpostavitve astrocitov 3- in 6-urnemu pomanjkanju kisika in hraniv povzroči zmanjšan privzem histamina v astrocite, vendar zmanjšanje ni statistično pomembno. Iz slike 15 razberemo, da se privzem histamina po 3-urni hipoksiji zmanjša z 277 na 202 fmol/mg proteinov, torej kar za 27 %. Pri 6-urni hipoksiji lahko opazimo, da se

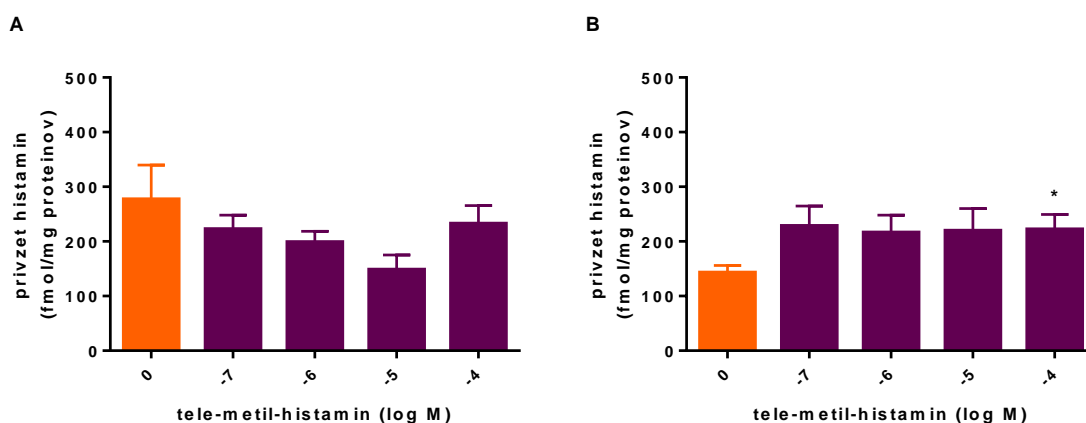
privzem histamina zmanjša le za 9 %. Zanimivo je, da je po 3 urah pomanjkanja kisika in hraniv še vedno prisotna statistično pomembna odvisnost privzema od natrijevih ionov, medtem ko 6-urna ishemija povzroči, da ne prihaja do razlik med privzemom histamina, ki je odvisen od natrijevih ionov in privzemom, ki poteka v odsotnosti natrijevih ionov.

Po dolgotrajni izpostavljenosti pomanjkanju kisika in hraniv pride do nepovratnih poškodb celične membrane. Ta postane bolj prepustna za snovi, tudi nabite molekule, ki lahko prehajajo čez lipidni dvosloj celice pasivno – z olajšano difuzijo ali celo z navadno difuzijo neodvisno od prenašalnih proteinov.

#### 4. Vpliv tele-metil-histamina na privzem histamina v astrocite

Tele-metil-histamin je metabolit histamina, ki nastaja v astrocitih. V nadaljevanju raziskovalnega dela nas je zanimalo, ali tele-metil-histamin za prehajanje preko celične membrane uporablja isti prenašalni sistem kot histamin. Izvedli smo poskuse s sledečimi pogoji:

##### A) kontrolne razmere

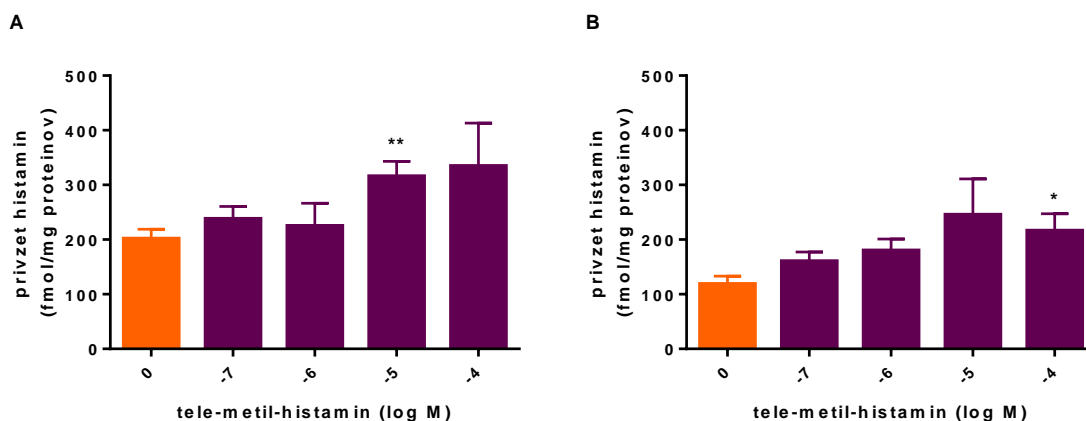


**Slika 16:** Vpliv tele-metil-histamina na od natrijevih ionov odvisen (A) in neodvisen (B) privzem  $125\text{ nM } ^3\text{H}$ -histamina v astrocite.

Prikazane so srednje vrednosti  $\pm$  standardne napake aritmetičnih sredin ( $n = 7$  pri kontroli,  $n = 9$  pri vzorcih s tele-metil-histaminom).

Slika 16A kaže, da tele-metil-histamin ne vpliva pomembno na privzem histamina v astrocite ob prisotnosti natrijevih ionov, medtem ko največja uporabljena koncentracija tele-metil-histamina ( $10^{-4}$  M) statistično pomembno poveča ( $p \leq 0,05$ ) od natrijevih ionov neodvisen privzem histamina v astrocite (slika 16B).

### B) 3-urna hipoksija in pomanjkanje hraniv



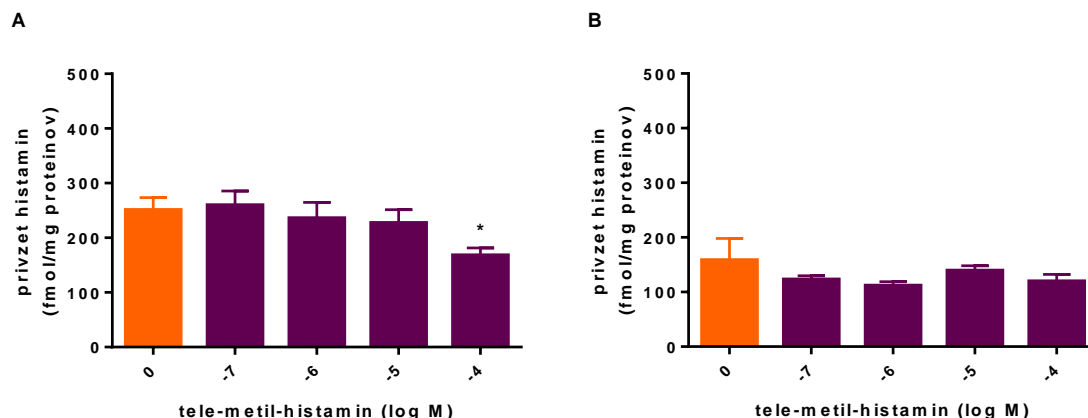
**Slika 17:** Vpliv tele-metil-histamina in 3-urne ishemije na od natrijevih ionov odvisen (A) in neodvisen (B) privzem  $125 \text{ nM } ^3\text{H}$ -histamina v astrocite.

Prikazane so srednje vrednosti  $\pm$  standardne napake aritmetičnih sredin ( $n = 6$  pri kontroli,  $n = 6$  pri vzorcih s tele-metil-histaminom).

Sliki 17A in 17B kažeta, da tele-metil-histamin v večjih koncentracijah pomembno poveča od natrijevih ionov odvisni kot tudi neodvisni privzem histamina v astrocite. Prav tako je razvidno, da pomanjkanje  $\text{Na}^+$  ionov zmanjša celokupni privzem histamina, kar ponovno potrjuje našo predpostavko, da je prenos histamina od  $\text{Na}^+$  odvisen proces.



### C) 6-urna hipoksija in pomanjkanje hraniv



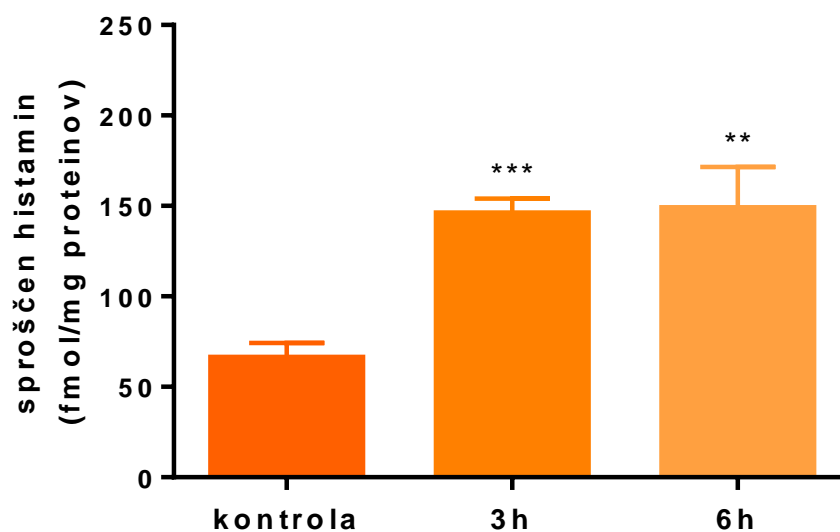
**Slika 18:** Vpliv tele-metil-histamina in 6-urne ishemije na od natrijevih ionov odvisen (A) in neodvisen (B) privzem  $125 \text{ nM } ^3\text{H}$ -histamina v astroците.

Prikazane so srednje vrednosti  $\pm$  standardne napake aritmetičnih sredin ( $n = 9$  pri kontroli,  $n = 9$  pri vzorcih s tele-metil-histaminom).

Slika 18A kaže, da tele-metil-histamin v večjih koncentracijah značilno zmanjša od natrijevih ionov odvisni privzem histamina v astroците, medtem ko ne vpliva na od natrijevih ionov neodvisni privzem histamina v astroците (slika 18B).

## 5. Vpliv tele-metil-histamina na sproščanje histamina iz astrocitov

Poleg privzemanja histamina v astroците nas je zanimalo tudi, ali obstaja krožna pot, v sklopu katere se po privzemu histamin iz astrocita tudi sprošča v sinaptično špranjo in se tako lahko ponovno uporabi pri sintezi histamina v presinaptičnem nevronu. Ni znano, ali uporablja histamin enak prenašalni protein za sproščanje kot tudi za privzem. Prav tako ni znano, ali se iz astrocitov sprošča v večji meri histamin ali njegov metabolit tele-metil-histamin. V nadaljnjih poskusih nas je zanimalo, kako tele-metil-histamin vpliva na sproščanje histamina.

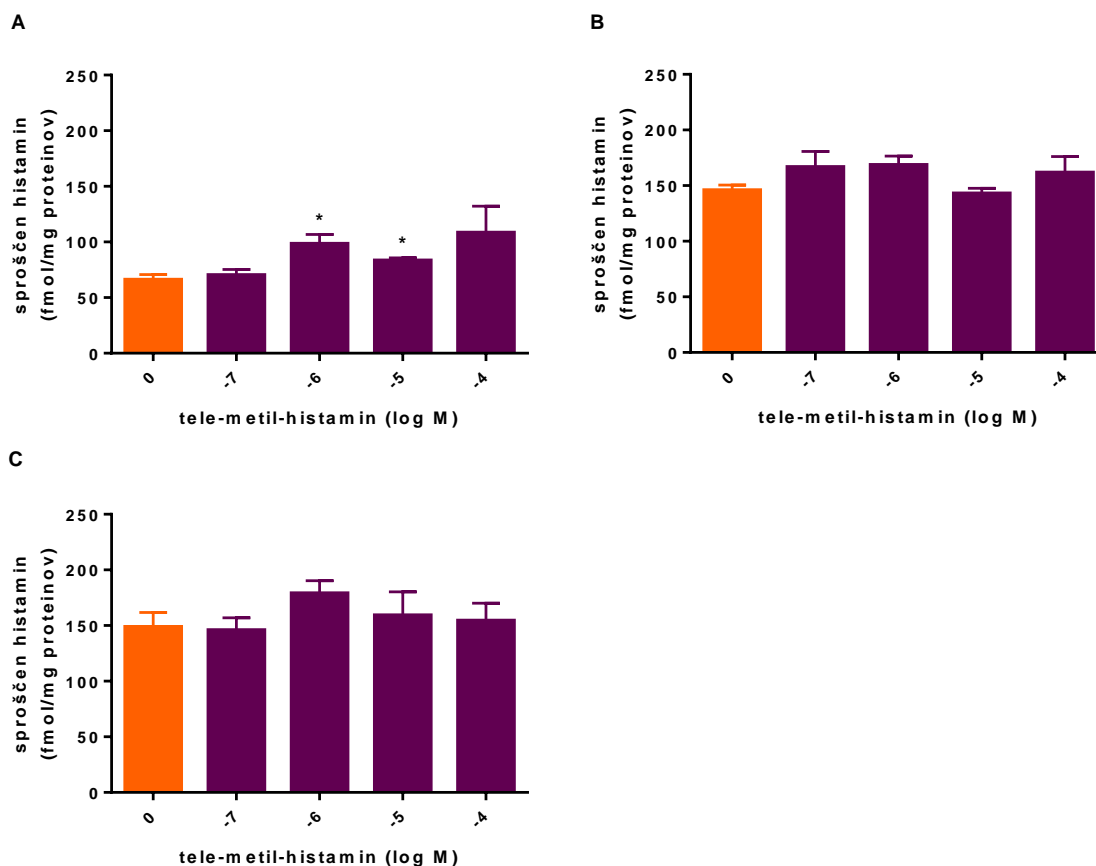


*Slika 19: Sproščanje <sup>3</sup>H-histamina iz astrocitov po izpostavitvi 125 nM <sup>3</sup>H-histamina v fizioloških razmerah ter po 3- ali 6-urni ishemiji.*

*Rezultati so prikazani kot srednje vrednosti  $\pm$  standardne napake aritmetičnih sredin ( $n = 3$  pri kontroli, 3- in 6-urni ishemiji). Statistično pomembne razlike smo označili z \*\*, kadar je  $p \leq 0,01$  in \*\*\*, kadar je  $p \leq 0,001$  (neparni, parametrični Studentov t-test).*

Iz slike 19 lahko opazimo, da prihaja do sprememb v sproščanju, če astroците izpostavimo pomanjkanju kisika in hraniv. Statistično pomembno se sproščanje histamina poveča po 3-urni izpostavitvi astrocitov ishemiji ( $p \leq 0,001$ ), prav tako se sproščanje značilno poveča po 6-urni ishemiji ( $p \leq 0,01$ ).

Izračunali smo, da se po 3-urni ishemiji iz astrocitov sprostijo kar 56 % celotnega privzetega histamina. Torej več kot se ga sprosti v normalnih pogojih (v našem primeru le 30 % celotne privzete količine histamina). Tudi po 6-urni ishemiji prihaja do večjega sproščanja histamina iz astrocitov. V našem primeru se je sprostilo 54 % celotnega privzetega histamina.



**Slika 20:** Količina sproščenega  $^3\text{H}$ -histamina v kontrolnih razmerah (A) ter po predhodni izpostavitvi astrocitov 3-urni (B) ali 6-urni (C) ishemiji,  $125\text{ nM}$   $^3\text{H}$ -histamina in tele-metil-histaminu.

Prikazane so srednje vrednosti  $\pm$  standardne napake aritmetičnih sredin ( $n = 3$  pri vseh kontrolah,  $n = 6$  pri vzorcih s tele-metil-histaminom).

Iz slike 20A je razvidno, da tele-metil-histamin poveča sproščanje histamina iz astrocitov v fizioloških razmerah. Pri koncentraciji tele-metil-histamina  $10^{-5}\text{ M}$  in  $10^{-6}\text{ M}$  se sprosti statistično pomembno ( $p \leq 0,05$ ) več histamina v primerjavi s kontrolno vrednostjo. Po 3-urni (slika 20B), oziroma 6-urni ishemiji in reperfuziji (slika 20C) takšnega učinka tele-metil-histamina nismo izmerili.

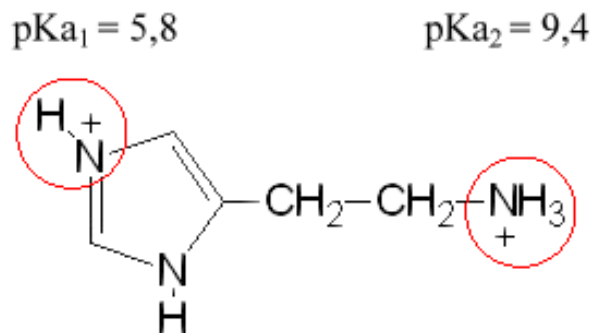
## RAZPRAVA

Živčni prenašalec se mora po vezavi na receptor v sinaptični špranji čim hitreje inaktivirati. Tako se prepreči prekomerna stimulacija postsinaptičnega nevrona, ki lahko vodi do nepovratnih poškodb živčnih celic. Inaktivacija lahko poteka na različne načine: preko ponovnega privzema v presinaptični nevron, z encimsko razgradnjo, z difuzijo v okoliški zunajcelični prostor ali s privzemom v živčno oporno tkivo.

Živčno oporno tkivo, ki obdaja nevrone in njihove sinapse, nudi živčevju strukturno oporo, izolacijo, ga oskrbuje z energijo, pomaga pri presnavljanju snovi in skrbi za ohranjanje konstantnega mikrookolja. V centralnem živčnem sistemu so med celicami živčnega opornega tkiva za slednjo funkcijo zadolženi predvsem astrociti. Gradijo tridelno sinapso, v kateri pomagajo pri čim hitrejšem odstranjevanju živčnih prenašalcev in prebitnih kalijevih ionov iz sinaptične špranje. Pomembno vlogo imajo tudi ob možganski kapi. Za razliko od nevronov imajo astrociti zaloge celične energije v obliki glikogena. Te zaloge lahko uporabijo ob pomanjkanju dotoka krvi in z njo kisika ter hraniv pri možganski kapi. Energetske zaloge uporabijo za ohranjanje ionskega gradienta in s tem ustreznega delovanja prenašalnih proteinov med ishemijo.

Astrociti na svoji membrani izražajo številne prenašalne proteine. Med drugimi tudi prenašalne proteine za živčne prenašalce, na primer noradrenalin (NET), serotonin (SERT), dopamin (DAT), glutamat (EAAT 1-5), glicin (GLYT) in GABO (GAT) (12). Vemo tudi, da astrociti v večji meri kot nevroni privzemajo histamin, vendar specifičnega prenašalnega proteina še ne poznamo (24).

Histamin je biogeni amin, ki v centralnem živčnem sistemu deluje kot eden izmed živčnih prenašalcev. Po vezavi na receptor se inaktivira z difuzijo iz sinapse ali pa s privzemom v astrocit. Znotraj astrocita se nahaja encim histamin-N-metil-transferaza, ki razgradi histamin do tele-metil-histamina (24). Histamin je pri fiziološkem pH-ju pozitivno nabita molekula ( $pK_{a1} = 5,8$   $pK_{a2} = 9,4$ ) (slika 21) (18). Nabite molekule ne morejo prosto prehajati lipidnega dvosloja celične membrane. Zato potrebuje histamin prenašalni protein, da se lahko privzame v astrocit. Privzem lahko poteka brez porabe energije – pasivno z olajšano difuzijo preko prenašalnega proteina – ali aktivno, v odvisnosti od energije, prisotnosti  $Na^+$  ionov in aktivnosti  $Na^+/K^+$ -ATP-aze. Na enak način se lahko histamin tudi sprošča iz astrocita.



*Slika 21: Histamin v obliki diprotonirane molekule.*

Ker so nas zanimalo lastnosti prenašalnega proteina in s tem prenosa histamina v astrocit in iz njega, smo za ta namen poskuse izvajali tudi ob prisotnosti tele-metil-histamina. Želeli smo oceniti, ali TMH izraža afiniteto do prenašalnih proteinov in s tem moti prenos histamina v astrocit in iz njega. Da bi ugotovili, v kolikšni meri prenos histamina poteka preko aktivnega, energetskega potratnega prenosa, smo ustvarili hipoksične pogoje in odtegnili celicam hranilne snovi. Zanimalo nas je tudi, ali privzem histamina poteka skupaj z  $\text{Na}^+$  ioni, zato smo poskuse izvajali tudi v odsotnosti  $\text{Na}^+$  ionov in jih zamenjali s holinijevim kloridom.

Izkazalo se je, da pomanjkanje kisika in hraniv močno vpliva na lastnosti prenosa histamina v astrocite. Odločili smo se uporabiti eksperimentalne pogoje, ki ponazarjajo posledice 3- ali 6-urne možganske kapi. Iz kliničnih študij in prakse je znano, da lahko v veliki meri zmanjšamo posledice možganske kapi, če ukrepamo znotraj treh ur od nastopa simptomov (1). Po tem časovnem intervalu lahko že nastopijo nepovratne okvare možganov (1).

Po 3-urni ishemiji se je privzem histamina statistično pomembno zmanjšal za 27 % (slika 15). Spremembo lahko pripišemo okvari  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  črpalke, ki skrbi za ohranjanje fiziološkega osmotskega gradienta. Porušen osmotski gradient vpliva na delovanje drugih prenašalnih proteinov, ki aktivno prenašajo molekule, ione v celico ali iz nje. Med njimi tudi na prenašalni protein za histamin.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  črpalka s pomočjo energije, pridobljene iz molekule ATP, črpa  $\text{Na}^+$  ione iz celice in hkrati  $\text{K}^+$  ione v celico, torej v nasprotni smeri osmotskega gradienta. Ob izpostavitvi astrocitov hipoksiji in pomanjkanju hraniv se v

celici hitro porabijo zaloge molekul ATP, nove molekule pa se zaradi pomanjkanja kisika in predvsem glukoze ne morejo sintetizirati. Aktivni prenos snovi odpove in tako, se poruši notranje in zunanje okolje celice.

Pri 6-urni hipoksiji se je privzem histamina zmanjšal le za 9 % (slika 15). Po dolgotrajnem pomanjkanju kisika in hraniv pride v celici do nepovratnih poškodb celične membrane. Membrana postane bolj prepustna za snovi, tudi nabite molekule, kot je histamin. Privzem histamina se kljub odpovedi  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  črpalke le malo zmanjša, ker lahko histamin lipidni dvosloj celične membrane prehaja pasivno z olajšano difuzijo in celo z navadno difuzijo. Zaključimo lahko, da se histamin pri fizioloških pogojih privzema z aktivnim prenosom, odvisnim od delovanja  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-aze, kisika in hraniv.

Pričakovano se je izkazalo tudi, da na privzem histamina v astrocite močno vpliva odsotnost  $\text{Na}^+$  ionov v zunajcelični tekočini. Privzem se je zmanjšal za 52 % (slika 14), kar kaže na to, da se s pomočjo aktivnega prenosa prenese v astrocite dobra polovica vsega histamina. Aktivni prenos histamina pa je odvisen od prisotnosti  $\text{Na}^+$  ionov in delovanja  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  črpalke, ki uravnava koncentracijo zunajceličnih  $\text{Na}^+$  ionov in vzdržuje njihov osmotski gradient.

Ker še ne poznamo lastnosti selektivnega prenašalnega proteina, ki aktivno privzema histamin v astrocite, smo želeli preveriti, ali se na isti prenašalni protein veže tudi njegov metabolit tele-metil-histamin in tako ovira privzem oziroma sproščanje histamina iz astrocitov. V normalnih razmerah ni prišlo do statistično pomembnih sprememb v privzemu histamina v astrocite ob dodatku TMH (slika 16A). Ob hkratnem pomanjkanju  $\text{Na}^+$  ionov se je privzem celo povečal (slika 16B). Sklepamo lahko, da se TMH ne veže z veliko afiniteto oziroma se sploh ne veže na prenašalni protein za histamin in ne ovira privzema histamina. Povečan privzem histamina pod vplivom TMH bi lahko bil posledica napake pri poskusu.

Opazovali smo tudi vpliv TMH na privzem histamina v astrocite ob 3- ali 6-urni ishemiji, kjer TMH prav tako ni statistično pomembno zmanjšal privzema histamina, pri 3-urni ishemiji se je privzem celo povečal (slika 17). 3-urna hipoksija je lahko povzročila zmerno okvaro celičnih membran, kar se je odrazilo v večjem sproščanju histamina iz celic in povečanem privzemu ob prisotnosti TMH.

TMH prav tako ne moti sproščanja histamina iz astrocitov, saj se ob njegovi prisotnosti v normalnih in ishemičnih pogojih sprosti celo več histamina (slika 20). Sklepamo lahko, da TMH nima velike afinitete do prenašalnih proteinov za histamin in ne moti privzema ali sproščanja histamina iz astrocitov.

Dokazali smo tudi, da je prenos histamina dvosmeren proces. Sproščanje histamina iz astrocitov poteka v manjši meri kot privzem. V našem primeru se je sprostilo kar 4,2-krat manj histamina, kot se ga je povprečno privzelo (slika 13). Histamin se iz astrocitov lahko sprosti preko prenašalnih proteinov, kadar je mirovna koncentracija v sinaptični špranji nizka, v manjši meri pa se lahko iz astrocitov sprosti iz veziklov ob prisotnosti akcijskega potenciala in  $\text{Ca}^{2+}$  ionov. Ker smo pri poskusih sproščanja uporabljali pufer brez  $\text{Ca}^{2+}$  ionov, smo lahko opazovali samo sproščanje, ki je potekalo preko prenašalnih proteinov. Ker se je sproščanje po 3- in 6-urni hipoksiji povečalo s 30 % (slika 20A) na malo več kot 54 % (slika 20B in 20C), lahko sklepamo, da se histamin v večji meri sprošča iz astrocitov preko pasivnega prenosa z olajšano difuzijo.

Astroцити uravnavajo količino histamina v sinaptični špranji tako, da se ta privzema v astrocite, ko je v sinapsi prisoten v prebitku, torej takoj za proženjem akcijskega potenciala. Iz astrocitov pa se sprošča, kadar je mirovna koncentracija histamina v sinapsi majhna. Na ta način aktivno sodelujejo pri prenosu informacij v sinapsi, ščitijo živčne celice pred prevelikimi odkloni v koncentraciji živčnega prenašalca v sinapsi in tako preprečijo celične poškodbe.

## SKLEP

Zaključimo lahko, da v fizioloških razmerah privzem histamina v astrocite poteka pasivno z olajšano difuzijo in aktivno preko prenašalnih proteinov. Na privzem histamina v astrocite vpliva osmotski gradient, prisotnost zunajceličnih  $\text{Na}^+$  in aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-aze. Tele-metil-histamin ne vpliva na selektiven prenos histamina v celice ali iz njih, saj se na prenašalni protein za histamin ne veže z veliko afiniteto in bistveno ne vpliva na količino privzetega ali sproščenega histamina.

Po izpostavitvi 3- ali 6-urni ishemiji  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  črpalka nima več vpliva na privzem histamina. Privzem po izpostavitvi daljši ishemiji poteka neselektivno, pasivno – z olajšano in navadno difuzijo zaradi funkcionalne poškodbe astrocitov in izgube integritete membrane.

Prenos histamina v astrocite je dvosmeren proces, pri čemer sproščanje poteka v manjši meri kot privzem. Sproščanje histamina iz astrocitov je osmotsko uravnano in poteka predvsem pasivno z olajšano difuzijo.

Ob teh ugotovitvah lahko potrdimo delovno hipotezo številka 1, ostale lahko zavrnamo.

- 1) Privzem histamina v astrocite je dvosmeren, od  $\text{Na}^+$  odvisen proces. Če  $\text{Na}^+$  ione odstranimo iz pufra za privzem in jih nadomestimo s holinijevim kloridom, se privzem  $^3\text{H}$ -histamina zmanjša. Histamin se privzema v astrocite in v manjši meri tudi sprošča iz njih. Hipotezo lahko potrdimo.
- 2) Metabolit tele-metil-histamin ne zmanjša privzema  $^3\text{H}$ -histamina v astrocite, prav tako ne zmanjša sproščanja  $^3\text{H}$ -histamina v normalnih razmerah. Hipotezo zavrnamo.
- 3) Po izpostavitvi astrocitov pomanjkanju kisika in hraniv se privzem  $^3\text{H}$ -histamina sprva zmanjša zaradi okvare aktivnega prenosa snovi v celico. Kasneje pa se celo poveča zaradi poškodb celične membrane, kar omogoči nemoten pretok snovi v celico in iz nje. Prav tako se poveča sproščanje  $^3\text{H}$ -histamina iz astrocitov. Hipotezo zavrnamo.
- 4) Metabolit tele-metil-histamin ne zmanjša privzema ali sproščanja  $^3\text{H}$ -histamina iz astrocitov po izpostavitvi pomanjkanju kisika in hraniv. Hipotezo zavrnamo.

Da bi še boljše opisali lastnosti prenosa histamina v astrocite, afiniteto in kapaciteto prenašalca, bi raziskovanje lahko nadaljevali s poskusi inhibicije prenosa histamina v astrocite ob prisotnosti drugih nevrotansmitorjev.



## LITERATURA IN VIRI

1. Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC. *Molecular Neuropharmacology, A Foundation for Clinical Neuroscience*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: McGraw Hill; 2009: 16–268.
2. Squire L, Berg D, Bloom FE, Du Lac S, Ghosh A, Spitzer NC. *Fundamental Neuroscience*. 3<sup>rd</sup> ed. Burlington – San Diego – London: Elsevier Academic Press; 2008: 15–287, 717–29.
3. Siegel GJ, Albers WR, Brady ST, Price DL, editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 7<sup>th</sup> ed. Burlington – San Diego – London: Elsevier Academic Press; 2006: 3–111, 165–333.
4. Kandel E, Schwartz J, Jessell T, Siegelbaum S, Hudspeth AJ. *Principles of Neural Sciences*. 5<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill; 2012: 5–21, 71–337.
5. Kržan M. *Funkcija astrocitov*. Zdr Vest 2001; 70: 553–9.
6. Rafalowska U, Waskiewicz J, Albrecht J. *Is neurotransmitter histamine predominantly inactivated in astrocytes?* Neurosci Lett 1987, 80(1): 106–10.
7. Allen NJ, Barres BA. *Neuroscience: Glia - more than just brain glue*. Nature 2009; 457(7230): 675–7.
8. Greenstein B, Greenstein A. *Color Atlas of Neuroscience: Neuroanatomy and Neurophysiology*. Stuttgart: Thieme; 2000: 2–6, 48–54, 72–8, 86–98, 292–316.
9. Passani MB, Giannoni P, Bucherelli C, Baldi E, Blandina P. *Histamine in the brain: Beyond sleep and memory*. Biochem Pharmacol 2007; 73(8): 1113–22.
10. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. *Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view*. Trends Neurosci 1999; 22(9): 391–7.
11. Zorec R. *Možganska kap*. V: Ribarič S, urednik. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. Deveta izdaja. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2001: 297–304.
12. Perdan K, Lipnik-Štangelj M, Kržan M. *The Impact of Astrocytes in the Clearance of Neurotransmitters by Uptake and Inactivation*. In: Leitmannova Liu A, editor. *Advances in planar lipid bilayers and liposomes*. Amsterdam (etc.): Elsevier Academic Press; 2009, 9: 211–35.
13. Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA. *The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins: Introduction*. Pflugers Arch 2004; 447(5): 465–8.

14. Betsuyaku S, Haramoto Y, Ishiura S, Oma Y, Sakai M, Sasagawa N, Sekine K, Shibasaki Y, Takahashi S, Tsuji S, Yanagimoto S. *Introduction to Life Science* [internet]. 2010. [http://csls-text2.c.u-tokyo.ac.jp/inactive/06\\_04.html](http://csls-text2.c.u-tokyo.ac.jp/inactive/06_04.html) [4. 10. 2012]
15. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. *Rang & Dale's Pharmacology*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2007: 210-360, 471-3.
16. Huszti Z, Imrik P, Madarasz E. [<sup>3</sup>H]-histamine uptake and release by astrocytes from rat brain: effects of sodium deprivation, high potassium, and potassium channel blockers. *Neurochem Res* 1994; 19(10): 1249-56.
17. Ogasawara M, Yamauchi K, Satoh Y, Yamaji R, Inui K, Jonker JW, Schinkel AH, Maeyama K. *Recent advances in molecular pharmacology of the histamine systems: organic cation transporters as a histamine transporter and histamine metabolism*. *J Pharmacol Sci* 2006, 101(1): 24-30.
18. Lemke TL, Williams DA, Roche VF, Zito WS. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 7<sup>th</sup> ed. Baltimore – Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2012: 106-210, 263-83, 397-419, 1046-71.
19. Barnes WG, Hough LB. *Membrane-bound histamine N-methyltransferase in mouse brain: possible role in the synaptic inactivation of neuronal histamine*. *J Neurochem* 2002; 82(5): 1262-71.
20. Wollin A, Wang X, Tso P. *Nutrients regulate diamine oxidase release from intestinal mucosa*. *Am J Physiol* 1998; 275(4 Pt 2), R969-75.
21. 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.
22. Noble JE, Bailey MJA. *Quantitation of Protein*. In: Burgess RR, Murray PD, editors. *Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification*. 2<sup>nd</sup> ed. Burlington – San Diego – London: Elsevier Academic Press; 2009: 463: 73-94.
23. Breznik M, Kmetec V, Kranjc A, Kreft S, Kristl A, Osredkar J, Peterlin-Mašič L, Planinšek O, Pukl M, Urleb U, Zega A, Kikelj D. *Vaje iz instrumentalne farmacevtske analize*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2003.
24. Osredkar D, Burnik-Papler T, Pecaver B, Kralj-Iglic V, Krzan M. *Kinetic and pharmacological properties of [<sup>3</sup>H]-histamine transport into cultured type 1 astrocytes from neonatal rats*. *Inflamm Res* 2009; 58(2): 94-102.
25. *Meninges* [internet]. <http://en.wikipedia.org/wiki/Meninges> [8. 12. 2012]
26. *Human brain* [internet]. [http://en.wikipedia.org/wiki/Human\\_brain](http://en.wikipedia.org/wiki/Human_brain) [8. 12. 2012]

## PRILOGE

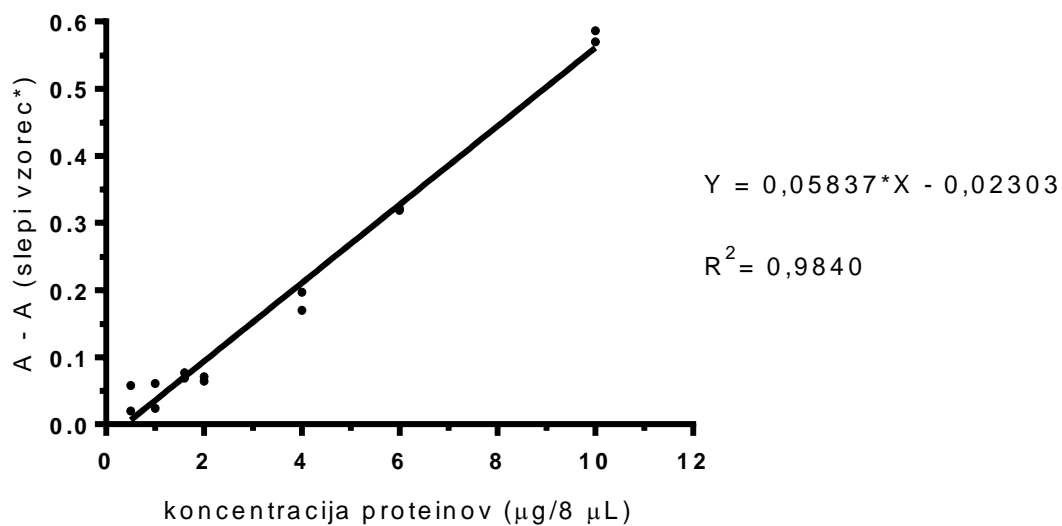
**PRILOGA I:** Primer izpisa rezultatov meritev  $\beta$ -sevanja s tekočinskim scintilacijskim števcem.

VZOREC	PUFER	DODATEK UČINKOVIN	CPM	DPM	EFF
1	NORMALEN PUFER	slepi vzorec	27	1	49,502
2			25	1	39,479
3			28	1	34,731
4		0,125 $\mu$ M $^3$ H-histamin	425	1525	0,279
5			348	1293	0,269
6			123	355	0,346
7		10 <sup>-7</sup> M TMH + 0,125 $\mu$ M $^3$ H-histamin	517	2006	0,258
8			261	801	0,325
9			413	1646	0,251
10		10 <sup>-6</sup> M TMH + 0,125 $\mu$ M $^3$ H-histamin	486	1941	0,250
11			405	1526	0,266
12			512	2124	0,241
13		10 <sup>-5</sup> M TMH + 0,125 $\mu$ M $^3$ H-histamin	133	352	0,379
14			386	1428	0,270
15			139	399	0,348
16		10 <sup>-4</sup> M TMH + 0,125 $\mu$ M $^3$ H-histamin	425	1675	0,254
17			379	1464	0,259
18			486	1712	0,284
19	PUFER S HOLINIJEVIM KLORIDOM	slepi vzorec	25	0	66,872
20			25	1	42,546
21			29	1	32,852
22		0,125 $\mu$ M $^3$ H-histamin	332	1266	0,262
23			419	1697	0,247
24			403	1491	0,271
25		10 <sup>-7</sup> M TMH + 0,125 $\mu$ M $^3$ H-histamin	115	316	0,364
26			487	1940	0,251
27			515	2158	0,239
28		10 <sup>-6</sup> M TMH + 0,125 $\mu$ M $^3$ H-histamin	518	1825	0,284
29			360	1340	0,269
30			440	1711	0,257
31		10 <sup>-5</sup> M TMH + 0,125 $\mu$ M $^3$ H-histamin	304	1125	0,271
32			343	1201	0,286
33			305	1082	0,282
34		10 <sup>-4</sup> M TMH + 0,125 $\mu$ M $^3$ H-histamin	571	2107	0,271
35			491	1972	0,249
36			407	1610	0,253

*Poskus smo izvedli v normalnih razmerah, v normalnem pufru oziroma v pufru s holinijevim kloridom.*

**PRILOGA II:** Primer priprave podatkov za izris umeritvene krivulje.

	c ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	A	A (slepi vzorec*)	A - A (slepi vzorec*)
<b>VZORCI STANDARDOV</b>	0	0,302	} 0,317	
		0,332		
	0,5	0,337		0,020
		0,375		0,058
	1	0,378		0,061
		0,341		0,024
	1,6	0,394		0,077
		0,386		0,069
	2	0,381		0,064
		0,388		0,071
	4	0,487		0,170
		0,514		0,197
	6	0,636		0,319
		0,639		0,322
	10	0,903		0,586
		0,887		0,570



**PRILOGA III:** Primer izračuna koncentracije proteinov v vzorcu iz izmerjenih absorbanc.

		vzorec	A	A - A (slepi vzorec*)	c1 ( $\mu\text{g}/8 \mu\text{L}$ )	c2 ( $\mu\text{g}/250 \mu\text{L}$ )	(c2'+c2'')/2
	slepi vzorec	1	0,478	0,161	3,1525	98,5172	96,3758
			0,470	0,153	3,0155	94,2345	
		2	0,929	0,612	10,8786	339,9547	339,9547
			0,929	0,612	10,8786	339,9547	
		3	0,926	0,609	10,8272	338,3488	349,3231
			0,967	0,650	11,5295	360,2975	
	0,125 $\mu\text{M}$ $^3\text{H}$ -histamin	4	0,928	0,611	10,8614	339,4194	345,0403
			0,949	0,632	11,2212	350,6613	
		5	0,930	0,613	10,8957	340,4900	346,1111
			0,951	0,634	11,2554	351,7322	
		6	0,557	0,240	4,5059	140,8089	147,7683
			0,583	0,266	4,9513	154,7277	
	10 <sup>-7</sup> M TMH + 0,125 $\mu\text{M}$ $^3\text{H}$ -histamin	7	0,869	0,552	9,8507	307,8343	319,8795
			0,914	0,597	10,6216	331,9247	
		8	0,574	0,257	4,7971	149,9096	123,6781
			0,476	0,159	3,1183	97,4465	
		9	0,963	0,646	11,4610	358,1563	361,3683
			0,975	0,658	11,6666	364,5803	
10 <sup>-6</sup> M TMH + 0,125 $\mu\text{M}$ $^3\text{H}$ -histamin	10	0,950	0,633	11,2383	351,1969	356,2825	
		0,969	0,652	11,5638	361,3681		
	11	0,948	0,631	11,2040	350,1259	337,0102	
		0,899	0,582	10,3646	323,8944		
12	1,005	0,688	12,1805	380,6403	392,4178		
	1,049	0,732	12,9343	404,1953			
10 <sup>-5</sup> M TMH + 0,125 $\mu\text{M}$ $^3\text{H}$ -histamin	13	0,527	0,210	3,9920	124,7487	125,2841	
		0,529	0,212	4,0262	125,8194		
	14	0,892	0,575	10,2447	320,1472	313,4554	
		0,867	0,550	9,8164	306,7637		
15	0,546	0,229	4,3174	134,9202	133,5818		
	0,541	0,224	4,2318	132,2435			
10 <sup>-4</sup> M TMH + 0,125 $\mu\text{M}$ $^3\text{H}$ -histamin	16	1,007	0,690	12,2148	381,7109	364,5802	
		0,943	0,626	11,1184	347,4494		
	17	0,935	0,618	10,9813	343,1666	352,2673	
		0,969	0,652	11,5638	361,3681		
18	0,940	0,623	11,0670	345,8434	348,5202		
	0,950	0,633	11,2383	351,1969			

PUFER S HOLINIJEVIM KLORIDOM							
PUFER S HOLINIJEVIM KLORIDOM	slepi vzorec	19	0,897	0,580	10,3304	322,8238	323,3591
			0,899	0,582	10,3646	323,8944	
		20	0,951	0,634	11,2554	351,7322	341,5606
			0,913	0,596	10,6045	331,3891	
		21	0,953	0,636	11,2897	352,8028	351,7320
			0,949	0,632	11,2212	350,6613	
	0,125 $\mu\text{M}$ $^3\text{H}$ -histamin	22	0,946	0,629	11,1698	349,0553	342,0959
			0,920	0,603	10,7244	335,1366	
		23	0,904	0,587	10,4503	326,5713	318,8088
			0,875	0,558	9,9535	311,0464	
		24	0,885	0,568	10,1248	316,3997	307,2990
			0,851	0,534	9,5423	298,1983	
	$10^{-7}$ M TMH + 0,125 $\mu\text{M}$ $^3\text{H}$ -histamin	25	0,514	0,197	3,7693	117,7893	103,0675
			0,459	0,142	2,8271	88,3458	
		26	0,840	0,523	9,3539	292,3096	297,6629
			0,860	0,543	9,6965	303,0163	
		27	0,960	0,643	11,4096	356,5500	347,1816
			0,925	0,608	10,8100	337,8131	
	$10^{-6}$ M TMH + 0,125 $\mu\text{M}$ $^3\text{H}$ -histamin	28	0,882	0,565	10,0734	314,7938	328,1772
			0,932	0,615	10,9299	341,5606	
		29	0,866	0,549	9,7993	306,2283	319,6118
			0,916	0,599	10,6559	332,9953	
		30	0,895	0,578	10,2961	321,7531	322,8238
			0,899	0,582	10,3646	323,8944	
	$10^{-5}$ M TMH + 0,125 $\mu\text{M}$ $^3\text{H}$ -histamin	31	0,945	0,628	11,1526	348,5200	348,2523
			0,944	0,627	11,1355	347,9847	
		32	0,899	0,582	10,3646	323,8944	332,9952
			0,933	0,616	10,9471	342,0959	
		33	0,825	0,508	9,0969	284,2795	293,6479
			0,860	0,543	9,6965	303,0163	
	$10^{-4}$ M TMH + 0,125 $\mu\text{M}$ $^3\text{H}$ -histamin	34	0,901	0,584	10,3989	324,9650	334,8689
			0,938	0,621	11,0327	344,7728	
		35	0,953	0,636	11,2897	352,8028	348,5200
			0,937	0,620	11,0156	344,2372	
		36	0,936	0,619	10,9985	343,7019	336,2072
			0,908	0,591	10,5188	328,7125	

*A* – absorbanca

*A* (slepi vzorec\*) – absorbanca slepega vzorca standarda (priloga II)

*c*<sub>1</sub> – koncentracija proteinov v 8  $\mu\text{L}$  vzorca, izračunana iz enačbe umeritvene krivulje

*c*<sub>2</sub> – koncentracija proteinov, preračunana na volumen začetnega vzorca (250  $\mu\text{L}$ )

**PRILOGA IV:** Primer izračuna količine v astrocite privzetega  $^3\text{H}$ -histamina v normalnih pogojih.

		DPM	DPM - DPM (slepi vzorec)	c ( $^3\text{H}$ -histamin) [nmol/250 $\mu\text{L}$ ]	c ( $^3\text{H}$ -histamin) [pmol/250 $\mu\text{L}$ ]	m (proteini) [ $\mu\text{g}$ ]	m (proteini) [mg]	c ( $^3\text{H}$ -histamin) / m (proteini) [pmol/250 $\mu\text{L}$ /mg]
<b>NORMALEN PUFER</b>	<b>slepi vzorec</b>	1	}					
		1		1				
		1						
	<b>0,125 <math>\mu\text{M}</math> <math>^3\text{H}</math>-histamin</b>	1525	1524	0,0000547437	0,0547437	345,0403	0,345040	0,159
		1293	1292	0,0000464100	0,0464100	346,1111	0,346111	0,134
		355	354	0,0000127161	0,0127161	147,7683	0,147768	0,086
	<b><math>10^{-7}</math> M TMH + 0,125 <math>\mu\text{M}</math> <math>^3\text{H}</math>-histamin</b>	2006	2005	0,0000720218	0,0720218	319,8795	0,319880	0,225
		801	800	0,0000287369	0,0287369	123,6781	0,123678	0,232
		1646	1645	0,0000590902	0,0590902	361,3683	0,361368	0,164
	<b><math>10^{-6}</math> M TMH + 0,125 <math>\mu\text{M}</math> <math>^3\text{H}</math>-histamin</b>	1941	1940	0,0000696869	0,0696869	356,2825	0,356283	0,196
		1526	1525	0,0000547797	0,0547797	337,0102	0,337010	0,163
		2124	2123	0,0000762605	0,0762605	392,4178	0,392418	0,194
	<b><math>10^{-5}</math> M TMH + 0,125 <math>\mu\text{M}</math> <math>^3\text{H}</math>-histamin</b>	352	351	0,0000126083	0,0126083	125,2841	0,125284	0,101
		1428	1427	0,0000512594	0,0512594	313,4554	0,313455	0,164
		399	398	0,0000142966	0,0142966	133,5818	0,133582	0,107
	<b><math>10^{-4}</math> M TMH + 0,125 <math>\mu\text{M}</math> <math>^3\text{H}</math>-histamin</b>	1675	1674	0,0000601319	0,0601319	364,5802	0,364580	0,165
		1464	1463	0,0000525526	0,0525526	352,2673	0,352267	0,149
		1712	1711	0,0000614610	0,0614610	348,5202	0,348520	0,176

		DPM	DPM - DPM (slepi vzorec)	c ( <sup>3</sup> H-histamin) [nmol/250 μL]	c ( <sup>3</sup> H-histamin) [pmol/250 μL]	m (proteini) [μg]	m (proteini) [mg]	c ( <sup>3</sup> H-histamin) / m (proteini) [pmol/250 μL/mg]
<b>PUFER S HOLINJEVIM KLORIDOM</b>	<b>slepi vzorec</b>	0	}					
		1		0,6667				
		1						
	<b>0,125 μM <sup>3</sup>H-histamin</b>	1266	1265,334	0,0000454522	0,0454522	342,0959	0,342096	0,133
		1697	1696,334	0,0000609342	0,0609342	318,8088	0,318809	0,191
		1491	1490,334	0,0000535344	0,0535344	307,2990	0,307299	0,174
	<b>10<sup>-7</sup> M TMH + 0,125 μM <sup>3</sup>H-histamin</b>	316	315,334	0,0000113271	0,0113271	103,0675	0,103068	0,110
		1940	1939,334	0,0000696630	0,0696630	297,6629	0,297663	0,234
		2158	2157,334	0,0000774938	0,0774938	347,1816	0,347182	0,223
	<b>10<sup>-6</sup> M TMH + 0,125 μM <sup>3</sup>H-histamin</b>	1825	1824,334	0,0000655321	0,0655321	328,1772	0,328177	0,200
		1340	1339,334	0,0000481103	0,0481103	319,6118	0,319612	0,151
		1711	1710,334	0,0000614371	0,0614371	322,8238	0,322824	0,190
	<b>10<sup>-5</sup> M TMH + 0,125 μM <sup>3</sup>H-histamin</b>	1125	1124,334	0,0000403873	0,0403873	348,2523	0,348252	0,116
		1201	1200,334	0,0000431173	0,0431173	332,9952	0,332995	0,129
		1082	1081,334	0,0000388427	0,0388427	293,6479	0,293648	0,132
	<b>10<sup>-4</sup> M TMH + 0,125 μM <sup>3</sup>H-histamin</b>	2107	2106,334	0,0000756618	0,0756618	334,8689	0,334869	0,226
		1972	1971,334	0,0000708125	0,0708125	348,5200	0,348520	0,203
		1610	1609,334	0,0000578090	0,0578090	336,2072	0,336207	0,172

specifična aktivnost izotopa (<sup>3</sup>H-histamin) = 12,54 Ci/mmol

m (proteini) – masa proteinov v 250 μL vzorca, izražena kot srednja vrednost dveh paralel (priloga III, stolpec (c2'+c2'')/2)