

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KAJA GAŠPERLIN

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KAJA GAŠPERLIN

VLOGA MEMBRANSKEGA PRENAŠALCA ZA
MONOAMINE PRI PRIVZEMU HISTAMINA V
ASTROCITE NOVOROJENE PODGANE.

THE ROLE OF PLASMA MEMBRANE MONOAMINE
TRANSPORTER IN HISTAMINE UPTAKE INTO
NEONATAL RAT ASTROCYTES.

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2014

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

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mojci Kržan, dr. med., za vse strokovne nasvete in usmerjanje pri izdelavi magistrske naloge ter tudi za njeno dostopnost in potrpežljivost tekom dela.

Prav tako se zahvaljujem asistentki Jožici Košir za pomoč pri uvajanju v eksperimentalno delo in izvedbi poskusov ter za njeno dobro voljo, zaradi katere sem se z veseljem vračala v laboratorij.

Najlepša hvala tudi prof. dr. Albinu Kristlu, mag. farm. in asist. dr. Martini Gobec, mag. farm., za temeljit pregled magistrske naloge.

Velika zahvala gre tudi moji družini, prijateljem in fantu Robiju, ki so me spodbujali, mi nudili oporo in mi lepšali čas tekom celotnega študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Mojce Kržan, dr. med.

Kaja Gašperlin

Komisija za zagovor:

Predsednik: prof. dr. Albin Kristl, mag. farm.

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

Članica: asist. dr. Martina Gobec, mag. farm.

VSEBINA

UVOD	1
1. CELICE OSREDNJEGA ŽIVČNEGA SISTEMA	1
1.1 <i>Živčne celice</i>	1
1.2 <i>Celice glije</i>	1
1.2.1 Zgodovina raziskovanja nevroglijie	2
2. ASTROCITI	2
2.1 <i>Vloga astrocitov v razvoju možganov</i>	2
2.2 <i>Vloga astrocitov v energijskem metabolizmu možganov, hemato-encefalni barieri in pretoku krvi v možgane</i>	3
2.3 <i>Tridelna sinapsa</i>	4
2.4 <i>Reaktivna glioza</i>	5
3. SINAPSA.....	5
4. ŽIVČNI PRENAŠALCI.....	7
4.1 <i>Histamin</i>	8
4.1.1 Vloga v CŽS	8
4.1.2 Histaminski receptorji.....	9
4.1.3 Sinteza in inaktivacija histamina	11
4.2 <i>Dopamin</i>	12
5. PRENAŠALNE BELJAKOVINE	13
5.1 <i>Že znane prenašalne beljakovine, ki bi lahko bile odgovorne za prenos histamina v astrocite</i>	14
5.1.1 Dopaminski prenašalec	14
5.1.2 Organski kationski prenašalec 3	14
5.1.3 Membranski prenašalec za monoamine.....	15
NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE	16
MATERIALI IN METODE	17
1. REAGENTI IN OPREMA	17
2. POSKUSNE ŽIVALI	19
3. EKSPERIMENTALNE METODE.....	19
3.1 <i>Izolacija in priprava kulture astrocitov</i>	19

3.2 Priprava pufra za privzem	20
3.3 Vpliv vrednosti pH inkubacijskega medija na privzem histamina.....	20
3.4 Vpliv vrednosti pH inkubacijskega medija na sproščanje histamina.....	21
3.5 Privzem histamina ob prisotnosti dopaminergičnih učinkovin	21
3.6 Sproščanje histamina ob prisotnosti dopaminergičnih učinkovin.....	21
3.7 Izračun koncentracije histamina v vzorcu	22
3.8 Bradfordova metoda določanja celokupnih proteinov	23
4. STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	23
REZULTATI.....	25
1. KONCENTRACIJSKA ODVISNOST PRENOŠA HISTAMINA PRI RAZLIČNIH VREDNOSTIH PH MEDIJA.....	25
2. VPLIV DOPAMINERGIČNIH UČINKOVIN NA PRENOŠ HISTAMINA V ASTROCITE	29
RAZPRAVA.....	33
1. LASTNOSTI PRIVZEMA IN SPROŠČANJA HISTAMINA V ASTROCITE	33
2. VPLIV DOPAMINERGIČNIH UČINKOVIN NA PRENOŠ HISTAMINA V ASTROCITE	35
SKLEP	40
VIRI IN LITERATURA	41

KAZALO SLIK

SLIKA 1 PRENOS SIGNALA PREKO KEMIJSKE SINAPSE.	6
SLIKA 2 NASTAJANJE EKSCITATORNEGA ALI INHIBITORNEGA POSTSINAPTIČNEGA POTENCIALA PREKO VEZAVE NEVROTRANMITERJA NA IONOTROPNI (A) IN METABOTROPNI (B) RECEPTOR.	7
SLIKA 3 KEMIJSKA STRUKTURA HISTAMINA.	8
SLIKA 4 PRIKAZ HISTAMINERGIČNEGA SISTEMA V ČLOVEŠKIH MOŽGANIH.	9
SLIKA 5 SHEMATSKI PRIKAZ SINTEZE HISTAMINA V NEVRONU IN NJEGOVE RAZGRADNJE V ASTROCITU.	11
SLIKA 6 KEMIJSKA FORMULA DOPAMINA.	12
SLIKA 7 KONCENTRACIJSKA ODVISNOST PRIVZEMA HISTAMINA V KULTURO ASTROCTOV.	25
SLIKA 8 SPECIFIČNI PRIVZEM HISTAMINA V KULTURO ASTROCTOV.	26
SLIKA 9 GRAFIČNI PRIKAZ KINETIČNIH PARAMETROV SPECIFIČNEGA PRIVZEMA HISTAMINA V ASTROCITE.	27
SLIKA 10 KONCENTRACIJSKA ODVISNOST SPROŠČANJA HISTAMINA IZ KULTURE ASTROCTOV.	28
SLIKA 11 PRIKAZ SPROŠČANJA HISTAMINA GLEDE NA NJEGOV PRIVZEM.	29
SLIKA 12 VPLIV DOPAMINERGIČNIH UČINKOVIN NA PRIVZEM HISTAMINA V ASTROCITE.	30
SLIKA 13 VPLIV KLORPROMAZINA NA PRIVZEM HISTAMINA V ASTROCITE.	31
SLIKA 14 VPLIV DOPAMINERGIČNIH UČINKOVIN NA SPROŠČANJE HISTAMINA IZ KULTURE ASTROCITOVA.	32
SLIKA 15 IMUNODETEKCIJA PMAT (ZGORAJ) IN BARVANJE Z BARVILOM PANCEAU S (SPODAJ).	38

KAZALO PREGLEDNIC

PREGLEDNICA 1 FUNKCIONALNE LASTNOSTI HISTAMINSKIH RECEPTORJEV V CŽS.	10
PREGLEDNICA 2 DOPAMINERGIČNE POTI V MOŽGANIH: NJIHOVE FIZIOLOŠKE IN PATOFIZIOLOŠKE VLOGE.	12
PREGLEDNICA 3 UPORABLJENI REAGENTI IN OPREMA PRI IZOLACIJI KULTURE ASTROCITOVA.	17
PREGLEDNICA 4 SEZNAM UPORABLJENIH REAGENTOV IN OPREME PRI IZVAJANJU POSKUSOV V KULTURAH ASTROCITOVA.	18
PREGLEDNICA 5 SESTAVA PUFRA ZA PRIVZEM HISTAMINA	20

POVZETEK

Odstranjevanje histamina iz sinaptičnega prostora je ključni proces pri preprečevanju poškodb živčevja zaradi prekomerne aktivnosti histaminergičnih nevronov. V primerjavi z ostalimi aminskimi nevrotransmiterji je mehanizem privzema histamina še precej nedognan, znano pa je, da ta ne poteka v živčno celico, temveč v astrocit. V sklopu tega magistrskega dela smo na kulturi astrocitov, izoliranih iz možganov novorojene podgane, raziskali nekaj lastnosti prehoda histamina preko celične membrane in preverili možno vpletenost nekaterih nespecifičnih prenašalnih sistemov v prenos histamina. Najbolj nas je zanimalo spreminjanje lastnosti prenosa histamina pri različnih vrednostih pH in morebitna povezava med prenašalnim sistemom za dopamin in histamin. Količino privzetega ali sproščenega histamina smo izmerili s scintilacijskim števcem ob dodatku radioaktivno označenega histamina.

Ugotovili smo, da se histamin v astrocit podgane prenaša preko nespecifičnega ali nizkoafinitetnega prenašalca ($K_m = 62,47 \mu M$, $V_{max} 25,98 \text{ pmol/mg proteinov/min}$), najverjetnejše pa s kombinacijo več prenašalcev. Prenašalni sistem je občutljiv na vrednost pH medija. Z višanjem kislosti zunajceličnega prostora se zmanjšuje privzem histamina v astrocite, povečuje pa se njegovo sproščanje iz njih. Monoamini so v preteklosti že pokazali inhibitorni učinek na privzem histamina, pri čemer je imel največjo stopnjo inhibicije dopamin. Z izvedbo inhibitornih testov z dopaminu podobnimi snovmi smo ugotovili, da je apomorfin v koncentracijah nad $0,1 \text{ mM}$ skoraj popolnoma zavrl privzem histamina v astrocit ($IC_{50} = 0,58 \text{ mM}$), pri enakih koncentracijah pa je tudi močno zavrl njegovo sproščanje ($IC_{50} > 10 \text{ mM}$). Ostali dve učinkovini, levodopa in klorpromazin, na transport histamina nista vplivali. Nedavno objavljeni rezultati japonske raziskave mehanizma privzema histamina v človeške astrocite kot glavni prenašalni protein navajajo membranski prenašalec za monoamine (PMAT). Zaključimo lahko, da transport histamina preko celične membrane astrocita poteka s pomočjo prenašalnega sistema, ki je poleg prenosa histamina sposoben prenosa tudi dopamina in dopaminu podobnih snovi v celico in iz nje, vendar pa zaradi pomanjkljivih dokazov o obstoju PMAT na podganjih astrocitih ne moremo trditi, da vlogo prenašalne molekule opravlja prav PMAT.

Ključne besede: astrociti, histamin, ponovni privzem histamina, PMAT, acidoza.

ABSTRACT

Histamine clearance is an essential process for avoiding excessive histaminergic neuronal activity. Previous studies using rodents indicated that histamine reuptake involves astrocytes rather than neurons. However, in comparison to other monoamines molecular mechanism of histamine clearance has remained unclear. In the present study we investigated some of the features of histamine uptake into neonatal rat astrocytes. Our focus was to monitor histamine uptake and its release in acidosis-like conditions. Furthermore, we researched a connection between dopamine and histamine uptake system and involvement of low-affinity transporters, especially plasma membrane monoamine transporter (PMAT).

We showed that rat astrocytes transported histamine in concentration-dependent and pH-dependant manner. We calculated the amount of histamine uptake and release by using ^3H -histamine and measuring its radioactivity with scintillation counter. Histamine uptake into astrocitoma cell was gradually decreasing while incubating in progressively acidic condition. On the other hand, histamine release from astrocytes was increasing and reached its maximum in conditions with pH 7,0. Kinetics analysis ($K_m = 62,47 \mu\text{M}$, $V_{max} = 25,98 \text{ pmol/mg proteins/min}$) showed that a low-affinity transporter(s) was involved in histamine transport. Moreover, we demonstrated that dopamine-like substance, apomorfin, significantly inhibited histamine uptake into astrocytes ($IC_{50} = 0,58 \text{ mM}$) and its release ($IC_{50} > 10 \text{ mM}$) in concentration higher than 0,1 mM. On the contrary, the other two investigated dopamine-like substances, levodopa and chlorpromazine, showed no effect on histamine transport. In addition, the results of the recent study conducted by the group of Japanese reaserchers revealed that PMAT could be the key histamine transporter in primary human astrocytes. However, since there has not been yet any evidence of PMAT existence on rat astrocytes provided, we can only conclude that histamine is transported by low-affinity transporter system which is capable of transporting also dopamine and dopamine-like substances.

Keywords: astrocytes, histamine, histamine uptake, PMAT, acidosis

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

3-MT – 3-metoksitiramin

AADC – L-aromatična aminokislinska dekarboksilaza (L-aromatic amino acid decarboxylase)

ATP – adenozin trifosfat

BDNF – nevrotrofični dejavnik možganskega izvora (brain derived neurotrophic factor)

BSA – goveji serumski albumin (bovine serum albumin)

Ci – specifična aktivnost izotopa

COMT – katehol-O-metiltransferaza (catechol-*O*-methyltransferase)

CPM – število ionizirajočih dogodkov na minuto (count per minute)

CTNF – ciliarni nevrotrofični faktor (ciliary neurotrophic factor)

CŽS – centralni ali osrednji živčni sistem

D22 – decinij 22

DAO – diamin oksidaza

DAT – prenašalec za dopamine (dopamine active transporter)

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DOPAC – dihidroksifenil ocetna kislina (dihydroxyphenylacetic acid)

DPM – število β -razpadov radioaktivnega izotopa na minuto (disintegration decay per minute)

EF – učinkovitost detektorja (efficacy)

FBS – fetalni goveji serum (Fetal bovine serum)

GABA – γ -aminomaslena kislina ali gama-aminomaslena kislina (gamma-aminobutyric acid)

GFAP – glijalna fibrilarna kisla beljakovina (glial fibrillary acidic protein)

GLUT – prenašalne beljakovine za glukozo (glucose transporter)

H(1-4)R – histaminski receptor 1, 2, 3 ali 4

HEB – krvno-možganska pregrada ali hemato-encefalna bariera

HEPES – 4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etan sulfonska kislina

HNMT – (histaminska) N-metil transferaza

HVA – homovanilinska kislina (homovanilllic acid)

IC₅₀ – polovična inhibitorna koncentracija (half maximal inhibitory concentration) oz. koncentracija inhibitorja, ki zmanjša prenos histamina za 50%.

IFN-g – interferon g

IL-6 – interlevkin 6

K_m – Michaelis-Mentenova konstanta

L-DOPA – L-dihidroksifenilalanin

LPS – lipopolisaharid

MAO-B – monoaminska oksidaza B

MAP₂ – mikrotubularni protein (microtubule-associated protein)

NET – prenašalec za noradrenalin (norepinephrine transporter)

NGF – živčni rastni dejavnik (nerve growth factor)

NT-3 – nevrotrofin 3

OCT – prenašalec za organske katione (organic cation transporter)

PMAT – membranski prenašalec za monoamine (plasma membrane monoamine transporter)

R² – determinacijski koeficient (coefficient of determination or r squared)

ROS – reaktivne kisikove spojine (reactive oxygen species)

[S] – koncentracija substrata

SERT – prenašalec za serotonin (serotonin transporter)

SLC – skupina prenašalnih beljakovin za topljence (solute carrier group of membrane transport proteins)

TNF- α – tumor nekrozni faktor alfa (tumor necrosis factor alpha)

v – hitrost privzema histamina

V_{max} – maksimalna hitrost

VMAT-2 – vezikularni prenašalec za monoamine 2 (vesicular monoamine transporter 2)

UVOD

1. Celice osrednjega živčnega sistema

V grobem centralni živčni sistem (CŽS) gradita 2 tipa celic: živčne celice ali nevroni in celice glije. Število nevronov v človeških možganih je ocenjeno na približno 100 miljard, celic glije pa naj bi bilo kar 10-krat več [1].

1.1 Živčne celice

Živci so edine celice v telesu, ki so sposobne prenosa živčnega signala. Večina celičnih organelov se nahaja v telesu ali somi nevrona, kjer poteka sinteza proteinov. Nevrit ali akson je celična struktura, ki je lastna le živčnim celicam in je specializirana za prenos informacije v živčnem sistemu [2]. Aksoni so lahko dolgi nekaj mikrometrov, pa tudi več kot meter. Prav tako se razlikujejo glede na debelino aksona, kar se odraža pri hitrosti prenosa signala. Debelejši kot je akson, hitreje potuje električni signal do končnega dela, presinaptičnega končiča. Na tem mestu poteka komunikacija s sosednjo živčno celico, natančneje z njenim telesom ali z dendriti. Izraz dendrit izhaja iz grške besede za drevo, ki tudi najbolje izraža obliko teh krajiših razvejanih izrastkov. Glede na razvejanost dendritov nevrone uvrščamo v dve skupini: piramidalne in zvezdaste nevrone. Živčne celice lahko delimo tudi glede na število nevritov (unipolarni, bipolarni in multipolarni nevroni), glede na njihovo povezovanje s celicami (primarni senzorični, motorični nevroni in internevroni) ali glede na kemijsko sestavo nevrotransmiterja, ki ga izražajo (holinergični, kateholaminergični, serotonergični...) [1].

1.2 Celice glije

Nevroglijo CŽS tvorijo astrociti, oligodendroci, celice NG-2 in celice mikroglije. Oligodendroci ustvarjajo mielinski ovoj aksonov in podobno kot Schwannove celice v perifernem živčevju omogočajo hitrejši prenos informacij v CŽS [3]. Približno 20% celic glije predstavlja mikroglija, ki sodeluje v imunskega odgovoru [4]. Nedavno odkriti nov tip celic glije, NG-2, pa je celo sposoben sprožanja akcijskih potencialov [5] [6]. Za prenos in obdelovanje informacij v možganih tako tesno sodeluje več celičnih tipov, ne le nevroni.

1.2.1 Zgodovina raziskovanja nevroglije

Nevroglij kot povezovalno tkivo je v sredini 19. stoletja prvi opredelil nemški patolog Rudolf Virchow [7], Otto Deiters pa je nekaj let zatem prvi opisal zvezdaste celice glije [8]. Slednje je leta 1891 Michael von Lenhossek preimenoval v astrocite [9]. Astrocite sta glede na mesto nahajanja Rudolf Albert von Kölliker and William Lloyd Andriezen razdelila v dve podskupini: protoplazmatske (najdemo jih v možganski sivini) in fibrozne astrocite (so del možganske beline) [10] [11]. Čeprav je razvoj tehnik barvanja [12] močno olajšal opazovanje celic živčnega sistema, je do odkritja oligodendrocytov in celic mikroglije minilo še več desetletij [13] [14]. Večino 20. stoletja so celicam glije pripisovali zgolj funkcijo podpornega tkiva. V zadnjih treh desetletjih pa opažamo nekakšen preporod na področju njihovega raziskovanja z vrsto novih odkritij, ki tem celicam pripisujejo vedno več funkcij.

2. Astrociti

Astrociti so najštevilčnejši predstavnik nevroglije. Celice so zvezdasto oblikovane in so, tako kot nevroni, ektodermalnega izvora. Za razliko od slednjih niso električno vzdražni, ampak na dražljaje odgovarjajo s spremjanjem znotrajcelične aktivnosti kalcija. Astrociti med seboj komunicirajo preko presledkovnih stikov in s prenosom kalcijevih (Ca^{2+}) ionov. Ti signali se odvijajo s časovno konstanto, ki je vsaj dva velikostna razreda počasnejša kot pri nevronih [15]. Komunikacija med astrociti in nevroni poteka preko nevrotransmiterjev, saj astrociti na svojih membranah lahko izražajo skoraj vse do sedaj znane receptorje za nevrotransmiterje [16] [17] [18] [19] [20] [21]. Prav tako pa tudi sami izločajo signalne molekule, ki jih v tem primeru namesto živčni prenašalci (neurotransmiterji) poimenujemo glijalni prenašalci (gliatransmiterji). V citoskeletu astrocita najdemo glijalno fibrilarno kislo beljakovino (angl. glial fibrillary acidic protein, GFAP), značilno le za to vrsto celic. To nam omogoča, da s pomočjo označenih protiteles proti GFAP astrocite imunocitokemično zaznamo [22]. Omeniti je potrebno, da so človeški astrociti večji, strukturno bolj kompleksni in raznoliki kot astrociti glodalcev.

2.1 Vloga astrocitov v razvoju možganov

V razvojnem obdobju možganov predhodnik protoplazmatskih astrocitov – radialna glija usmerja rastoče živčne celice (nevroblast) do njihovega tarčnega mesta. Poleg tega tvori in

sprošča velike količine rastnih dejavnikov, kot so živčni rastni dejavnik (angl. nerve growth factor, NGF), nevrotrofični dejavnik možganskega izvora (angl. brain derived neurotrophic factor, BDNF) in nevrotrofin 3 (NT-3) [23]. Vedno več dokazov tudi potrjuje, da astrociti s sproščanjem trombospondina, pomembno pripomorejo k tvorbi sinaps [24]. Z zorenjem možganov se potreba po rastnih dejavnikih zmanjšuje in posledično zreli astrociti izgubijo sposobnost izražanja le-teh [25].

V odraslem obdobju so med pomembnejšimi nalogami astrocitov zaščita nevronov z zagotavljanjem stalnega mikrookolja (homeostaze), aktivno sodelovanje v tridelni sinapsi, urejanje sinaptične aktivnosti nevronov, metabolična preskrba nevronov in urejanje pretoka krvi. Poleg fizioloških vlog so astrociti lahko vpleteni tudi v razvoj patoloških procesov v možganih (Alzheimerjeva bolezen, neoplazme) [26].

2.2 Vloga astrocitov v energijskem metabolizmu možganov, hemato-encefalni barieri in pretoku krvi v možgane

Astrociti so anatomska umeščeni med krvne žile in nevrone, kar jim omogoča, da glede na sinaptično aktivnost (ali potrebe) nevronov regulirajo pretok krvi v možgane [27]. V ta namen astrociti proizvajajo in sproščajo številne vaskularne mediatorje: prostaglandine, dušikov oksid in arahidonsko kislino, ki lahko povečajo ali zmanjšajo premer žil [28].

Pri nižjih živalskih vrstah astrociti tudi sotvorijo hemato-encefalno bariero (HEB), pri višjih pa je ta sestavljena iz tesnih stikov kapilarnih endotelnih celic, ki jih obdajajo podociti ali nožice astrocitov. Slednji naj bi imeli po nekaterih študijah tudi zmožnost induciranja lastnosti HEB [29].

Glukoza in druge hranilne snovi iz krvi najprej vstopajo v astrocite, od koder se dalje preporazporedijo po posameznih fragmentih možganovine. Glukoza vstopa v možganske celice s pospešeno difuzijo preko glukoznih prenašalnih beljakovin (GLUT 1-5). V astrocite se prenaša preko GLUT 1. Skoraj polovica vse glukoze, ki vstopi v astrocit, se vgradi v glikogen. Zaloga glikogena v astrocitih je v primerjavi z mišično zalogo precej pičla (10-krat manjša), a predstavlja edini vir shranjene energije v CŽS in je zato, še posebej v patoloških (hipoglikemičnih) razmerah, izrednega pomena [30]. Vsebnost glikogena in glukoze v astrocitih se pod vplivom nevrotansmiterjev, kot so glutamat, noradrenalin in adrenalin, lahko spreminja [31]. Zgodovinsko je veljala glukoza za glavni vir energije za nevrone. Nekatere raziskave pa so pokazale, da je morda izključni vir energije za nevrone laktat, ki ga izločajo astrociti [32]. V takoimenovani glukozno-laktatni

poti astrociti privzemajo glukozo iz krvi, jo presnovijo v laktat in ga posredujejo nevronom. Prenos laktata poteka preko mono-karboksilatnih prenašalcev, ki se nahajajo na plazmalemi astrocitov in nevronov [33].

2.3 Tridelna sinapsa

Astrocit razvije 5-10 glavnih vej, iz katerih se razvije tisoče manjših izrastkov, ki celici omogočajo stik s številnimi dendriti nevronov in sinapsami. V hipokampusu in možganski skorji naj bi en astrocit ovijal vsaj 100 tisoč sinaps. Ta odkritja so botrovala k nastanku teorije o tridelni sinapsi, sestavljeni iz presinaptičnega in postsinaptičnega nevrona ter perisinaptičnega astrocita [34]. Vlogi perisinaptičnega astrocita sta ohranjanje stalnega okolja v sinaptični špranji in aktivno sodelovanje pri sinaptičnem prenosu podatkov. Pri sinaptičnem prenosu se iz presinaptičnega nevrona sprosti visoka koncentracija navrotransmiterja in ionov (predvsem kalijevih, K^+). Oboji bi ob predolgem zadrževanju v sinaptičnem prostoru vodili v ekscitotoksične poškodbe živčevja, zato jih je potrebno v ustrezнем času odstraniti. Astrociti na svoji membrani izražajo številne prenašalce, med drugim Na^+/K^+ črpalko, akvaporin 4, ionske kanalčke, Na^+/H^+ ionski izmenjevalec, Na^+/HCO_3^- ionski izmenjevalec, recepterje in prenašalne proteine za nevrotransmiterje ter druge molekule, s katerimi perisinaptični astrocit zagotavlja homeostazo ionov, pH in nevrotransmiterjev [35] [36]. Odkritje, da perisinaptični astrocit zazna nevronska aktivnost in se nanjo odzove s sproščanjem kemičnih prenašalcev (glijatransmiterjev), je sprožilo revolucijo na področju nevroznanosti. Pri prenosu in obdelavi informacij v živčnem sistemu torej ne sodeluje zgolj nevronska, temveč nevronska – glijalna mreža [37]. Fiziološka potreba po astrocitni signalizaciji in način njenega delovanja zaenkrat ostajata še dokaj neopredeljena. Znano pa je, da ob povečani nevronske aktivnosti pride do vzdraženja astrocita, ki se odzove s povišanjem aktivnosti znotrajceličnega kalcija. Prehodna sprememba aktivnosti kalcija spodbudi številne procese, med drugim tudi sproščanje kemičnih prenašalcev v sinaptično špranjo. Kemični prenašalci, ki se v astrocitih sintetizirajo in shranjujejo v mešičkih, se izločajo s procesom eksocitoze. Po sprostitvi se glijatransmitor lahko veže na receptorsko mesto na postsinaptičnem ali presinaptičnem nevronu. V slednjem primeru ureja sproščanje nevrotransmitorja iz presinaptičnega končiča [38]. Nevroaktivne snovi, ki jih astrocit lahko sprošča so glutamat, D-serin, ATP, adenosin, GABA, TNF- α , prostaglandini in drugi proteini ter

peptidi [39] [40]. Ker astrociti nadzorujejo zunajcelično koncentracijo adenozina, so ključni člen pri urejanju cikla spanja [41].

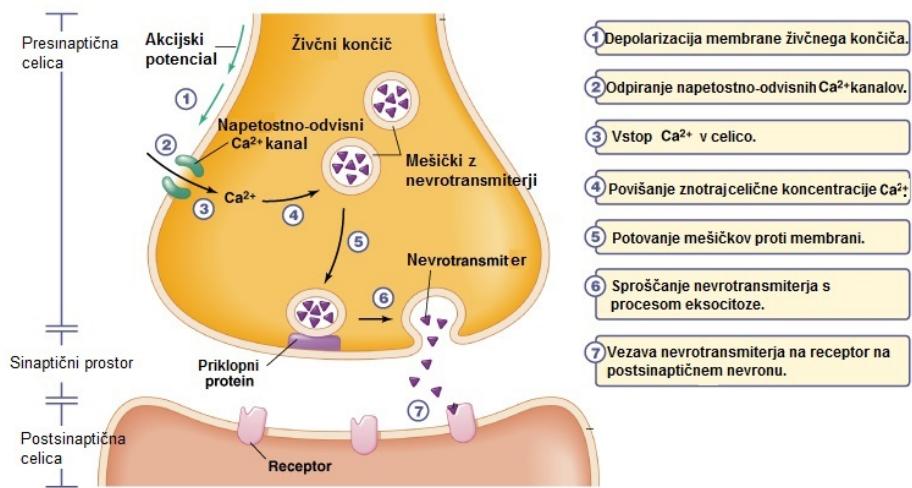
2.4 Reaktivna glioza

Ekscitotoksičnost, motnje v homeostazi Ca^{2+} , nastajanje prostih radikalov, disfunkcija mitohondrijev, vnetje, apoptoza in drugi škodljivi procesi v živčnem sistemu vodijo v nastanek reaktivnih astrocitov. Pojem reaktivne glioze zajema vse molekularne, celične in funkcionalne spremembe astrocita, ki se pojavijo kot odgovor na poškodbe ali bolezni CŽS. Moč odgovora se spreminja glede na stopnjo poškodbe (izražanje molekul, napredajoča hipertrofija, pri hujših pa proliferacija in tvorba brazgotine) in ima za sosednje celice lahko pozitivne ali negativne učinke [15]. Reaktivno gliozo sprožijo in urejajo različne signalne molekule, kot so rastni dejavniki in citokini (IL-6, CTNF, TGF- α , IFNg), mediatorji naravne odpornosti (lipopolisaharid - LPS), nevrotransmiterji (glutamat, noradrenalin), purini (ATP), reaktivne kisikove spojine (ROS, vključno z dušikovim oksidom – NO), regulatorji celične proliferacije (endotelin-1) ter snovi, ki so povezane z nevrodegenerativnimi procesi (β amiloid) in metabolno toksičnostjo (amonijev ion NH_4^+) [42].

3. Sinapsa

Angleški fiziolog Charles Sherrington je konec 19. stoletja mesto, kjer prihaja do prenosa podatkov z ene živčne celice na drugo, poimenoval sinapsa. Ta prenos lahko poteka električno ali kemijsko. Pri električni sinapsi, ki je pogostejša pri nižje razvitih živalskih vrstah, akcijski potencial pripotuje po aksonu in se prenese na sosednji nevron preko presledkovnega stika. Tak način predajanja informacije je izjemno hiter in lahko poteka v obe strani. Pri sesalcih gre praviloma za kemijsko sinapso, z izjemo določenih manjših specializiranih regij, kjer morajo celice delovati še posebej sinhrono. Pri kemijski sinapsi sta živčni celici oddaljeni druga od druge za 20 – 50 nm; to mesto imenujemo sinaptična špranja. Sestavlja jo ekstracelularni fibrozni protein, ki preprečuje, da bi se celici bolj oddaljili. Presinaptična stran, ponavadi je to živčni končič, hrani sinaptične vezikle in večje, sekretorne granule. Ob prihodu akcijskega potenciala, depolarizacija membrane povzroči odprtje napetostno odvisnih kalcijevih kanalčkov. Povečana znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} je impulz za spajanje sinaptičnih veziklov z membrano končiča in

sprostitev nevrotransmiterjev v sinaptično špranjo. Ti potujejo do postsinaptične strani – membrane dendrita ali telesa nevrona, kjer se vežejo na specifični receptor (Slika 1).



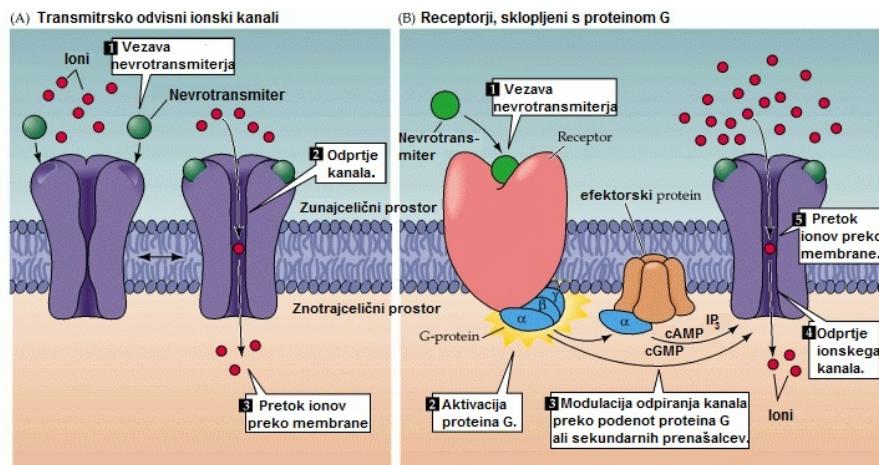
Slika 1 Prenos signala preko kemijske sinapse.

Prirejeno po [43].

Čeprav obstaja več sto različnih receptorjev, jih lahko razvrstimo v dva tipa: transmitrsko odvisni ionski kanali in receptorji, sklopljeni s proteinom G. Odgovor postsinaptične celice je hitrejši pri receptorjih tipa ionskih kanalov. V tem primeru nevrotransmiter (aminski ali aminokislinski) sproži odprtje ionskega kanala in omogoči vstop Na^+ ali Cl^- ionom. Pri vstopu prvih pride do depolarizacije membrane in do ekscitatornega postsinaptičnega potenciala, pri vstopu drugih pa do hiperpolarizacije membrane in inhibitornega postsinaptičnega potenciala. Vezava nevrotransmiterja na receptor, sklopljen s proteinom G, navadno v postsinaptični celici sproži procese, ki so počasnejši, daljše delujoči in bolj raznoliki. V prvi fazi se aktivira protein G, ki nadalje a) odpre ionske kanale ali b) aktivira encime za sintezo sekundarnih prenašalcev. Tudi ti lahko kasneje urejajo prepustnost ionskih kanalov ali pa vplivajo na celični metabolizem. Zaradi slednjega jih velikokrat poimenujemo tudi metabotropni receptorji. Delovanje obeh receptorskih tipov je prikazano na Sliki 2. Receptorjev ne najdemo samo na postsinaptičnem nevronu, temveč tudi na presinaptičnem. Vezava nevrotransmiterja na tako imenovane avtoreceptorje zaustavi nadaljnje sproščanje živčnih prenašalcev in v nekaterih primerih sproži njihovo ponovno sintezo [1] [2].

Po uspešnem sinaptičnem prenosu podatkov ima presežek nevrotransmiterja lahko škodljive učinke, zato ga je potrebno odstraniti. To se doseže z difundiranjem

nevrotransmiterja v okolje izven sinapse, s ponovnim privzemom v presinaptični nevron ali celice glije in z encimsko razgradnjo nevrotransmiterja v sinaptičnem prostoru [1]. Nepravilnosti na nivoju sinapse so glavni razlog za razvoj nevroloških in duševnih bolezni, pa tudi glavno mesto prijemališč za zdravljenje le-teh [44].



Slika 2 Nastajanje ekscitatornega ali inhibitornega postsinaptičnega potenciala preko vezave nevrotransmiterja na ionotropni (A) in metabotropni (B) receptor.
Prirejeno po [45].

4. Živčni prenašalci

Da neka molekula velja za nevrotransmiter, mora izpolnjevati naslednje pogoje:

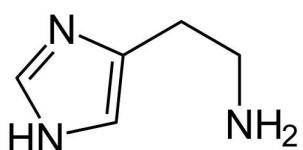
1. sintetizirati in shranjevati se mora v presinaptičnem nevronu,
2. ob stimulaciji presinaptičnega nevrona se mora sprostiti v sinaptični prostor,
3. povzročiti mora specifičen odgovor postsinaptičnega nevrona,
4. ne sme prehajati hemato-encefalne bariere.

V začetku 20. stoletja je bila odkrita prva molekula, ki je izpolnjevala zgornje pogoje, in sicer acetilholin. Sledili so ji noradrenalin, dopamin, adrenalin, histamin, serotonin, glicin, glutamat, aspartat, GABA, ATP in drugi [44]. Večino danes znanih nevrotransmiterjev lahko uvrstimo v eno izmed treh kemijskih skupin: aminokisline, amini in peptidi. Peptidni prenašalci so večje molekule in se shranjujejo ter sproščajo iz sekretornih granul. Velikokrat se nahajajo v živčnem končiču, ki hkrati hrani tudi nek drug aminski ali aminokislinski nevrotransmiter. Peptidni prenašalec se iz sekretornih granul sprošča počasneje in samo pod vplivom izredno visokega porasta znotrajceličnega Ca^{2+} .

Najhitrejšega sinaptičnega prenosa so sposobni aminokislinski prenašalci: glicin, glutamat in GABA [1]. Med aminske prenašalce uvrščamo acetilholin, serotonin, adrenalin, noradrenalin, dopamin in histamin.

4.1 Histamin

Spojino 2-(4-imidazolil)etilamin najdemo praktično v vseh človeških tkivih, odkoder izvira tudi njeno poimenovanje: histamin – »tkivni amin«. Prisotnost histamina v človeškem telesu je pred približno stoletjem odkrila skupina raziskovalcev Sir-a Henry-ja Dale-a [46].



Slika 3 Kemijska struktura histamina.

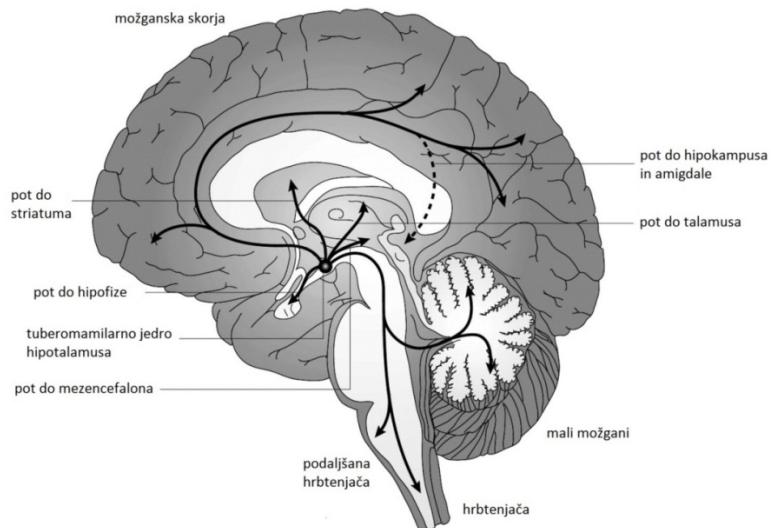
Izven CŽS histamin nastaja in se skladišči v citoplazemskih granulah mastocitov, bazofilcev in enterokromatofinih celicah, kjer deluje kot hormon. Ima sledeče lokalne učinke: opravlja vlogo kemičnega mediatorja pri vnetjih in imunskih reakcijah, nadzira izločanje želodčne kisline, povzroča razširjanje kapilar in vpliva na krčenje gladkih mišic v bronhijih, spodnjem delu tankega črevesja in maternici [47].

4.1.1 Vloga v CŽS

Telesa histaminergičnih nevronov se nahajajo v tuberomamillarnem jedru posteriornega hipotalamus, njihove projekcije pa segajo po celotnem CŽS (Slika 4) [48] [49]. V razvojnem obdobju možganov, naj bi imel histamin predvsem vlogo nevromodulatorja. V odraslem obdobju je kot nevrottransmiter vpletен v številne fiziološke funkcije: urejanje cikla spanje-budnost, vnos tekočine, regulacija apetita, odgovor na stres, motorika, nocicepcija, termoregulacija, in višje funkcije kot so vedenje, pomnenje in prostorsko gibanje. Histaminergični nevroni se širijo tudi v hipotalamus, kjer vplivajo na sproščanje in funkcijo hipotalamusnih peptidov in hormonov. Tako sodelujejo tudi pri uravnavanju endokrinih funkcij [47].

Vezava histamina na celice glije naj bi spodbudila odstranjevanje nevrottransmiterjev iz sinaptične špranje ter vplivala na spremembo energetskega metabolizma v možganih (indukcija glikogenolize), elektrolitskega ravnotesja in prevodnosti HEB [50] [51]. Vedno

več dokazov potrjuje vpletjenost histamina pri razvoju številnih patoloških stanj (npr. motnje spanja, motnje prehranjevanja, shizofrenija, epilepsija, depresija, Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen), vendar pa zaenkrat nobenega izmed njih ne moremo povezati izključno z nepravilnim delovanjem histaminergičnega sistema [52].



Slika 4 Prikaz histaminergičnega sistema v človeških možganih.
Prirejeno po [53].

4.1.2 Histaminski receptorji

Do sedaj so znani širje histaminski receptorji, poimenovani po vrstnem redu odkrivanja. Receptorji H1, H2 in H3 se široko izražajo na celicah CŽS (na nevronih, celicah glij in celicah krvnih žil), medtem ko se nedavno odkriti H4 receptor nahaja bolj na perifernih celicah. Vsi receptorji so sklopljeni s proteinom G in jih sestavlja sedem transmembranskih domen [47]. Vloge histamiskih receptorjev so na kratko predstavljene v Preglednici 1.

- H1R

H1 receptor je široko razširjen po celotnem organizmu. Zanimivo je, da je gostota izražanja receptorja v CŽS največja na celicah glij in celicah krvnih žil in ne na živčnih celicah. Histamin lahko preko H1R vzdraži nevrone v večini možganskih regij, vključno z možganskem debлом, hipotalamusom, talamusom, amigdalo, septumom, hipokampusom in možgansko skorjo [54]. Klasični antihistaminiki delujejo na receptor kot inverzni agonisti, ki stabilizirajo neaktivno obliko receptorja in imajo za posledico sedativne učinke [55]. Podobno deluje večina antidepresivov in antipsihotikov, ki jih danes uporabljamo.

- H2R

Razporeditev H2 receptorjev v možganih je v primerjavi s H1 receptorji bolj skladna s projekcijami histaminergičnih nevronov, iz česar lahko sklepamo, da poteka preko H2 receptorja večji del sinaptičnega sporočanja s histaminom. Gostejše izražanje H2 receptorja tako najdemo v bazalnih ganglijih, amigdali, hipokampusu in možganski skorji [56]. Odstotnost histamina zmanjša izražanje H2R, kar pa ne velja za izražanje H1R [57]. H2 antagonistično delovanje imajo nekateri antidepresivi [58].

- H3R

H3 receptorji so avtoreceptorji, ki uravnavajo sintezo in sproščanje histamina [59]. Prisotni so na presinaptičnih nevronih in kot heteroreceptorji lahko uravnavajo sproščanje tudi drugih nevrotransmiterjev: biogenih aminov, acetilholina, glutamata, GABA-e in nevropeptidov [47]. Največ H3 receptorjev najdemo v prednjem režnju možganske skorje, hipokampusu, amigdali, striatumu, malih možganih, črni substanci in možganskem deblu [60]. Na H3R se veže atipični nevroleptik klozapin [61].

- H4R

Vloga H4 receptorja še ni pojasnjena, verjetno pa ima stimulacija receptorja pomemben vpliv pri regulaciji vnetja in kemotaksi [62]. V večji meri ga najdemo na krvnih celicah, vranici, pljučih, jetrih in prebavilih, znotraj CŽS pa v možganski skorji in malih možganih [63]. 4-metilhistamin je selektivni agonist na H4 receptor [64].

Preglednica 1 Funkcionalne lastnosti histaminskih receptorjev v CŽS.

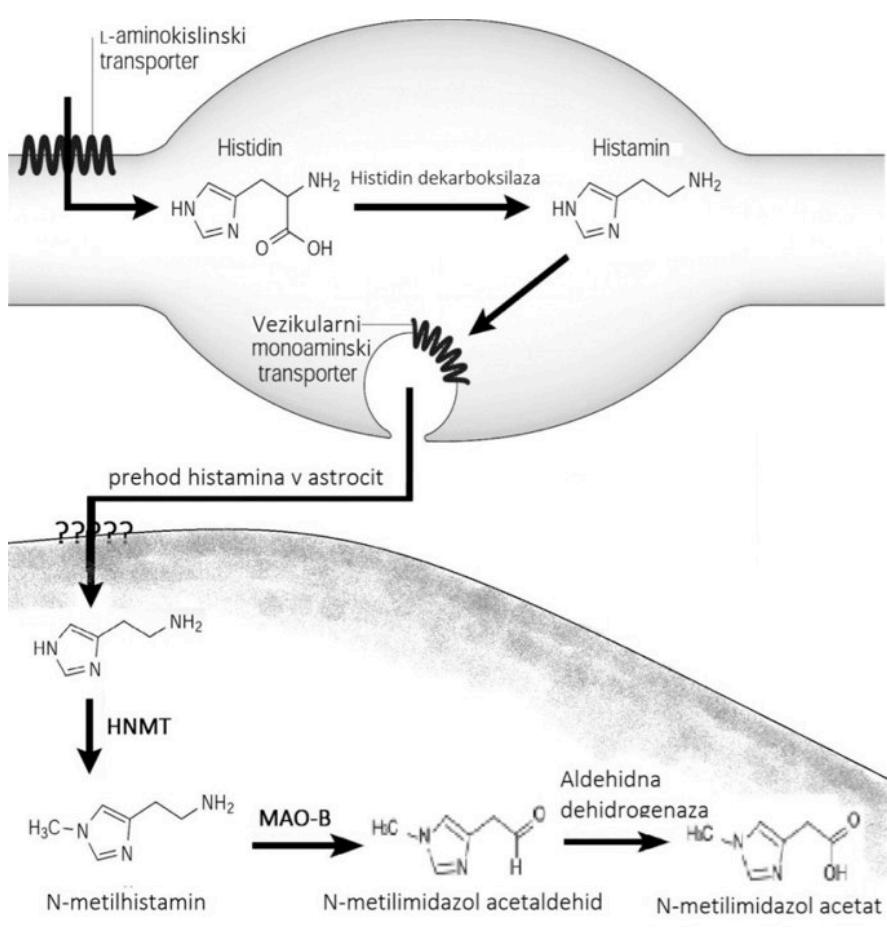
Prirejeno po [47].

LASTNOST	H1R	H2R	H3R	H4R
Celična funkcija	Postsinaptična vzdražnost in plastičnost.	Postsinaptična vzdražnost in plastičnost.	Presinaptično sproščanje nevrotransmiterjev in plastičnost.	Sproščanje vnetnih faktorjev, kemotaksa.
Sistemska funkcija	Stanje budnosti. Delovni spomin. Ritem prehranjevanja. Enrgijski metabolizem. Nadzor endokrinih funkcij.	Učenje. Spomin.	Višje možganske funkcije (zaznavanje, čutenje, učenje, spomin). Vzdrževanje hemato-encefalne bariere	Modlacija imunskega odziva.
Patofiziologija	Motnje spanja, razpoloženja, spomina, prehranjevanja, zasvojenost, bolečina	Shizofrenija. Bolečina.	Motnje spanja, razpoloženja, spomina, prehranjevanja, zasvojenost, bolečina.	Avtoimune bolezni ?

4.1.3 Sinteza in inaktivacija histamina

Sinteza histamina poteka z oksidativno dekarboksilacijo aminokisline L-histidin v živčnih celicah. Reakcijo katalizira encim histidin-dekarboksilaza [65]. Količina sintetiziranega histamina je odvisna od razpoložljivosti prekurzorja v možganih in je pod vplivom H3 receptorjev [59]. Histamin se shranjuje v telesu živčnih celic in še pogosteje v živčnih končičih. V sinaptične vezikle se prenaša preko energijsko odvisnega vezikularnega monoaminskega prenašalca (VMAT-2) [66].

Inaktivacija histamina v CŽS poteka z encimom histamin N-metil transferaza (HNMT) ob prisotnosti donorja metilne skupine, S-adenozil metionina. Nastali N-metilhistamin se v procesu oksidativne deaminacije z monoaminsko oksidazo (MAO-B) in oksidacije z aldehidno dekarboksilazo pretvori do N-metilimidazol acetata [47]. Potek sinteze in inaktivacije je podrobnejše prikazan na Sliki 5.

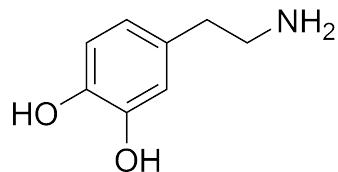


Slika 5 Shematski prikaz sinteze histamina v nevronu in njegove razgradnje v astrocytu.
Prirejeno po [53].

V CŽS najdemo encim HNMT v citosolu nevronov in celic glije ter v steni krvnih žil, ne pa v ekstracelularnem prostoru. Za inaktivacijo histamina je torej potreben prehod nevrotransmiterja v celico. Pri fiziološkem pH se histamin nahaja v ravnotežni zmesi tautomernih oblik. Monokation predstavlja 96%, dikation 3%, neprotonirana oblika pa izredno majhen delež celotnega histamina [67]. Biološko aktivni molekuli sta torej protonirani in ne moreta prosto prehajati celične membrane, temveč za to potrebujeta ustrezni prenašalec.

V perifernih tkivih poteka razgradnja histamina predvsem z zunajcelično diamin oksidazo (DAO), ki histamin neposredno pretvori v imidazol ocetno kislino. V CŽS zaradi zanemarljivo majhnega izražanja encima DAO reakcija ne poteka [47].

4.2 Dopamin



Slika 6 Kemijska formula dopamina.

Dopamin ali 3,4-dihidroksfenetilamin je količinsko prevladujoč kateholaminski nevrotransmiter v CŽS sesalcev. Poznane so štiri dopaminergične poti v možganih: nigrostriatna, mezolimbična, mezokortikalna in tuberoinfundibularna. Vloge posameznih dopaminergičnih poti so povzete v Preglednici 2. Na perifерiji dopamin vpliva na srčno-žilni sistem, sekrecijo hormonov, renalno funkcijo in motiliteto črevesja [68].

Preglednica 2 Dopaminergične poti v možganih: njihove fiziološke in patofiziološke vloge.
Prirejeno po [69].

POT	Mezokortikalna	Mezolimbična	Nigrostriatna	Tuberoinfundibularna
VLOGA	Načrtovanje, presoja, motivacija.	Nagrajevanje, motivacija.	Integracija spoznav, senzorično-motorična koordinacija, iniciacija gibanja.	Uravnavanje hormona prolaktina.
PATOFIZIOLOGIJA	Razvoj psihoz (tudi shizofrenija), razvoj odvisnosti od psikoaktivnih snovi.		Parkinsonova bolezen, Tourettov sindrom.	Motnje v delovanju spolnih organov, osteoporosa.

Sinteza dopamina poteka iz aminokisline L-tirozin, ki se z encimom tirozin-hidroksilazo najprej pretvori v L-dihidroksifenilanin (L-DOPA). V nadaljevanju L-DOPA vstopi v reakcijo, ki jo katalizira L-aromična aminokislinska dekarboksilaza (angl. L-aromatic amino acid decarboxylase, AADC) in vodi v nastanek dopamina [70].

Primarni mehanizem odstranjevanja dopamina iz sinaptičnega prostora poteka s ponovnim privzemom nevrotransmiterja preko dopaminskega aktivnega prenašalca (angl. dopamine active transporter, DAT), manjši delež pa z razgradnjo dopamina v sinaptičnem prostoru. Glavna metabolita dopamina v CŽS sta homovanilinska kislina (angl. homovanillic acid, HVA) in dihidroksifenil ocetna kislina (angl. dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC). V manjši meri se lahko dopamin razgradi tudi v 3-metoksitiramin (3-MT). Pretvorbo dopamina v DOPAC katalizira encim MAO in lahko poteka tako v citoplazmi nevrona kot v sinaptičnem prostoru. Po drugi strani pa je zaradi odsotnosti encima katehol-O-metiltransferaze (angl. catechol-*O*-methyltransferase, COMT) v intracelularnem prostoru, metabolizem dopamina v HVA možen le v sinaptičnem prostoru [70]. Pri podganah večina razgradnje dopamina poteka z nastankom DOPAC, pri človeku pa z nastankom HVA [71].

5. Prenašalne beljakovine

Prenašalne beljakovine se nahajajo v membrani vsake celice in skrbijo za prehod tistih molekul, ki na primer zaradi naboja ali velikosti ne morejo prehajati membrane s pomočjo navadne difuzije in so za celico nujno potrebne (glukoza, aminokisline, nukleotidi, vitamini, ioni itd.). Transport preko membranskega prenašalca za razliko od navadne difuzije ne poteka linearno. Prenašalci lahko substrat prenašajo v smeri koncentracijskega gradiента (olajšana difuzija) in v nasprotni smeri (primarni in sekundarni aktivni transport). V slednjem primeru je transport energetsko odvisen in poteka s hidrolizo ATP molekul ali indirektno, z izkoriščanjem elektrokemijskega gradienta [72]. V CŽS so membranski prenašalci odgovorni tudi za prehod nevrotransmiterjev iz zunajceličnega prostora v nevrone ali celice glije. Tako igrajo ključno vlogo pri vzdrževanju homeostaze nevrotransmiterja v sinaptičnem prostoru in regulaciji sinaptičnega prenosa signala, zato so danes tarča širokega spektra zdravil, ki se uporablajo za zdravljenje bolezni, kot so depresija, tesnoba, motnje koncentracije, hiperaktivno vedenje in epilepsija [73]. Prehod nevrotransmiterja lahko poteka na dva načina: preko visoko-afinitetnega, nizko-kapacitetnega prenašalnega sistema (privzem₁) ali preko nizko-afinitetnega, visoko-kapacitetnega prenašalnega sistema (privzem₂) [74].

5.1 Že znane prenašalne beljakovine, ki bi lahko bile odgovorne za prenos histamina v astrocite

Astrociti na svoji membrani izražajo prenašalne beljakovine za številne nevrotransmiterje, med drugim tudi za histamin in dopamin [75]. Večina jih sodi v skupino prenašalnih beljakovin za topljence (angl. solute carrier, SLC). V skupino SLC sodi približno 350 absorptivnih prenašalcev, razvršenih v 55 družin, ki so odgovorni za prenos različnih snovi v celico s pomočjo olajšane difuzije ali sekundarnega aktivnega transporta [72].

5.1.1 Dopaminski prenašalec

DAT je visokoafinitetni transportni protein, specializiran za privzem dopamina v živčno celico. Spada v skupino SLC6, za katere je značilen sekundaren aktiven simport. Za eno molekulo substrata se v citosol so-preneseta dva Na^+ in en Cl^- ion. Kot gonilo se izkorišča elektrokemijski gradient, ki ga vzdržuje Na^+/K^+ črpalka. DAT je zgrajen iz 620 aminokislin, ki so oblikovane v 12 transmembranskih domen. Domeni III in IV sta povezani tudi preko ekstracelularne glikozilirane zanke [72]. Ob utišanju gena za DAT se privzem dopamina v CŽS zmanjša na stopnjo privzema s pomočjo difuzije, kar prikazuje DAT kot glavni prenašalec za odstranjevanje dopamina iz sinaptičnega prostora [76]. Prav tako predstavlja ključni mehanizem za zagotavljanje zadostnih zalog dopamina v sinaptičnih vezklilih [77]. Nepravilno delovanje DAT je povezano s pojavom Parkinsonove bolezni, Tourettovim sindromom, shizofrenijo, motnjami pozornosti in zasvojenostjo [78]. Čeprav so študije pokazale, da so astrociti sposobni visoko afinitetnega privzema aminokislinskih nevrotransmiterjev in serotonina, pa zaenkrat niso uspele dokazati prisotnosti DAT [79]. Za privzem dopamina v astrocite je zaenkrat znano zgolj, da se privzema v od Na^+ odvisnem in Na^+ neodvisnem procesu in se po lastnostih razlikuje od prenašalnega sistema na živčnih celicah.

5.1.2 Organski kationski prenašalec 3

V skupino SLC22 uvrščamo tri organske kationske prenašalce (angl. organic cation transporter; OCT1, OCT2, OCT3), ki jih sestavlja 12 transmembranskih domen, velika glikozilirana zunajcelična zanka, ki povezuje domeni I in II in znotrajcelična zanka med domenama VI in VII. Gre za dvosmerne, od Na^+ in Cl^- neodvisne prenašalce, ki so široko izraženi po celotnem organizmu, predvsem v ledvicah, jetrih in placenti. V CŽS jih

najdemo tako na nevronih kot astrocitih. Med organske katione, ki predstavljajo substrat za OCT, spadajo številna zdravila, toksini in endogene snovi [80]. Sposobni so tudi odstranjevanja dopamina, noradrenalina, adrenalina, serotoninina in histamina iz sinaptičnega prostora [81]. Čeprav OCT opravlja nizkoafinitetni, visokokapacitetni transport (privzem₂), kaže večjo zmožnost prenašanja histamina napram drugim biogenim aminom [82]. Pomebno je omeniti, da je histamin substrat za podganji OCT2 in OCT3, ne pa za OCT1 [83]. Najširšo razporeditev v CŽS ima OCT3, medtem ko je med vsemi tremi najmanj OCT2. Številne študije kažejo na nižjo prisotnost [84] ali celo odsotnost [85] [86] OCT2 na astrocitih, vse pa zavračajo vpletost OCT2 pri privzemu histamina [87]. Za razliko od OCT2 je Yanai-jeva skupina potrdila prisotnost in pomembnejšo vlogo OCT3 pri privzemu histamina v človeške astrocite [86].

5.1.3 Membranski prenašalec za monoamine

Novo odkriti membranski prenašalec za monoamine (angl. plasma membrane monoamine transporter, PMAT) sodi v skupino SLC29. PMAT je 530 aminokislin dolg protein, oblikovan v 10 – 12 transmembranskih domen. Gre za od Na⁺ in Cl⁻ neodvisen, polispecifičen, nizko afinitetni, visoko kapacitetni (privzem₂), obojestranski prenašalec. Najdemo ga v možganih, ledvicah in skeletnih mišicah. Odgovoren je za prenos dopamina in serotoninina ter v nekoliko manjši meri tudi histamina, noradrenalina in adrenalina preko celične membrane [88] [89]. Čeprav študije potrjujejo prisotnost PMAT na človeških astrocitih [86] [88], pa dokaza, da PMAT gradi membrano podganjih astrocitov, še ni. Zanimivo je, da je Dahlinova skupina uspela dokazati razširjenost PMAT na nevronih po številnih regijah mišij možganov, ne pa na z GFAP označenih astrocitih [90]. Pri tem je potrebno opozoriti na možnost, da se vseh astrocitov ne da zazaznati s protitelesi, ki se vežejo na GFAP [91].

NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Histamin je edini nevrotransmiter iz skupine biogenih aminov, čigar visokospecifični prenašalec še vedno ostaja neznan. Za zdravljenje številnih možganskih bolezni se danes uporablajo zdravila, ki selektivno ali manj selektivno zavirajo privzem nevrotransmiterjev. Podobno bi lahko odkritje histaminskega prenašalca prineslo novo tarčno mesto za razvoj zdravil in učinkovitejše zdravljenje bolezni, kot so Parkinsonova bolezen, možganska kap in narkolepsijska. Za razliko od ostalih monoaminov se le manjši delež histamina privzema v nevrone. Glavno mesto privzema in inaktivacije histamina naj bi bili astrociti [92].

Da bi pripomogli k boljšemu razumevanju mehanizma odstranjevanja histamina iz sinaptičnega prostora, bomo preverili nekatere lastnosti njegovega prenosa preko membrane. Glede na to, da v določenih bolezenskih stanjih lahko pride do povišanja kislosti telesnih tekočin, nas bo zanimal predvsem vpliv pH na prenos histamina. Večina raziskovalcev se posveča zgolj prenosu histamina proti notranjosti celice, mi pa bomo preverjali lastnosti dvosmernega prenosa, torej tudi sproščanje histamina iz astrocitov.

V eni izmed raziskav je prisotnost monoaminov zmanjšala privzem histamina v astrocite. Pri tem je privzem histamina najbolj inhibiral dopamin [93]. V drugem delu magistrske naloge bomo zato preverili morebiten vpliv nekaterih dopaminu podobnih snovi na privzem in sproščanje histamina iz astrocitov.

Pred kratkim je Yanaijeva skupina dokazala, da se večina histamina v človeške astrocite prenaša preko PMAT, manjši delež pa preko OCT3 [86]. Ker sta tako histamin kot dopamin substrat za PMAT, bomo z omenjenim poskusom preverili tudi možno vpletenost PMAT pri prenosu histamina v podganje astrocite.

V magistrski nalogi bomo preverili naslednje hipoteze:

1. Prenos prek prenašalca za nevrotransmiter je aktiven, dvosmeren proces.
2. Privzem nevrotransmiterja poteka optimalno v fizioloških razmerah: pri telesni temperaturi, ustrezni sestavi inkubacijskega medija, fiziološki vrednosti pH.
3. Histamin se lahko privzema preko membranskega prenašalca za monoamine (PMAT).
4. Dopamin je substrat za PMAT, zato bodo njemu podobne snovi zmanjšale privzem histamina v astrocite.

MATERIALI IN METODE

Vsi poskusi so bili izvedeni v laboratoriju Inštituta za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

1. Reagenti in oprema

Preglednica 3 Uporabljeni reagenti in oprema pri izolaciji kulture astrocitov.

Reagenti	Proizvajalec
Goveji serumski albumin (BSA)	Sigma, ZDA
Gentamicin	Gibco, Velika Britanija
Raztopino Leibovitz 15	Sigma, ZDA
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
0.05% raztopino tripsin EDTA	Gibco, Velika Britanija
Citozin arabinozid	Sigma- Aldrich, ZDA

Oprema	Proizvajalec
Inkubator	New Brunswick Scientific, ZDA; Binder, Nemčija
Plastične posode za gojenje celic s perforiranim zamaškom	TPP, Švica
Laboratorijski stresalnik	tehnicna Železniki, Slovenija
Laboratorijske igle	TIK d.o.o., Slovenija
Niteks membrane	ZBF, Švica
Brezprašna komora z laminarnim pretokom zraka	Iskra, Slovenija
Namizna centrifugirka	Sigma 3K18, ZDA
Centrifugirke	TPP, Švica; Eppendorf, Avstrija

Preglednica 4 Seznam uporabljenih reagentov in opreme pri izvajanju poskusov v kulturah astrocitov.

Reagenti	Proizvajalec
^3H -histaminijev diklorid, 0,75 M, s specifično aktivnostjo 10,6 Ci/mmol	Perkin-Elmer, ZDA
L-DOPA	Aldrich, ZDA
Apomorfín	Sandoz, Švica
HEPES	Sigma, ZDA
NaCl	Zorka Šabac
KCl	Merck, Nemčija
KH_2PO_4	Merck, Nemčija
$\text{MgSO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sigma, ZDA
CaCl_2	Sigma, ZDA
Brezvodna D-(+)-Glukoza	Merck, Nemčija

Oprema	Proizvajalec
Tehtnica	Sartorius, Nemčija
Mikrotitrsko plošče z 12 razdelki	TPP, Švica
Vortex	Tehtnica Železniki, Slovenija
Pipete	Eppendorf, Avstrija; Gilson, ZDA
Nastavke za pipete	Eppendorf, Avstrija; Gilson, ZDA
Epruvete, viale	Eppendorf, Avstrija
Hladilnik, zamrzovalnik	Gorenje, Slovenija

Detekcijo radioaktivnega izotopa smo izvedli s scintilacijskim števcem (Perkin-Elmer) ob uporabi scintilacijske tekočine Aquasol (zmes organskih topil, NEN, ZDA).

Za proteinsko analizo vzorcev smo uporabili Bio-Rad Protein Assay (raztopino fosforne kisline in metanola) in Bio-Rad Protein Standard I (liofilizirani goveji plazemski gama globulin). Obe sta proizvoda družbe Bio-Rad iz Velike Britanije. Uporabljali smo mikrotitrsko plošče s 96 razdelki in spektrofotometer (Tecan Group Ltd.) ter že omenjene pipete, nastavke za pipete in epruvete.

2. Poskusne živali

Ker za preverjanje naših hipotez ni ustreznega neživalskega modela, smo kot vir tkiva uporabili možgane neonatalnih (3 dni starih) podgan vrste Rattus norvegicus seva Wistar obeh spolov. Na izbiro živalske vrste so vplivali predvsem sledeči razlogi: možnost prenosa ugotovitev v humano medicino, primerjave z že objavljenimi študijami in lahka dostopnost. Za izvajanje poskusov na živalih smo pridobili dovoljenje Veterinarske uprave Republike Slovenije: 34401-1/2010/8. Uporabili smo čim manjše možno število živalskih vzorcev in poskrbeli za preprečevanje nepotrebnega trpljenja laboratorijskih živali. Kot najbolj primeren način evtanazije smo izbrali dekapitacijo.

3. Eksperimentalne metode

3.1 Izolacija in priprava kulture astrocitov

Dekapitacijo je opravil laboratorijski tehnik z dovoljenjem za evtanazijo živali. Iz lobanje smo nato pod aseptičnimi pogoji previdno odstranili možgane in jih potopili v preparacijsko raztopino, ki je vsebovala Leibowitz L-15 z dodatkom 1mg/ml BSA in 25 μ M/ml gentamicina. Odstranili smo možganske ovojnice, striatum, hipokampus, talamus, hipotalamas, hipofizo in možgansko deblo. Tkivo smo razdrobili izmenično s 4-minutnim centrifugiranjem pri 1200 obratih/min in s pomočjo pipet ter injekcijskih igel različnih debelin (0,9 μ m 0,7 μ m in 0,5 μ m). Po mehanskem drobljenju z injekcijskimi iglami smo suspenzijo celic prefiltrirali skozi sterilno Niteks membrano z velikostjo por 75 μ m. Filtrat smo še zadnjič (četrtič) centrifugirali, a odlitega supernatanta nismo zamenjali z novo raztopino L-15, temveč s hranilnim medijem za gojenje celičnih kultur. Hranilni medij je sestavljal Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) z visoko koncentracijo glukoze z dodanim FBS (10% (V/V)), piruvatom (1 mM), L-glutaminom (2 mM) in gentamicinom (25 μ g/mL). Suspenzijo celic smo nekajkrat premešali s pipeto in jo postavili v inkubator z atmosfero CO₂ 5%, zrak 95% in s konstantno temperaturo 37°C. Hranilini medij smo zamenjali 2-krat tedensko.

Ko so celice postale konfluentne, smo jih preko noči izpostavili stresanju pri 200 obratih/min. Postopek smo ponovili še 2-krat in vsako jutro zamenjali hranilni medij. S tem smo kulturo očistili običajno prisotnih celic mikroglije, ki se stene posode ne oprimejo tako učinkovito kot astrociti. Primarna kultura astrocitov je lahko kontaminirana tudi s

fibroblasti. V ta namen smo kulturo "tripsinizirali", jo presadili na novo gojišče in 24 ur gojili v prisotnosti citozin arabinozida, citostatika, ki onemogoči rast fibroblastom. Po 24 urah smo medij zamenjali s hranilnim in celice gojili do ponovne konfluentnosti. Spet smo izvedli postopek 3-kratnega stresanja preko noči in celice presadili v gojilne posode z 12 vdolbinicami. Tako pripravljena kultura je sestavljena iz vsaj 90% astrocitov [94] in je bila po nadaljnih treh tednih gojenja v inkubatorju pripravljena za izvedbo poskusa.

3.2 Priprava pufra za privzem

Pred pričetkom poskusov smo kulturi astrocitov odstranili medij DMEM in poskuse izvajali s pomočjo pufra za privzem. Pripravili smo ga po standardni recepturi, ki je prikazana v Preglednici 5.

Preglednica 5 Sestava pufra za privzem histamina

Substanca	Količina	Koncentracija
HEPES	5,958 g	25 mM
NaCl	7,306 g	125 mM
KCl	0,358 g	4,8 mM
KH ₂ PO ₄	0,163 g	1,2 mM
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,296 g	1,2 mM
CaCl ₂	1,009 g	1,7 mM
Glukoza	0,250 g	5,6 mM
bidestilirana H ₂ O	do 1000 ml	

pH pufra za privzem smo uravnnavali z 0,1N NaOH do vrednosti pH 6,6 , 7,0 ali 7,4.

3.3 Vpliv vrednosti pH inkubacijskega medija na privzem histamina

Astrocite v kulturi smo najprej dvakrat sprali s pufrom za privzem s sledečo sestavo: Pri tem smo uporabili pufre za privzem s tremi različnimi vrednostmi pH: pH 6,6; pH 7,0 in pH 7,4. Nato smo dodali radioaktivno označen histamin (³H-histamin) v koncentracijskem območju 0,125 µM – 200 µM in vzorce v omenjenem pufru inkubirali optimalen čas za privzem (20 minut) [23]. Po 20 minutah smo reakcijo prekinili tako, da smo plošče z vzorci postavili na led in jih 4-krat sprali z mrzlim pufrom za privzem, v odsotnosti Ca²⁺ ionov (Ca²⁺ povzroči sproščanje veziklov z nevrotransmpterjem – histaminom, ki so v manjši meri prisotni tudi na astrocitih, v zunajcelični prostor). Celice smo nato lizirali z dodatkom 300 µL 0,5 M NaOH in jih stresali 10 minut pri 200 obratih na minuto s

stresalnikom. Iz vsake vdolbinice smo vzeli po 250 µL suspenzije celic, jih prestavili v viale in dodali 1500 µL scintilacijske raztopine Aquasol. Viale smo postavili v scintilacijski števec (ali β -števec), ki meri število β razpadov radioaktivnega izotopa na časovno enoto. Preostanek vzorca (približno 50 µL) smo uporabili za izračun celokupne vrednosti proteinov.

3.4 Vpliv vrednosti pH inkubacijskega medija na sproščanje histamina

Astrocite v kulturi smo predinkubirali 30 minut pri 37°C v pufru za privzem. Pri tem smo uporabili pufre za privzem s tremi različnimi vrednostimi pH: pH 6,6; pH 7,0 in pH 7,4. Po 30 minutah smo dodali ^3H -histamin v koncentracijskem območju 0,125 µM – 200 µM in inkubirali še 20 minut pod enakimi pogoji. Vzorce smo nato 4-krat sprali s pufrom za privzem, ki tokrat ni vseboval Ca^{2+} . Celice smo v omenjenem pufru, ogretem na 37°C, inkubirali še 15 minut. Iz vsake vdolbinice smo vzeli po 500 µL vzorca, ga prestavili v viale, dodali 1500 µL scintilacijske raztopine Aquasol in jih postavili v β -števec. Preostanek tekočine v ploščicah smo zavrgli in v vsako vdolbinico dodali po 300 µL 0,5M NaOH. Z liziranimi celicami smo v nadaljevanju ravnali enako kot z liziranimi celicami pri že opisanem postopku privzema histamina.

3.5 Privzem histamina ob prisotnosti dopaminergičnih učinkovin

Astrocite v kulturi smo najprej dvakrat sprali s pufrom za privzem s pH 7,4. Dodali smo različne koncentracije levodope in apomorfina (po 60 µL, koncentracijsko območje pripravljenih raztopin je bilo 0,01 – 100 mM) in vzorce v pufru za privzem inkubirali 20 minut pri 37°C. Nato smo v vsak vzorec dodali po 100 µL 0,75 µM raztopine ^3H -histamina in ponovno inkubirali 20 minut. Plošče smo po zaključeni inkubaciji postavili na led, jih 4-krat sprali pufrom za privzem brez Ca^{2+} in celice lizirali z dodatkom 300 µL 0,5M NaOH. Postopek je bil v nadaljevanju enak prejšnjim.

3.6 Sproščanje histamina ob prisotnosti dopaminergičnih učinkovin

Astrocite v kulturi smo predinkubirali 30 minut pri 37°C v pufru za privzem s pH 7,4. Po 30 minutah smo dodali 100 µL 0,75 µM raztopine ^3H -histamina in inkubirali pod enaki

pogoji še 20 minut. Po zaključeni inkubaciji smo vzorce 4-krat sprali s pufrom za privzem brez Ca²⁺. Dodali smo levodopo in apomorfin v različnih koncentracijah (10⁻⁶ - 10⁻² M) in celice inkubirali 15 minut v pufru za privzem, ogretem na 37°C, v odsotnosti Ca²⁺ ionov. Nato smo odvzeli po 500 µL vzorca, ga prestavili v viale, dodali 1500 µL scintilacijske raztopine Aquasol in jih postavili v β-števec. Preostanek tekočine v ploščicah smo zavrgli in v vsako vdolbinico dodali po 300 µL 0,5M NaOH. Postopek je bil v nadaljevanju enak prejšnjim.

3.7 Izračun koncentracije histamina v vzorcu

Količino privzetega ali spoščenega histamina smo določili tako, da smo s scintilacijskim števecem izmerili aktivnost ³H-histamina, ki ob razpadu oddaja β-sevanje. Raztopina Aquasol, ki smo jo dodali vzorcem, je zmes aromatskih topil z dodatkom scintilatorjev. Scintilator je snov, ki sprejme energijo nastalega visokoenergijskega delca (elektrona ali pozitrona) pri β-razpadu in jo izrazi v obliki svetlobe. Svetlobni signal zazna scintilacijski števec preko dveh fotopomnoževalk in ga pretvori v računsko količino CPM (count per minute) in/ali DPM (disintegration decay per minute – število β-razpadov radioaktivnega izotopa na minuto).

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

V idealnih okolišinah vsak β-razpad povzroči svetlobni signal. Signali, ki ne dospejo do obeh fotopomnoževalk, se smatrajo kot šum ozadja. Vrednostim DPM smo zato odšteli srednjo vrednost DPM slepega vzorca. S pomočjo sledeče enačbe smo izračunali koncentracijo ³H-histamina v vzorcu.

$$c(mol) = \frac{DPM \times mol}{Ci}$$

$$Ci (\text{specifična aktivnost izotopa}) = 2,332 * 10^{12}$$

3.8 Bradfordova metoda določanja celokupnih proteinov

Celokupno vrednost proteinov smo merili z namenom, da ugotovimo količino celic, prisotnih v posameznem vzorcu. Metoda temelji na nekovalentni vezavi barvila Coomassie Brilliant Blue G-250 na nepolarne dele proteina v kislih pogojih. Nastali kompleks protein-barvilo okrepijo poleg van der Waalsovih tudi ionske vezi. Barvilo pri tem preide iz kationske v anionsko obliko, kar opazimo kot spremembo barve iz rdeče v modro. Maksimum absorbance modroobarvanega kompleksa je pri valovni dolžini 595 nm. Količino nastalih kompleksov oziroma koncentracijo proteinov tako določimo iz porasta absorbance vzorca pri omenjeni valovni dolžini. Kot pri drugih spektrofotometričnih metodah je tudi pri Bradfordovi odnos med absorbanco in koncentracijo kompleksa linearen v dokaj ozkem območju – med 0 µg/ml in 2000 µg/ml [95]. Vzorce je bilo zato potrebno pred meritvijo ustrezno redčiti.

Poskus smo izvajali v dveh paralelkah. Iz vsakega vzorca smo vzeli smo po 5 µL premešane vsebine in jo prestavili v ploščo s 96 predelki. V vsak predelek smo dodali 155 µL bidestilirane vode in 40 µL barvila BioRad. V isti plošči smo pripravili tudi slepi vzorec in vzorce standardov, ki so vsebovali raztopine 0,5 µM, 1 µM, 1,6 µM, 2 µM, 4 µM, 6 µM in 10 µM BSA v bidestilirani vodi in 40 µL BioRad reagenta. Tako pripravljenim vzorcem smo po 30 minutah izmerili vrednosti absorbance pri 595 nm z UV-VIS spektrofotometrom. Odšteli smo jim povprečno vrednost slepega vzorca in jih prenesli v računalniški program GraphPad Prism. Z znanimi koncentracijami standardov smo narisali umeritveno krivuljo in s pomočjo linearne regresije odčitali koncentracije proteinov v posameznih vzorcih. Ker smo za vsak vzorec izvedli dve meritvi, smo kot končno vsebnost proteinov upoštevali srednjo vrednost obeh.

4. Statistična obdelava podatkov

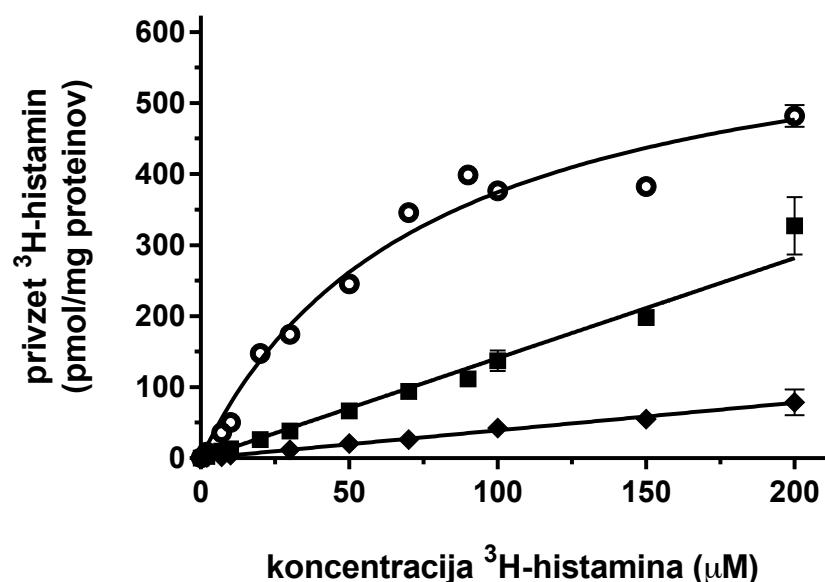
Vsi poskusi so bili izvedeni najmanj v 3 paralelkah in v vsaj treh ponovitvah (torej je bilo za vsako točko opravljenih najmanj 9 meritev). Pri izražanju rezultatov smo uporabili dva podatka: vsebnost histamina, pridobljeno s pomočjo scintilacijskega števca, in vsebnost proteinov, izmerjeno po Bradfordovi metodi. Rezultat smo prikazali kot vsebnost privzetega ali sproščenega histamina v fmol/mg proteinov. Pri poskusih interakcije privzema in sproščanja histamina z dopaminergičnimi učinkovinami smo rezultate

prikazali kot odstotek odstopanja od kontrolne vrednosti, ki označuje prenos histamina preko celične membrane v odsotnosti dopaminergične učinkovine. Rezultate smo prikazali kot aritmetično sredino s standardno napako aritmetične sredine (angl. standard error of the mean, SEM). Podatke smo analizirali s Studentovim t-testom za neodvisne vzorce ali z enosmerno ANOVO, v primeru primerjave več skupin podatkov. Mejo za statistično značilne razlike smo postavili pri $p < 0,05$. Za statistično analizo smo uporabili program GraphPad Prism 6.

REZULTATI

1. Koncentracijska odvisnost prenosa histamina pri različnih vrednostih pH medija

Astrocite neonatalne podgane smo 20 minut inkubirali z različnimi koncentracijami histamina ($0,125 \mu\text{M}$ – $200 \mu\text{M}$) pri temperaturi 37°C in pri treh različnih vrednostih pH. Pri vseh treh vrednostih pH je prišlo do jasnega koncentracijsko odvisnega privzema ^3H -histamina, pri katerem pa niti pri navišji koncentraciji histamina ni prišlo do nasičenja sistema. Privzem histamina se je zniževal z višanjem koncentracije H^+ ionov v delovnem mediju (Slika 7).

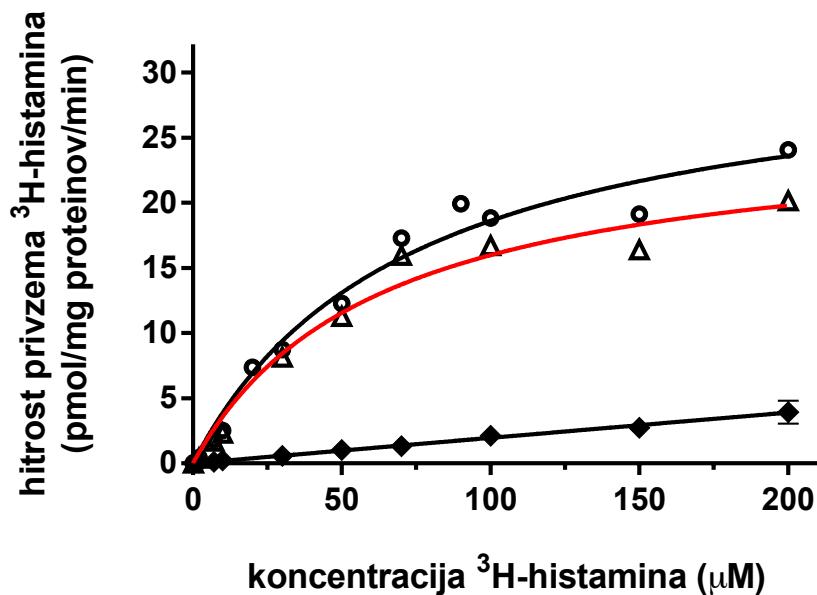


Slika 7 Koncentracijska odvisnost privzema histamina v kulturno astroctov.

Neonatalne astrocite smo 20 minut inkubirali pri temperaturi 37°C ob prisotnosti medija s pH 7,4 (○), 7,0 (■) in 6,6 (◆). Krivulje smo narisali s pomočjo nelinearne regresije, pri čemer so vrednosti R^2 znašale 0,98 (○), 0,97 (■) in 0,93 (◆). Točke, označene na grafu, predstavljajo povprečno vrednost meritev +/- SEM. Število vzorcev ($n = 3 - 6$) pri koncentracijah histamina 100 mM in 150 mM je bilo 6 ter 3 pri vseh ostalih merjenih koncentracijah.

Ker ne poznamo inhibitorja specifičnega histaminskega prenašalca, smo nespecifični privzem merili v pogojih, nezdružljivih z življenjem, ko aktivni transport ne deluje več (pri pH 6,6). Celokupni privzem smo prikazuli s krivuljo privzema pri fiziološkem pH (7,4).

Specifičen privzem histamina smo izračunali kot razliko med celokupnim in nespecifičnim privzemom. Obsegal je 84 – 94 % celokupnega privzema, odvisno od koncentracije dodanega histamina (Slika 8). Specifični privzem lahko izmerimo tudi iz razlike med celokupnim privzemom pri 37 °C in nespecifičnim privzemom pri 4 °C. Na ta način smo v našem laboratoriju v preteklosti že izračunali, da specifični privzem obsega do 75% celokupnega privzema [96].



Slika 8 Specifični privzem histamina v kulturo astroctov.

Specifični privzem (Δ) smo izračunali kot razliko med celokupnim (\bullet) in nespecifičnim (\blacklozenge) privzemom. Krivuljo specifičnega privzema smo narisali s pomočjo nelinearne regresije ($R^2 = 0,98$), točke pa prikazujejo povprečno vrednost meritev +/- SEM.

Na podlagi meritev smo določili hitrost privzema ${}^3\text{H}$ -histamina in s pomočjo nelinearne regresije izračunali kinetične parametre specifičnega privzema histamina v astrocyte. Michaelis-Mentenova konstanta (K_m) je znašala $62,47 \pm 14,82 \mu\text{M}$, maksimalna hitrost privzema (V_{max}) pa $25,98 \pm 2,447 \text{ pmol}/\text{mg proteinov}/\text{min}$. Razmerje med V_{max} in K_m imenujemo učinkovitost privzema in je bila $0,42 \mu\text{L}/\text{mg proteinov}/\text{min}$. Potrebno je omeniti, da se rezultati meritev lahko razlikujejo od dejanskih vrednosti zaradi izgub histamina, ki se veže na histaminske receptorje na astrocytu.

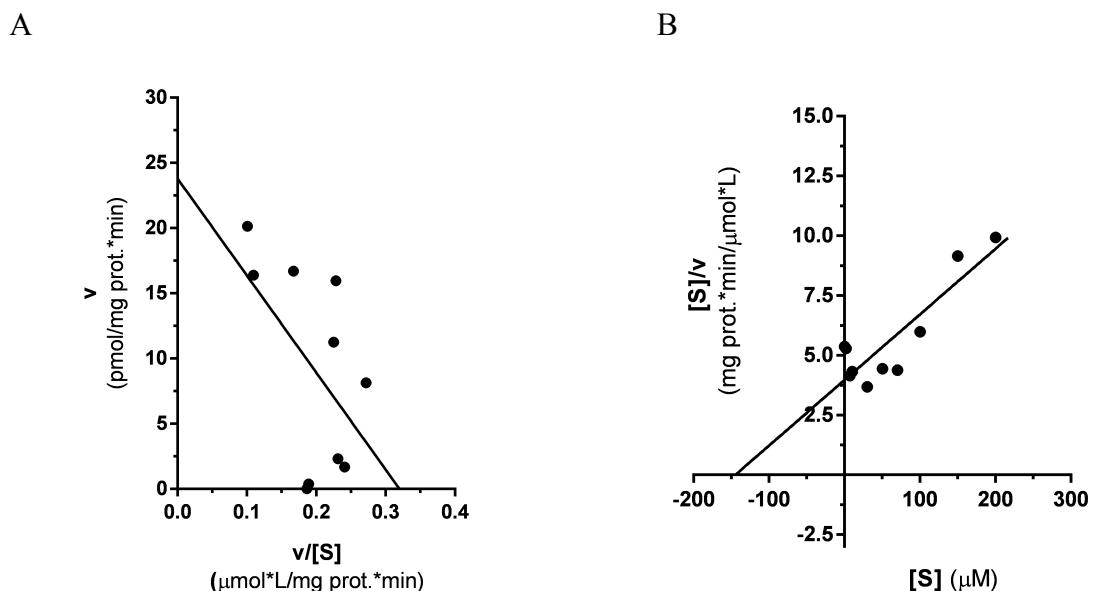
Specifičen privzem histamina smo v nadaljevanju prikazali tudi s pomočjo Eadie-Hofsteevega diagrama in Hanes-Woolfovega diagrama (Slika 9). Eadie-Hofsteejev graf na ordinati ohrani podatkov hitrosti privzema histamina, na abscisi pa prikazuje hitrost privzema histamina/koncentracijo ${}^3\text{H}$ -histamina. Hanes-Woolfov graf prikazuje

koncentracijo ${}^3\text{H}$ -histamina/hitrost privzema histamina na ordinati in ohrani prikaz koncentracije ${}^3\text{H}$ -histamina na abscisi. Transformacija Michaelis-Mentenove enačbe (enačba 1) po Hanes-Woolfovemu prikazuje enačba 2, Eadie-Hofsteejevo transformacijo pa enačba 3. Omenjene transformacije podatkov nam omogočijo, da z uporabo linearne regresije izračunamo kinetične parametre specifičnega privzema histamina.

$$V = \frac{[S]V_{\max}}{[S] + K_m} \quad (1)$$

$$\frac{[S]}{V} = \frac{1}{V_{\max}} [S] + \frac{K_m}{V_{\max}} \quad (2)$$

$$V = -\frac{K_m V}{[S]} + V_{\max} \quad (3)$$

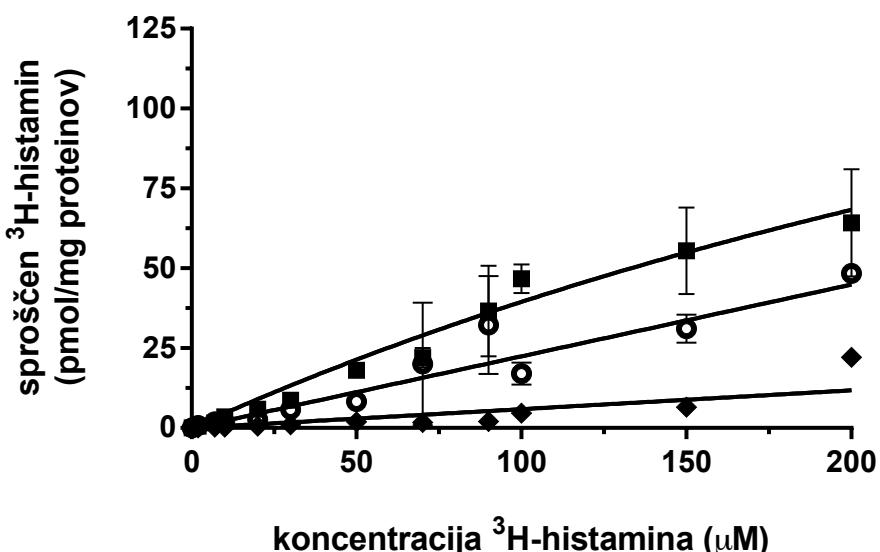


Slika 9 Grafični prikaz kinetičnih parametrov specifičnega privzema histamina v astrocyte.

(A) **Eadie-Hofsteejev diagram:** v predstavlja hitrost privzema ${}^3\text{H}$ -histamina, $[S]$ pa koncentracijo ${}^3\text{H}$ -histamina. Presečišče premice z ordinatno osjo je enako V_{\max} , presečišče premice z abscisno osjo je enako V_{\max}/K_m sistema, naklon premice pa je enak $-K_m$. Premica je bila narisana s pomočjo linearne regresije ($R^2 = 0,29$). (B) **Hanes-Woolfov diagram:** v predstavlja hitrost privzema ${}^3\text{H}$ -histamina, $[S]$ pa koncentracijo ${}^3\text{H}$ -histamina. Presečišče premice z abscisno osjo je enako $-K_m$, presečišče premice z ordinatno osjo je enako K_m/V_{\max} , naklon premice pa je enak $1/V_{\max}$. Premica je bila narisana s pomočjo linearne regresije ($R^2 = 0,77$).

Glede na Eadie-Hofsteejev diagram je znašala K_m 74,38 μM (95% interval zaupanja 169,60 – 20,82), V_{max} pa 23,80 (4,56 – 43,03) pmol/mg proteinov/min. Hanes-Woolfov diagram je pokazal sistem z K_m 144,9 μM (95% interval zaupanja 318,40 – 76,16 μM) in V_{max} 36,45 (66,27 – 25,14) pmol/mg proteinov/min.

Nadaljevali smo s preverjanem sproščanja histamina. Astrocite smo, enako kot pri postopku ugotavljanja privzema histamina, 20 minut inkubirali pri temperaturi 37°C pri treh različnih vrednostih pH. Ugotovili smo, da je tudi sproščanje histamina v vseh treh pH okoljih koncentracijsko odvisno. Največ histamina se je sprostilo pri pH 7, najmanj pa pri pH 6,6 (Slika 10).

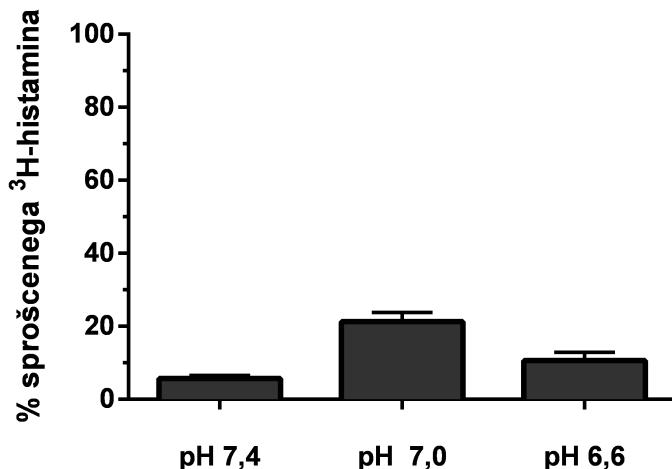


Slika 10 Koncentracijska odvisnost sproščanja histamina iz kulture astroctov.

Neonatalne astrocite smo 20 minut inkubirali pri temperaturi 37 °C ob prisotnosti medija s pH 7,4 (○), 7,0 (■) in 6,6 (◆). Krivulje smo narisali s pomočjo nelinearne regresije, pri čemer so vrednosti R^2 znašale 0,81 (○), 0,92 (■) in 0,65 (◆). Točke na grafu predstavljajo povprečno vrednost meritev +/- SEM. Število ponovitev ($n = 3 – 6$) je znašalo 6 pri koncentracijah histamina 100 mM in 150 mM ter 3 pri vseh ostalih merjenih koncentracijah.

Rezultate privzema in sproščanja smo nato združili in prikazali na Sliki 11. Največ privzetega histamina se je sprostilo iz astrocitov inkubiranih v okolju s pH 7,0 (19 – 24 %). Pri fiziološkem pH se je sprostilo najmanj, vsega 5 – 7 %, privzetega histamina. Od 8 do 13 % privzetega histamina se je sprostilo ob inkubiranju kulture astroctov v kislih pogojih (pH 6,6). Za statistično primerjavo količine sproščenega histamina pri različnih vrednostih pH smo zaradi večjega števila primerjav uporabili enosmerni test ANOVA. Izkazalo se je, da obstaja statistično značilna razlika med količino sproščenega histamina pri pH 7,0 in

fiziološkim pH ter med količino sproščenega histamina pri pH 7,0 in pH 6,6. Statistična primerjava pa ni pokazala statistično pomembnega razlikovanja v sproščanju histamina pri pH 6,6 in fiziološkem pH.



Slika 11 Prikaz sproščanja histamina glede na njegov privzem.

Izračunali smo, koliko privzetega histamina se je sprostilo po inkubaciji pri različnih pH vrednostih medija z uporabo ^3H -histamina v koncentracijskem območju $0,125 \mu\text{M} - 200 \mu\text{M}$. Pri pH 7,4 se je sprostilo $5,7 +/- 0,8\%$, pri pH 7,0 $21,3 +/- 2,5\%$ in pri pH 6,6 $10,6 +/- 2,3\%$. Vrednosti predstavljajo povprečno vrednost meritev +/- SEM.

2. Vpliv dopaminergičnih učinkovin na prenos histamina v astrocite

V preteklosti je bilo v našem laboratoriju že ugotovljeno, da biogeni amini v višjih koncentracijah ($0,1 \text{ mM} - 10 \text{ mM}$) zavirajo privzem histamina. Pri tem je največjo stopnjo inhibicije izkazoval dopamin [93]. Najnovejše raziskave Yanayijeve skupine kot glavni prenašalni sistem histamina v človeške astrocite navajajo PMAT, ki dokazano prenaša tudi dopamin. Da bi ugotovili povezanost prenašalnih sistemov za histamin in dopamin, smo v drugem delu diplomskega dela preverili morebiten vpliv dopaminu podobnih snovi na privzem in sproščanje histamina iz astrocitov neonatalnih podgan.

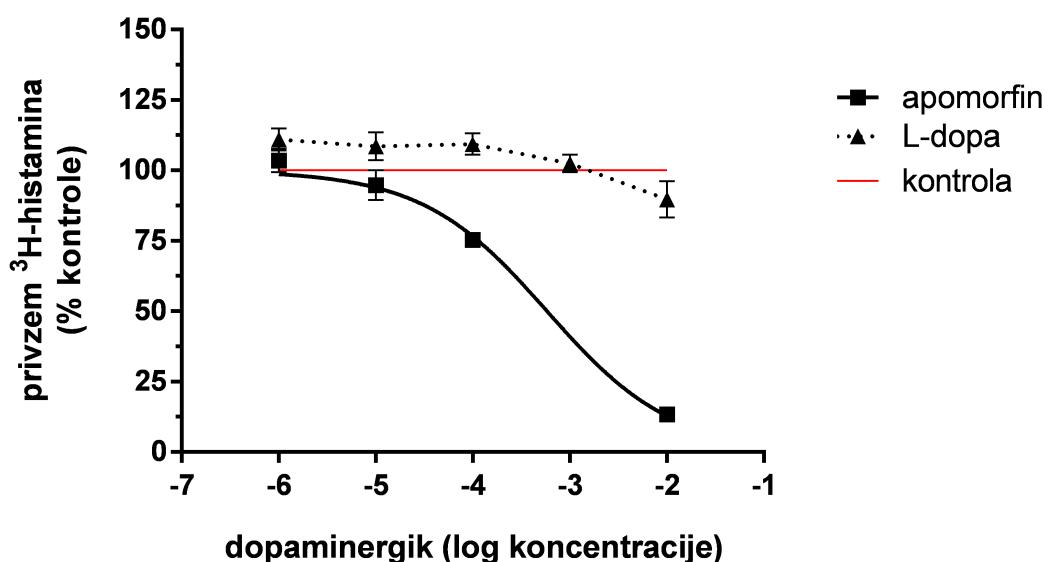
Astrocite smo pred dodatkom $0,75 \mu\text{M}$ raztopine ^3H -histamina 20 minut inkubirali z dopaminergičnimi učinkovinami. Uporabili smo neselektivni agonist na dopaminski receptor apomorfin, prekurzor dopamina levodopo in antagonist na dopaminske receptorje klorpromazin.

Apomorfín je v koncentracijskem območju 0,1 mM – 10 mM zavrl privzem histamina z IC₅₀ 0,58 mM, ostali učinkovini pa na privzem histamina nista imeli vpliva.

Rezultati kažejo, da se je z višanjem koncentracije dodanega apomorfina, zmanjševal privzem histamina v astrocite. Statistično razlikovanje od kontrolne vrednosti (količine privzetega histamina v odsotnosti dopaminergične učinkovine) smo s Studentovim t-testom za neodvisne vzorce zaznali pri koncentracijah 0,1 mM in 10 mM. Potrebno je omeniti, da nam kljub številnim ponovitvam poskusa ni uspelo izmeriti količine privzetega histamina ob inkubaciji z apomorfinom v koncentraciji 1 mM, saj so v teh pogojih celice odstopile od podlage in se med poskusom izgubile. V najvišji uporabljeni koncentraciji, 10 mM, je apomorfín zmanjšal celokupni privzem histamina za 87%.

Inkubiranje celic z levodopo je nasprotno pokazalo manjši učinek na privzem histamina. V treh najšibkejših koncentracijah prekurzorja smo izmerili rahlo povišanje privzema histamina glede na kontrolno vrednost, v najmočnejši koncentraciji pa znižanje. Nobena od izmerjenih vrednosti od kontrolne ni statistično značilno odstopala ($p > 0,05$).

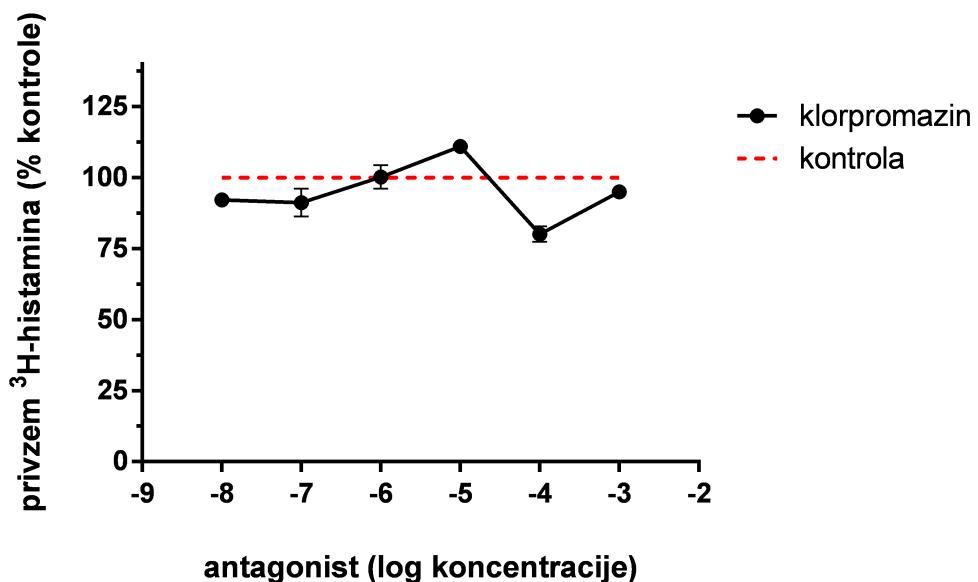
Vpliv apomorfina in levodope na privzem histamina prikazuje Slika 12.



Slika 12 Vpliv dopaminergičnih učinkovin na privzem histamina v astrocite.

Astrocite smo pri standardnih pogojih (37 °C, pH 7,4) 20 min inkubirali z dopaminergičnimi učinkovinami, nato dodali 125 nM ³H-histamin in izmerili količino privzetega histamina. Rezultati so predstavljeni kot odstotek celokupnega privzema histamina izmerjenega v odsotnosti dopaminergične učinkovine (100% = 209 +/- 26 fmol/mg proteinov). Krivulja, ki predstavlja vpliv apomorfina, je narisana s pomočjo nelinearne regresije ($R^2 = 0,93$). Vse točke prikazujejo povprečno vrednost meritev +/- SEM ($n = 15$).

Klorpromazin v koncentracijskem območju $0,01 \mu\text{M} - 1 \text{ mM}$ ni značilno vplival na privzem histamina v neonalne astrocite (Slika 13). Od kontrolne vrednosti se statistično ločijo izmerjene vrednosti pri inkubaciji s klorpromazinom v koncentracijah $0,01 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ in $100 \mu\text{M}$.



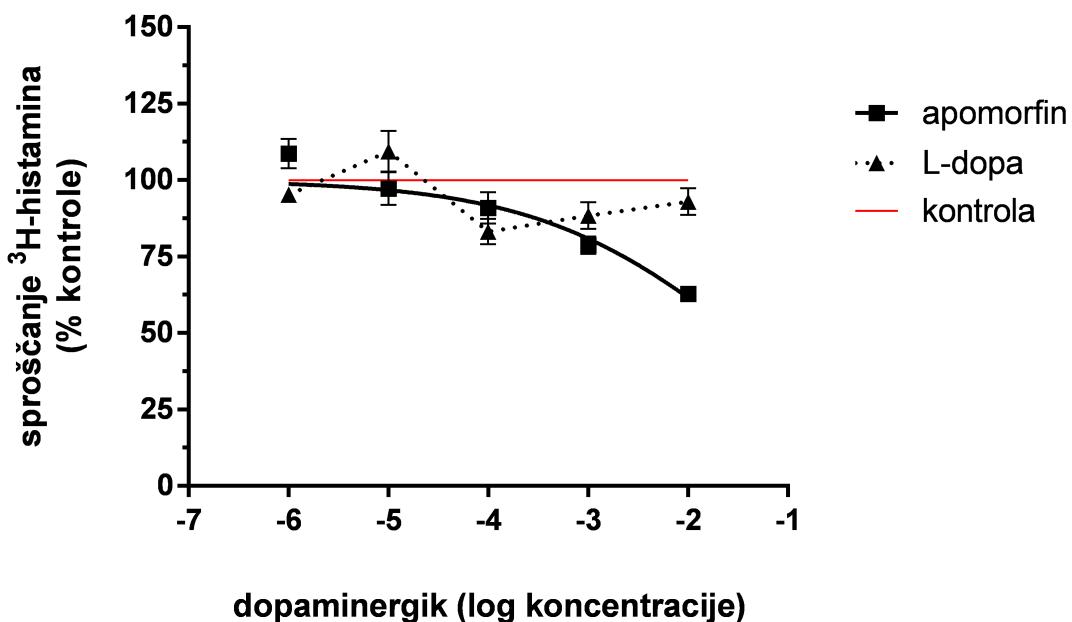
Slika 13 Vpliv klorpromazina na privzem histamina v astrocite.

Astrocite smo pri standardnih pogojih (37°C , pH 7,4) 20 min inkubirali z klorpromazinom, nato dodali 125 nM ^3H -histamin in izmerili količino privzetega histamina. Rezultati so predstavljeni kot odstotek celokupnega privzema histamina izmerjenega v odsotnosti inhibitorja ($100\% = 325 \pm 6 \text{ fmol/mg proteinov}$). Točke prikazujejo povprečno vrednost meritev \pm SEM ($n = 6$).

Ker smo za privzem histamina v astrocite predlagali dvosmerne prenašalne beljakovine, nas je zanimal tudi vpliv dopaminergičnih učinkovin na sproščanje histamina. V poskusih smo tokrat uporabili le dve učinkovini, apomorfin in levodope. Rezultati so prikazani na Sliki 14.

Z višanjem koncentracije apomorfina se je zniževalo sproščanje histamina iz kulture neonatalnih astrocitov. Statistično značilno je apomorfin zavrl sproščanja v koncentracijah od 1 mM do 10 mM ($\text{IC}_{50} > 10 \text{ mM}$), in sicer za 37% pri najvišji uporabljeni koncentraciji. Vpliv levodope je bil manj značilen. Sproščanje histamina je prekurzor dopamina najbolj zavrl v koncentraciji $0,1 \text{ mM}$, medtem ko rezultati kažejo celo na zvišano raven sproščanja

histamina pri koncentraciji $10 \mu\text{M}$. Vpliv levodope v merjenem koncentracijskem območju nikoli ni prestopil ravni statistične značilnosti ($p > 0,05$).



Slika 14 Vpliv dopaminergičnih učinkovin na sproščanje histamina iz kulture astrocitov.

Astrocite smo pri standardnih pogojih (37°C , pH 7,4) 20 min inkubirali z $125 \text{ nM}^3\text{H-histaminom}$, nato smo celice inkubirali še ob prisotnosti dopaminergične učinkovine. Količine sproščenega histamina smo prikazali kot odstotek celokupnega sproščanja histamina, izmerjenega v odsotnosti dopaminergične učinkovine ($100\% = 59 +/- 7 \text{ fmol/mg proteinov}$). Krivulja, ki predstavlja vpliv apomorfina, je narisana s pomočjo nelinearne regresije ($R^2 = 0,65$). Točke prikazujejo povprečno vrednost meritev +/- SEM ($n = 15$).

RAZPRAVA

1. Lastnosti privzema in sproščanja histamina v astrocite

Danes se za zdravljenje številnih nevroloških obolenj uporablajo zdravila, ki uravnavajo privzem monoaminskih nevrotransmiterjev. Za razliko od ostalih monoaminov visokoafinitetnega prenašalca za histamin še ne poznamo. V prid njegovemu obstaju pričajo študije, med njimi ena prvih raziskovalke Rafalowske, ki prikazuje lastnosti visokoafinitetnega privzema histamina s K_m 0,5 μM in V_{max} 1,6 pmol/mg proteinov/min [92].

Po drugi strani pa je znano, da je histamin substrat za nekatere nizko-afinitetne prenašalce, kot so PMAT [88], OCT 3 [97] in OCT 2 [98].

Lastnosti specifičnega privzema histamina, ki smo jih določili v našem laboratoriju, prikazujejo mehanizem privzema preko nizko-afinitetnega prenašalnega sistema. To pomeni, da je privzem histamina potekal pri višjih vrednostih K_m (62,47 +/- 14,82 μM) in V_{max} (25,98 +/- 2,447 pmol/mg proteinov/min), kot bi v primeru prenosa z visokoafinitetnim prenašalcem. Za razliko od dobro raziskanih visoko afinitetnih prenašalcev je delovanje nizko-afinitetnih prenašalcev še dokaj nedognano. Njihov obstoj so raziskovalci najprej odkrili in opisali v perifernih tkivih [99], v CŽS pa so jim dolgo časa pripisovali manj pomembno, zgolj podporno vlogo pri odstranjevanju nevrotransmiterjev iz sinaptične špranje. Danes novejše študije že dokazujejo pomembnejši vpliv tovrstnih prenašalnih sistemov pri odstranjevanju serotonina in dopamina v razmerah *in vivo* [85] [100]. Še korak dlje je stopila Yanai-jeva skupina, ki namiguje, da bi bili v primeru ponovnega privzema histamina, zaradi visokih koncentracij sproščenega nevrotransmiterja (nad 50 μM), nizko-afinitetni (visoko-kapacitetni) prenašalni sistemi celo bolj primerni [86]. Glede na dosedanje ugotovitve večih raziskovalnih skupin se histamin najverjetneje privzema in sprošča s kombinacijo privzema₁ in privzema₂.

Če primerjamo podatke iz objavljenih raziskav, izvedenih na neonatalnih podganjih astrocitih, so naši rezultati učinkovitosti transportnega sistema ($V_{max}/K_m = 0,42 \mu\text{L}/\text{mg proteinov}/\text{min}$) primerljivi z izsledki Perdanove ($V_{max}/K_m = 0,38 \mu\text{L}/\text{mg proteinov}/\text{min}$) [23], a precej nižji kot pri ugotovitvah Huztijkeve ($V_{max}/K_m = 16,42 \mu\text{L}/\text{mg proteinov}/\text{min}$) [101] in Rafalowske ($V_{max}/K_m = 3,2 \mu\text{L}/\text{mg proteinov}/\text{min}$) [92]. Razlike se pojavijo tudi izven preiskovane vrste, tako znaša učinkovitost prenašalnega sistema piščančjih

astrocitov $1,29 \mu\text{L}/\text{mg proteinov}/\text{min}$ [102], učinkovitost človeških astrocitov pa zgolj $0,098 \mu\text{L}/\text{mg proteinov}/\text{min}$ [86]. Vzrok omenjenim variacijam rezultatov znotraj iste preiskovane vrste bi lahko bile razlike v laboratorijskih pogojih pri izvedbi testov in spremenjene lastnosti astrocitov zaradi različnih dejavnikov pri pripravi kulture [103]. Možne so tudi razlike med posameznimi sevi iste živalske vrste in celo med posamezniki znotraj seva. Različni rezultati med preiskovanimi živalskimi vrstami nas opozarjajo na dejstvo, da so ekstrapolacije na človeško vrsto sicer možne, vendar jih moramo obravnavati z veliko stopnjo previdnosti. Čeprav so metode za določanje kinetičnih parametrov iz Michaelis-Mentenove enačbe danes izrednega pomena, pa večina standardnih biokemičnih testov poda zgolj oceno K_m in V_{max} s precej veliko napako. Najbolj točno oceno obeh parametrov naj bi dala analiza z nelinearno regresijo. Eadie-Hofsteejeva in Hanes-Woolfova transformacija podatkov nam sicer omogoča izračun kinetičnih parametrov s pomočjo premice, izračunane z linearno regresijo, ampak imajo ocene K_m in V_{max} zaradi večjega števila omejitve tovrstnega sistema navadno večjo napako. Največje razlike pri izračunu kinetičnih parametrov se pojavijo zaradi: a) uporabe nezadovoljivih, obsoletnih metod analize, b) premajhnega števila podatkovnih točk ter c) slabo izbranega nabora uporabljenih koncentracij substrata [104].

Ugotovili smo, da se histamin v astrocite privzema in sprošča v odvisnosti od koncentracije in vrednosti pH. V literaturi obstaja veliko število raziskav, ki temu dodajajo še časovno in temperaturno odvisnost, kar govori v prid obstoju aktivnega transporta in sodelovanju prenašalne beljakovine [23]. Opazili smo, da se z odstopanjem od fiziološkega pH privzem histamina v astrocite zmanjšuje. Pri znižanju pH medija na 7,0 se privzem pri inkubaciji z $100 \mu\text{M}$ histaminom zmanjša za 64 %, pri pH 6,6 pa ta obsega samo še 11 % privzema histamina pri fiziološkem pogojih. Gre torej za pH občutljiv prenašalni sistem, ki pri pH 7 deluje z zmanjšano učinkovitostjo, pri pH 6,6 pa pri prenosu najverjetneje ne sodeluje več. Membranski transport histamina je vedno dvosmeren proces. Na Sliki 10 (v poglavju Rezultati) opazimo, da se je najmanj histamina (približno 6 %) sprostilo v pogojih s pH 7,4. Količina sproščenega histamina se je pri pH 6,6 podvojila in pri pH 7,0 povečala za faktor 4. V patoloških razmerah se torej zmanjša prenos proti notranjosti astrocita, hkrati pa se poveča sproščanje histamina. V fizioloških pogojih transport histamina večinoma poteka proti notranjosti celice, sprosti pa se ga le manjši delež.

Pomembno je omeniti, da pH 6,6 ni združljiv z življenjem in bi inkubacija pri teh pogojih lahko privedla do poškodbe membrane astrocita. Če bi se to zgodilo, bi pričakovali linearen proces transporta histamina, ki bi lahko bil podoben grafom privzema in sproščanja v mediju s pH 6,6. Astrociti so v primerjavi z živčnimi celicami veliko bolj odporni na nekatere izmed posledic ishemičnega dogodka v CŽS, kot so hipoksija in hipoglikemija [105], po drugi strani pa so precej bolj občutljivi na acidozo. Proses glikolize v astrocitu preneha potekati pri padcu pH pod 6,6 [106], do smrti astrocita pa pride pri 10 minutni izpostavitvi astrocita okolju s pH 4,6 ali pri višjih vrednostih pH ob podaljševanju časa izpostavitve acidoz [107].

Smotrno se je vprašati, ali je prenos histamina, ki zagotavlja višjo zunajcelično koncentracijo nevtrotransmiterja v kislih pogojih, zgolj posledica okrnjene funkcije prenašalnega sistema na astrocitu, ali pa gre ob tem nemara tudi za obrambni mehanizem organizma, ki se znajde v patoloških razmerah. Trenutno je na voljo vedno več dokazov, ki histaminu pripisujejo pomembno nevroprotективno vlogo v ishemičnih pogojih [108] [109]. Histamin naj bi zmanjšal obseg poškodb po možganski kapi preko prijemališč na nevronih, astrocitih, celicah imunskega odziva in celicah gladkih mišic krvnih žil. Pri tem naj bi sodelovali vsi trije histaminski receptorji (H1, H2 in H3) v CŽS. Ugodni učinki histamina pri zniževanju obsega ishemične poškodbe naj bi bili zniževanje citotoksičnosti, inhibicija sproščanja glutamata in dopamina, zaviranje vnetnih procesov, preprečevanje nastajanja brazgotine, povečanje krvnega pretoka v možganih in promocija nastajanja novih nevronov (nevrogeneza) [110].

2. Vpliv dopaminergičnih učinkov na prenos histamina v astrocite

Nespecifični prenašalci, kot sta PMAT in OCT3, so sposobni prenosa številnih endogenih in eksogenih snovi v celico, med drugim tudi monoaminov. Ker tovrstne prenašalne sisteme odlikuje visoka kapaciteta, prihaja do nasičenja sistema kasneje, pri višjih koncentraciji substrata. Zaradi tekmovanja med molekulami substratov za prosta vezavna mesta na prenašalni beljakovini bi ob nasičenju prenašalnega sistema pričakovali znižanje privzema histamina. Vemo, da monoamini v koncentracijskem območju 0,1 – 10 mM pomembno znižajo privzem histamina v astrocite. Največjo sposobnost inhibicije privzema histamina je z IC₅₀ 0,33 mM imel dopamin, sledila sta mu serotonin in noradrenalin [93].

Da bi preverili, kako na privzem histamina vplivajo dopaminu sorodne snovi, smo astrocite izpostavili trem različnim zdravilnim učinkovinam: agonistu in antagonistu na dopaminskih receptorjih ter prekurzorju dopamina. Medtem ko imajo agonistične učinkovine navadno kemijsko strukturo podobno nevrotransmiterju, se antagonistične od nje večinoma precej razlikujejo. Ob predpostavki, da je strukturna podobnost dopaminu pomembna za prehod membrane s pomočjo transporterjev za monoamine, smo pričakovali, da antagonist kompetitivno ne bo oviral privzema histamina.

Dobljeni rezultati potrjujejo, da klorpromazin v merjenem koncentracijskem območju ne poseduje pomembnejše sposobnosti inhibicije privzema histamina. Statistična obdelava podatkov je sicer pokazala, da tri izmerjene vrednosti značilno izstopajo od kontrolne, vendar pa bi bila v tem primeru to lahko posledica nekoliko manjšega števila vzorcev ($n = 6$). Učinkovina klorpromazin je bila prvič sintetizirana v 50. letih prejšnjega stoletja in se danes v humani medicini ne uporablja več. Poleg antagonističnega delovanja na dopaminske D1, D2, D3 in D4 receptorje, klorpromazin enako deluje tudi na serotonininske (5-HT1 in 5-HT2), adrenergične (α_1 in α_2), muskarinske (M1 in M2) receptorje ter histaminski H1 receptor. Zaključimo lahko, da tudi antagonistično delovanje na vseh omenjenih receptorjih na astrocitu nima posrednega učinka na privzem histamina.

Popolnoma drugačno vpletenost v prenos histamina je prikazal apomorfín, ki je v najvišji merjeni koncentraciji kot edini izmed preiskovanih snovi skoraj popolnoma zavrl privzem histamina. V primerjavi z dopaminom je privzem histamina zavrl nekoliko manj učinkovito, in sicer s približno dvakrat višjo IC₅₀. Tako apomorfín kot dopamin sta privzem histamina zavrla v koncentracijskem območju 0,1 – 10 mM, pri čemer pa je apomorfín dosegel za 13% večjo maksimalno inhibicijo kot dopamin. Strukturna podobnost dopaminu in dejstvo, da sta tako dopamin kot histamin substrat za PMAT ter pH občutljivost transporterja, potrjujejo možnost, da omenjena prenašalna beljakovina opravlja glavno vlogo pri privzemu histamina ne le v človeške astrocite [86], temveč tudi v astrocite podgane. Pri tem je pomembno omeniti, da je transport obeh nevrotransmiterjev možen tudi preko OCT3, ki je prav tako občutljiv na pH vrednost okolja. PMAT naj bi nekoliko dajal prednost transportu dopamina, OCT3 pa transportu histamina. Testi privzema histamina ob inhibiciji OCT s specifičnima inhibitorjema kortikosteronom in decinijem 22 (D22) na podganjih astrocitih niso pokazali vpliva oziroma so privzem zavrli le v manjši meri, zato je pomembnejša vloga OCT3 pri privzemu histamina manj verjetna [96] [111].

Ker sta oba predlagana prenašalca dvosmerna (vršita transport v celico in iz nje), smo pričakovali zaviralen učinek apomorfina tudi pri sproščanju histamina. Izkazalo se je, da se začne statistično značilno zaviranje sproščanja histamina ob prisotnosti 0,1 mM raztopine apomorfina, enako kot pri testih privzema. V najvišji merjeni koncentraciji raztopina apomorfina doseže nekoliko nižji nivo inhibicije in transport histamina zmanjša le za 37%.

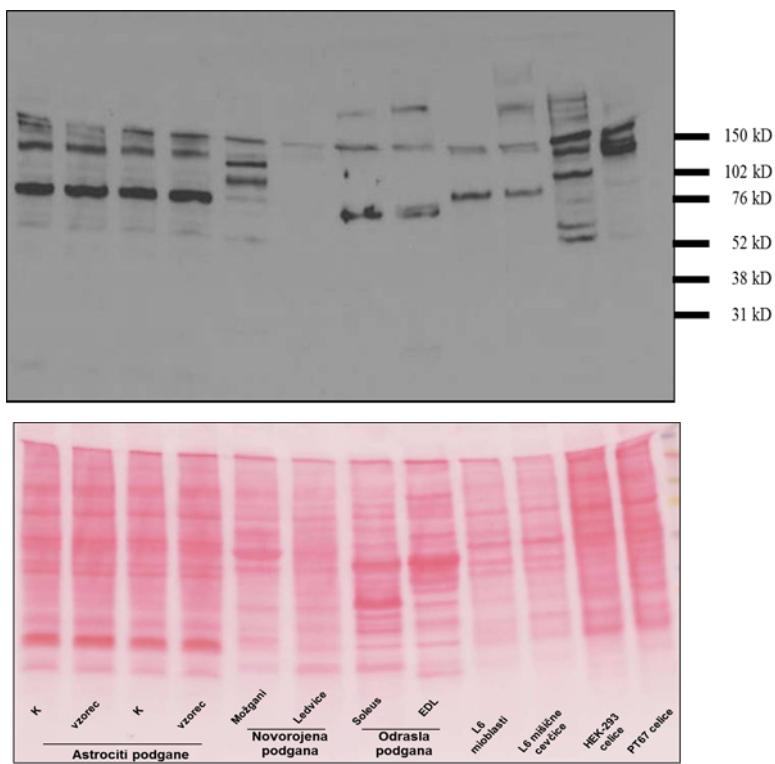
V nadaljevanju smo ugotovili, da levodopa ne vpliva niti na privzem niti na sproščanje histamina. Razlog za to bi lahko bila moteča prisotnost karboksilne kisline, ki levodopo strukturno loči od dopamina. Čeprav element karboksilne skupine na prvi pogled deluje kot manjša modifikacija spojine, človeškemu telesu še zdaleč ni tuja in so membranske strukture, kot so receptorji in prenašalne beljakovine, sposobne hitre in učinkovite prepoznavne.

Na tem mestu moramo opozoriti na pomankljivosti eksperimentalnega modela, ki so pomembne pri nadaljnjem vrednotenju rezultatov. Astrocyti v kulturi so vzdrževani v umetnem okolju, ki z uporabo različnih medijev in drugih dodatkov v največji možni meri posnema pogoje v živečem organizmu. Kljub temu pa so celice v razmerah *in vitro* prikrajšane za pomembne fiziološke vplive, med drugim tudi za stik z nevroni. Zaradi omenjenih odstopanj od naravnih pogojev lahko pride do razlik v izražanju fenotipskih lastnosti astrocitov [103] in celo do spremenjenega izražanja transportnih beljakovin za nevrotransmiterje [112]. Po drugi strani pa je znano, da astrocyti v kulturi določene biološke lastnosti tudi ohranijo. Pri meritvah privzema serotoninina in glutamata v astrocyte ni prišlo do razlik med tistimi, izmerjenimi v *in vitro* pogojih, in med tistimi v *in vivo* pogojih [113]. Možnost preslikave naših podatkov na razmere *in vivo* tako ni nemogoča, vendar pa proces ponovno zahteva večjo stopnjo previdnosti.

Glede na omenjeno, bi se levodopa v testih *in vivo* zaradi prisotnosti encima AADC v nevronih lahko pretvorila v dopamin in imela inhibitorni učinek na privzem histamina. Raziskave kažejo, da tudi astrocyti v svojem genomu izražajo gen za AADC [114], vendar pa naj ne bi prišlo do njegove translacije oziroma naj bi bila katalitična aktivnost encima izjemno nizka, saj v večini primerov niso zaznali transformacije levodope v dopamin [115] [116].

V uvodnem delu smo v poglavju o PMAT omenili ugotovitve Dahlinove raziskave, ki je z uporabo fluorescentno označenih protiteles za PMAT potrdila široko razširjenost

transporterja v različnih regijah mišjih možganov, z najvišjo gostoto izražanja v možganski skorji. Z dodatkom fluorescentno označenih protiteles za biokemijski označevalec živčnih celic, mikrotubularni protein (angl. microtubule-associated protein, MAP₂) in za biokemijski označevalec astrocitov, GFAP, so ugotovili, da izražanje PMATsovпадa z MAP₂-označenimi živčnimi celicami, ne pa tudi z GFAP-označenimi astrociti. V našem laboratoriju so v okviru diplomskega dela Roka Kojca preverili prisotnost PMAT na podganjih astrocitih z metodo prenosa po Westernu, vendar pa poskus dokazovanja PMAT ni podal želenih rezultatov (Slika 15). Namesto pričakovanega pasu pri 58 kD je rezultat predstavljen z več pasovi, pri čemer pa prisotnosti pasu pri 58 kD ni mogoče potrditi. Zaradi številnih neuspešnih ponovitev poskusa je pri raziskavi prišlo do sklepa, da primarno protitelo ne izkazuje ustrezne specifičnosti, kar so potrdili tudi proizvajalci. Za razjasnitev vprašanja prisotnosti PMAT na podganjih astrocitih bi bilo tako potrebno poskus ponoviti s protitelesi drugega proizvajalca [117].



Slika 15 Imunodetekcija PMAT (zgoraj) in barvanje z barvilom Panceau S (spodaj).

Zgornja slika prikazuje prenos proteinov na PVDF membrano in naknadno imunodetekcijo s protitelesom anti-PMAT. Pozitivno kontrolo (označeno s črko K na spodnji sliki) predstavljajo homogenizati tkiv in celične linije, za katere predvidevamo, da izražajo PMAT. Povzeto po [117].

Glede na to, da prenos histamina v sinaptične vezikle poteka preko VMAT2, ki prenaša tudi serotonin, obstaja možnost, da bi se histamin lahko prenašal preko katerega izmed visoko-afinitetnih prenašalcev drugih monoaminov. Med omenjene visoko-afinetetne prenašalce uvrščamo tudi DAT, ki bi bil lahko, kljub visoki specifičnosti za lasten nevrotransmiter, sposoben prenašati tudi druge monoamine [118]. Raziskave do sedaj niso potrdile prisotnosti DAT na astrocitu, prav tako pa tudi testi inhibicije z zaviralci DAT (in zaviralci SERT in NET) niso pokazali učinka na transport histamina [23]. Torej verjetnost, da se histamin v astrocit prenaša preko tako imenovanega “nezvestega” prenašalca, ostaja izredno majhna.

Na koncu moramo opozoriti še na specifičnost histamina in histaminergičnega sistema, saj se njuna vloga med ontogenetskim razvojem močno spreminja. Histamin ima v neonatalni dobi predvsem nevromodulatorno vlogo, šele v odrasli dobi pa deluje kot nevrotransmiter. Zaradi razvojnih razlik bi lahko prišlo do sprememb v prenosu histamina in bi bilo smiselno teste privzema in sproščanja ponoviti na kulturi astrocitov, izoliranih iz odraslih podgan.

SKLEP

1. Ugotovili smo, da se histamin privzema v astrocite in iz njih sprošča, pri čemer pa mora zaradi pozitivnega naboja molekule sodelovati prenašalec. Prenos histamina je bil vedno usmerjen bolj v smer notranjosti celice kot iz nje, ne glede na spremjanje pogojev inkubacije. Največje razmerje med količino privzetega in sproščenega histamina je bilo pri inkubaciji v fizioloških pogojih. Ob naraščanju acidoze se postopoma zmanjšuje privzem histamina v astrocit, poveča pa se njegovo sproščanje. S tem smo potrdili prvo in drugo hipotezo.
2. Naši rezultati opisujejo prenos histamina z visokima vrednostima Km in Vmax, kar kaže na sodelovanje nizko-afinitetnega, visoko-kapacitetnega prenašalca. Če temu dodamo še pH občutljivost prenašalca in rezultate o inhibiciji privzema histamina ob prisotnosti višjih koncentracij monoaminov, ki so prav tako substrat za PMAT, bi ta lahko predstavljal glavni mehanizem privzema histamina. Čeprav najnovejše raziskave na človeških astrocitih pripisujejo največjo vlogo pri privzemu histamina prav PMAT, pa dokazov o njegovem obstoju na astrocitih podgane še ni. Tretje hipoteze tako ne moremo ne potrditi ne ovreči.
3. Apomorfin je v koncentracijah 0,1 – 10 mM zavrl prenos histamina, levodopa pa po drugi strani ni pokazala vpliva niti na privzem niti na sproščanje histamina. Verjetno je to posledica moteče prisotnosti karboksilne skupine, ki predstavlja preveliko strukturno modifikacijo in postavi uvrščanje levodope v skupino dopaminu podobnih snovi pod vprašaj. V grobem lahko četrto hipotezo potrdimo, bilo pa bi smotrno preveriti še vpliv katere izmed drugih dopaminu podobnih snovi, na primer rotigotina, ropinirola ali pramipeksina, saj se omenjene učinkovine prav tako uporabljajo v humani medicini in podobno kot apomorfin delujejo kot agonisti na dopaminskih receptorjih.

VIRI IN LITERATURA

- [1] Bear M F, Connors B W, Paradiso M A, *Neuroscience: Exploring the brain*, 2 ed., Baltimore: Lippincot Williams & Wilkins, 2001, pp. 22-240.
- [2] Brady S, Siegel G, Albers R W, Price D, *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, 6 ed., San Diego: Academic Press, 2006, pp. 12-330.
- [3] Káradóttir R, Hamilton N B, Bakiri Y, Attwell D, "Spiking and nonspiking classes of oligodendrocyte precursor glia in CNS white matter," *Nat Neurosci*, vol. 11, pp. 450-456, 2008.
- [4] Kreutzberg GW, "Microglia, the first line of defence in brain pathologies," *Arzneimittelforschung*, 1995, vol. 45, pp. 357-60.
- [5] Butt AM, Hamilton N, Hubbard P, Pugh M, Ibrahim M, "Synantocytes: the fifth element," *J Anat.*, 2005, vol. 207, pp. 695-706.
- [6] Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R, Zhu X., "Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity," *Nat Rev Neurosci.*, 2009, vol. 10, pp. 9-22.
- [7] Virchow R, "Gesammelte Abhandlungen zyr Wissenschaftlichen Medizin," *Verlag von Meidinger Sohn & Comp*, 1856.
- [8] Deiters O, "Untersuchungen über Gehirn und Rückenmark des Menschen und der Säugetiere," *Vieweg*, 1865.
- [9] Lenhossek M V, "Zur Kenntnis der Neuroglia des menschlichen Ruckenmarkes," *Verh. Anat. Ges.*, 1891, vol. 5, p. 193–221.
- [10] Kölliker A, *Handbuch der Gewebelehre des Menschen*, Leipzig: Wilhelm Engelmann, 1889.
- [11] Andriezen WL, "The neuroglia elements of the brain," *Brit Med J*, 1893, vol. 2, p. 227–230.
- [12] G. C, "Suella struttura della sostanza grigia del cervello (comunicazione preventiva)," *Gazzetta Medica Italiana*, 1873, vol. 33, p. 244–24.
- [13] Rio-Hortega P D, "El tercer elemento de los centros nerviosos," *Biol. Soc. Esp. Biol.*, 1919, vol. 9, p. 69–120.
- [14] Rio-Hortega P D, "Estudios sobre la neuroglia. La glia de escasas radiaciones oligodendroglia," *Biol. Soc. Esp. Biol.*, 1921, vol. 21, p. 64–92.
- [15] Sofroniew M V, Vinters H V, "Astrocytes: biology and pathology," *Acta Neuropathologica*, 2010, vol. 119, pp. 7-35.

- [16] Condorelli DF, Dell'Albani P, Corsaro M, Barresi V, Giuffrida Stella AM, "AMPA-selective glutamate receptor subunits in astroglial cultures," *J. Neurosci. Res.*, 1993, vol. 36, p. 344–356.
- [17] Dave V, Gordon GW, McCarthy KD , "Cerebral type 2 astroglia are heterogeneous with respect to their ability to respond to neuroligands linked to calcium mobilization," *Glia*, 1991, vol. 4, p. 440–447.
- [18] Fraser DD, Duffy S, Angelides KJ, Perez-Velazquez JL, Kettenmann H, MacVicar BA, "GABA/benzodiazepine receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes," *J. Neurosci.*, 1995, vol. 15, p. 2720–2732.
- [19] Gallo V, Ghiani CA , "Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 21, p. 252–258.
- [20] Salm AK, McCarthy KD , "Norepinephrine-evoked calcium transients in cultured cerebral type 1 astroglia," *Glia*, 2000, vol. 3, p. 529–538, 1990.
- [21] Verkhratsky A, Kirchhoff F , "NMDA receptors in glia," *Neuroscientist*, 2007, vol. 13, p. 28–37.
- [22] Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL , "Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000)," *Neurochem Res*, 2000, vol. 25, p. 1439–1451.
- [23] Pirkmajer K P, "Vloga podganjih astrocitov pri inaktivaciji histamina," Doktorska disertacija, Ljubljana, 2013.
- [24] Christepherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mullowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P, Barres BA, "Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis.,," *Cell*, 2005, vol. 120, pp. 421-33.
- [25] Kržan M, Wu VW, Schwarz JP, "Serotonin regulation of nerve growth factor synthesis in neonatal and adult astrocytes: comparison to the beta-adrenergic agonist isoproterenol," *J Neurosci Res.*, 2001, vol. 64, pp. 261-7.
- [26] Parpura V, Heneka M T, Montana V, Oliet S H R, Schousboe A, Haydon P G, Stout R F, Spray D C, Reichenbach A, Pannicke T, Pekny M, Pekna M, Zorec R and Verkhratsky A, "Glial cells in (patho)physiology," *J Neurochem*, 2012, vol. 121, p. 4–27.
- [27] Koehler RC, Roman RJ, Harder DR, "Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow," *Trends Neurosci*, 2009, vol. 32, p. 160–169 .
- [28] Gordon GR, Mulligan SJ, MacVicar BA, "Astrocyte control of the cerebrovasculature," *Glia*, 2007, vol. 55, p. 1214–1221.
- [29] Ballabh P, Braun A, Nedergaard M, "The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications," *Neurobiol Dis.*, 2004, vol. 16, p. 1–13.

- [30] Brown AM, Ransom BR , "Astrocyte glycogen and brain energy metabolism," *Glia*, 2007, vol. 55, pp. 1263-71.
- [31] Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C, "Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission," *Science*, 2008, vol. 322, pp. 1551-5.
- [32] Pellerin L, Magistretti P, "Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization.,," *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, vol. 91, pp. 10625-10629.
- [33] Kreft M, Zorec R, "Astrociti – spregledane zvezde nevrobiologije," *eSinapsa*, vol. 2, 2011.
- [34] Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG, "Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner," *Trends Neurosci*, vol. 22, p. 208–215.
- [35] Kirischuk S, Parpura V, Verkhratsky A. , "Sodium dynamics: another key to astroglial excitability?," *Trends Neurosci*, 2012, vol. 35, p. 497–506.
- [36] Simard M, Nedergaard M, "The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis," *Neuroscience*, 2004, vol. 129, pp. 877-96.
- [37] Haydon P G, "Glia: listening and talking to the synapse," *Nat. Rev. Neurosci*, 2001, vol. 2, p. 185–193.
- [38] Zorec R, Araque A, Carmignoto G, Haydon P, Verkhratsky A, Parpura V, "Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca²⁺ as a signaling route," *ASN Neuro*, 2012, vol. 4.
- [39] Volterra A, Bezzi P, "Release of transmitters from glial cells," *Oxford University Press*, 2002, p. 164–184.
- [40] Perea G, Navarrete M, Araque A, "Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information," *Trends Neurosci*, 2009, vol. 32, p. 421–431.
- [41] Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG, "Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks," *Science*, 2005, vol. 310, p. 113–116.
- [42] Sofroniew MV, "Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation," *Trends Neurosci.*, 2009, vol. 32, p. 638–647.
- [43] Moyes CD, Schulte PM, Tierphysiologie, München: Pearson Studium, 2008, p. 184.
- [44] Eguiagaray J G, Egea J, Bravo-Cordero J J, García A G, "Neurotransmisores, señales de calcio y comunicación neuronal," *Neurocirugía* , 2004, vol. 15, pp. 109-118.
- [45] Kandell ER., Schwartz JH, Jessell TM , Principles of Neural Science. 4th ed., New York

City: McGraw-Hill Companies Inc., 2000.

- [46] Dale HH, Laidlaw PP , "The physiological action of beta-imidazoleethylamine," *J Physiol.*, 1910, vol. 41, p. 318–44.
- [47] Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O, "Histamine in the Nervous System.," *Physiol Rev.*, 2008, vol. 88, pp. 1183-241.
- [48] Watanabe T, Taguchi Y, Hayashi H, Tanaka J, Shiosaka S, Tohyama M, Kubota H, Terano Y, Wada H, "Watanabe T, Taguchi Y, Hayashi H, Tanaka J, Shiosaka S, Tohyama M, KubotaEvidence for the presence of a histaminergic neuron system in the rat brain: an immunohistochemical analysis," *Neurosci Lett*, 1983, vol. 39, pp. 249-254.
- [49] Panula P, Yang HY, Costa E, "Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus," *Proc Natl Acad Sci* , 1984, vol. 81, pp. 2572-2576.
- [50] Magistretti PJ, "Regulation of glycogenolysis by neurotransmitters in the central nervous system," *Diabete Metab*, 1988, vol. 14, p. 237–246.
- [51] Teuscher C, Subramanian M, Noubade R, Gao JF, Offner H,Zachary JF, Blankenhorn EP , "Central histamine H3 receptor signaling negatively regulates susceptibility to autoimmune inflammatory disease of the CNS," *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, vol. 104, p. 10146–10151.
- [52] Nuutinen S, Panula P, "Histamine in Neurotransmission and Brain Diseases," *Adv Exp Med Biol.*, 2010, vol. 709, pp. 95-107.
- [53] Haas HL, Panula P, "The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system," *Nat Rev Neurosci*, 2003, vol. 4, p. 121–130.
- [54] Martinez-Mir MI, Pollard H, Moreau J, Arrang JM, Ruat M, Traiffort E, Schwartz JC, Palacios JM, "Three histamine receptors (H1, H2 and H3) visualized in the brain of human and nonhuman primates," *Brain Res*, 1990, vol. 526, p. 322–327.
- [55] Bakker RA, Nicholas MW, Smith TT, Burstein ES, Hacksell U, Timmerman H, Leurs R, Brann MR, Weiner DM, "In vitro pharmacologyof clinically used central nervous system-active drugs as inverse h1 receptor agonists," *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, vol. 322, p. 172–179.
- [56] Vizuete ML, Traiffort E, Bouthenet ML, Ruat M, Souil E, Tardivel-Lacombe J, Schwartz JC, "Detailed mapping of the histamine H2 receptor and its gene transcripts in guinea-pig brain," *Neuroscience*, 1997, vol. 80, p. 321–343.
- [57] Fitzsimons CP, Lazar-Molnar E, Tomoskozi Z, Buzas E, Rivera ES, Falus A, "Histamine deficiency induces tissue-specific down-regulation of histamine H2 receptor expression in histidine decarboxylase knockout mice," *FEBS Lett* , 2001, vol. 508, p. 245–248.

- [58] Green JP, Maayani S , "Tricyclic antidepressant drugs block histamine H₂ receptor in brain," *Nature*, 1977, vol. 269, p. 163–165.
- [59] Moreno-Delgado D, Torrent A, Gomez-Ramirez J, De EI, Blanco I, Ortiz J, "Constitutive activity of H₃ autoreceptors modulates histamine synthesis in rat brain through the cAMP/PKA pathway," *Neuropharmacology*, 2006, vol. 51, p. 517–523.,
- [60] Pillot C, Heron A, Cochois V, Tardivel-Lacome J, Ligneau X, Schwartz JC, Arrang JM , "A detailed mapping of the histamine H(3) receptor and its gene transcripts in rat brain," *Neuroscience*, 2002, vol. 114, p. 173–193.
- [61] Leurs R, Bakker RA, Timmerman H, de Esch IJ, "The histamine H₃ receptor: from gene cloning to H₃ receptor drugs," *Nat Rev Drug Discov*, 2005, vol. 4, p. 107–120.
- [62] De Esch IJ, Thurmond RL, Jongejan A, Leurs R, "The histamine H₄ receptor as a new therapeutic target for inflammation," *Trends Pharmacol Sci*, 2005, vol. 26, p. 462–469.
- [63] Breunig E, Michel K, Zeller F, Seidl S, Hann VWC, Schemann M, "Histamine excites neurones in the human submucous plexus through activation of H₁, H₂, H₃ and H₄ receptors," *J Physiol*, 2007, vol. 583, p. 731–742.
- [64] Lim HD, van Rijn RM, Ling P, Bakker RA, Thurmond RL, Leurs R , "Identification of 4-methylhistamine as the first potent and selective H₄ receptor agonist," *J Pharmacol Exp Ther.*, 2005, vol. 314, pp. 1310-21.
- [65] F. I. L. M. S.-J. F. W. T. Fleming JV, "The C-terminus of rat L-histidine decarboxylase specifically inhibits enzymic activity and disrupts pyridoxal phosphatedependent interactions with L-histidine substrate analogues," *Biochem J*, 2004, vol. 381, p. 769–77.
- [66] Merickel A, Edwards RH, "Transport of histamine by vesicular monoamine transporter-2," *Neuropharmacology*, 1995, vol. 34, p. 1543–1547.
- [67] Nelson WL, Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 6th ed., Philadelphia: Lippincott Wiliams & Wilkins, 2008, pp. 1004-5.
- [68] Baladi MG, Daws LC, France CP , "You are what you eat: influence of type and amount of food consumed on central dopamine systems and the behavioral effects of direct- and indirect-acting dopamine receptor agonists," *Neuropharmacology*, 2012, vol. 63, pp. 76-86.
- [69] Pregelj P, "Vloga dopamina v možganih," in *Teden možganov*, Ljubljana, 2011.
- [70] Feldman RS, Meyer JS, Quenzer LF, Principles of Neuropsychopharmacology: Cateholamines, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc, 1997, p. 277–344.
- [71] Westerink BH, "Sequence and significance of dopamine metabolism in the rat brain," *Neurochem Int*, 1985, vol. 7, p. 221–227.

- [72] Kristensen A S, Andersen J, Jørgensen T N, Sørensen L, Eriksen J, Loland C J, Strømgaard K, Gether U, "SLC6 Neurotransmitter Transporters: Structure, Function and Regulation," *Pharmacol Rev*, 2011, vol. 63, p. 585–640.
- [73] Torres G E, Gainetdinov R R, Caron M G, "Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function," *Nat Rev Neurosci*, 2003, vol. 4, p. 13–25.
- [74] Iversen L L, Glowinski J, Axelrod J, "The uptake and storage of H₃-norepinephrine in the reserpine-pretreated rat heart," *J Pharmacol Exp Ther*, 1965, vol. 150, pp. 173-183.
- [75] Tsai MJ, Lee EH., "Characterization of L-DOPA transport in cultured rat and mouse astrocytes," *J Neurosci Res*, 1996, vol. 43, pp. 490-495.
- [76] Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, and Caron MG, "Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter," *Nature*, vol. 379, p. 606–612, 1996.
- [77] Jones SR, Gainetdinov RR, Jaber M, Giros B, Wightman RM, Caron MG , "Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter," *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, vol. 95, p. 4029–4034.
- [78] Gainetdinov RR , "Dopamine transporter mutant mice in experimental neuropharmacology," *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2008, vol. 377, p. 301–313.
- [79] K. G. S. J. H. D. J. L. K. P. S. H. A. Kittel-Schneider S, "Expression of Monoamine Transporters, Nitric Oxide Synthase 3, and Neurotrophin Genes in Antidepressant-Stimulated Astrocytes," *Front Psychiatry*, 2012, pp. 3-33.
- [80] Koepsell H, Lips K, Volk C, "Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications," *Pharm Res*, 2007, vol. 7, pp. 1227-51.
- [81] Jonker JW, Schinkel AH , "Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3)," *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, vol. 308, p. 2–9.
- [82] Duan H, Wang J, "Selective transport of monoamine neurotransmitters by human plasma membrane monoamine transporter and organic cation transporter 3," *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, vol. 335, p. 743–753.
- [83] Amphoux A, Vialou V, Drecher E, Bruss M, Mannoury C, Rochat C, Millan M J, Giros B, Bonisch H, Gautron S, "Differential pharmacological in vitro properties of organic cation transporters and regional distribution in rat brain," *Neuropharmacology*, 2006, vol. 50, p. 941–952.
- [84] Inazu M, Takeda H, Matsumiya T, "Molecular and functional characterization of an Na⁺-independent choline transporter un rat astrocytes," *J Neurochem*, 2005, vol. 94, pp. 1427-

- [85] Bacq A, Balasse L, Bialla G, Giuard B, Gardier A M, Schinkel A, Louis F, Vialou V, Martres M P, Chevrin C, Hamon M, Giros B, Gautron S, "Organic cation transporter 2 controls brain norepinephrine and serotonin clearance and antidepressant response," *Mol Psychiatry*, 2011, vol. 17, pp. 926-939.
- [86] Yoshikawa T, Naganuma F, Iida T, Nakamura T, Harada R, Mohsen A S, Kasajima A, Sasano H, Yanai K, "Molecular Mechanism of Histamine Clearance by Primary Human Astrocytes," *Glia*, 2013, vol. 61, pp. 905-916.
- [87] Perdan-Pirkmajer K, Pirkmajer S, Raztresen A, Kržan M, "Regional Characteristics of Histamine Uptake into Neonatal Rat Astrocytes," *Neurochemical Research*, 2013, vol. 38, pp. 1348-1359.
- [88] Engel K, Zhou M, Wang J, "Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain," *J Biol Chem*, 2004, vol. 279, pp. 42-49.
- [89] Engel K, Wang J, "Interaction of organic cations with a newly identified plasma membrane monoamine transporter," *Mol Pharmacol*, 2005, vol. 68, pp. 1397-407.
- [90] Dahlin A, Xia L, Kong W, Hevner R, Wank J, "Expression and immunolocalization of plasma membrane monoamine transporter in brain," *Neuroscience*, 2007, vol. 146, pp. 1193-1211.
- [91] Walz W, Lang M K, "Immunocytochemical evidence for distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus," *Neurosci Lett*, 1998, vol. 257, pp. 127-130.
- [92] Rafalowska, Waskiewicz J, Albrecht J, "Is neurotransmitter histamine predominantly inactivated in astrocytes?," *Neurosci Lett*, 1987, vol. 80, p. 106–110.
- [93] Terbuc V, Kinetika privzema histamina v astrocite novorojene podgane in vpliv biogenih aminov na ta proces, Ljubljana: Diplomsko delo, 2012.
- [94] Schwartz J P, Wilson D J, "Preparation and characterization of type I astrocytes cultured from adult rat cortex, cerebellum, and striatum," *Glia*, 1992, vol. 5, pp. 75-80.
- [95] Bradford M M, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal Biochem*, 1976, vol. 72, p. 248–254.
- [96] Perdan-Pirkmajer K, Pirkmajer S, Černe K, Kržan M, "Molecular and kinetic characterization of histamine transport into adult rat cultured astrocytes," *Neurochem Int*, 2012, vol. 61, pp. 415-22.
- [97] Grundeman D, Schechinger B, Rappold GA, Schomig E, "Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal cateholamine transporter," *Nat neurosci*, 1998, vol. 1,

pp. 349-351.

- [98] Grundeman D, Koster S, Kiefer N, Breidert T, Engelhardt M, Spitzberger F, Obermuller N, Schomig E, "Transport of monoamine transmitters by the organic cation transporter type 2, OCT 2," *J Biol Chem*, 1998, vol. 273, pp. 30915-20.
- [99] Lightman SL, Iversen LL, "The role of uptake2 in the extraneuronal metabolism of catecholamines in the isolated rat heart," *Br J Pharmacol*, 1969, vol. 37, pp. 638-49.
- [100] Baganz NL, Horton RE, Calderon AS, Owens WA, Munn JL, Watts LT, Koldzic-Zivanovic N, Jeske NA, Koek W, Toney GM, Daws LC, "Organic cation transporter 3: Keeping the brake on extracellular serotonin and serotonin-transporter-deficient mice," *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, vol. 105, pp. 18976-81.
- [101] Huszti Z, "Mechanism and function of histamine-sodium contrasport by astroglial cells," *Agents Actions*, 1994, vol. 41, pp. 58-59.
- [102] Huszti Z, Rimanoczy A, Juhasz A, Magyar K, "Uptake, metabolism and release of (3H)-histamine by glial cells in primary cultures of chicken cerebral hemispheres," *Glia*, 1990, vol. 3, pp. 159-68.
- [103] Codeluppi S, Gregory EN, Kjell J, Wigerblad G, Olson L, Svensson CI, "Influence of rat substrain and growth conditions on the characteristics of primary cultures of adult rat spinal cord astrocytes," *J Neurosci Methods*, 2011, vol. 197, pp. 118-27.
- [104] Ritchie RJ, Prvan T, "Current statistical methods for estimating the Km and Vmax of Michaelis-Menten kinetics," *Biochemical education*, 1996, vol. 24, pp. 196-206.
- [105] Almeida A, Delgado-Esteban M, Bolanos JP, Medina JM, "Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxydative stress in neurons but not in astrocytes in primary culture," *J Neurochem*, 2002, vol. 50, pp. 207-17.
- [106] Zhao Y, Rempe DA, "Targeting astrocytes for stroke therapy," *Neurotherapeutics*, 2010, vol. 7, pp. 439-51.
- [107] Goldman SA, Pulsinelli WA, Clarke WY, Kraig RP, Plum F, "The Effects of Extracellular Acidosis on Neurons and Glia In Vitro," *J Cereb Blood Flow Metab*, 1989, vol. 9, pp. 471-7.
- [108] Adachi N , "Cerebral ischemia and brain histamine," *Brain Res Rev*, 2005, vol. 50, p. 275–286.
- [109] Hamami G, Adachi N, Liu K, Arai T , "Alleviation of ischemic neuronal damage by histamine H2 receptor stimulation in the rat striatum," *Eur J Pharmacol*, 2004, vol. 484 , p. 167–173.
- [110] Hu WW, Chen Z, "Role of histamine and its receptors in cerebral ischemia," *ACS Chem Neurosci*, 2012, vol. 3, pp. 238-47.

- [111] Perdan K, Kobe Z, Krzan M, "Nature of histamine transport in neonatal rat cultured type 1 astrocytes--organic cation transporters are not involved," *Inflamm Res*, 2009, vol. 58, pp. 32-3.
- [112] Kimelberg HK, Goderie SK, Conley PA, Higman S, Goldschmidt R, Amundson RH, "Uptake of (3H)-serotonin and (3H)-glutamate by primary astrocyte cultures. I. Effects of different sera and time in cultures," *Glia*, 1992, vol. 6, pp. 1-8.
- [113] Amundson RH, Goderie SK, Kimelberg HK, "Uptake of (3H)-serotonin and (3H)-glutamate by primary astrocyte cultures. II. Differences in cultures prepared from different brain regions," *Glia*, 1992, vol. 6, pp. 9-18.
- [114] Li XM, Juorio AV, Waltz W, Paterson IA, Walz W, Zhu MY, Boulton AA , "Gene expression of aromatic-L-amino decarboxylase in cultured rat glial cells," *J Neurochem*, 1992, vol. 59, p. 1172-5.
- [115] Juorio AV, Walz W, Sloley BD , "Absence of decarboxylation of some aromatic-L-amino acids by cultured astrocytes," *Brain Res*, 1987, vol. 426, p. 183-6.
- [116] Fitoussi N, Sotnik-Barkai I, Tornatore C, Herzberg U, Yadid G, "Dopamine turnover and metabolism in the striatum of parkinsonian rats grafted with genetically-modified human astrocytes," *Neuroscience*, 1998, vol. 85, pp. 405-13.
- [117] Kojc R, Vpliv motene energijske presnove na privzem histamina v astrocite novorojene podgane, Ljubljana, 2013.
- [118] Daws LC, "Unfaithful neurotransmitter transporters: focus on serotonin uptake and implications for antidepressant efficacy," *Pharmacol Ther*, 2009, vol. 121, pp. 89-99.