

Lovro Žiberna<sup>1</sup>, Damijana Mojca Jurič<sup>2</sup>

# Histaminski receptor tipa 3 – od gena do terapevtske tarče

## *Histamine Receptor Type 3 – from Gene to Drug Target*

---

### IZVLEČEK

**KLJUČNE BESEDE:** histamin, histaminski receptor tipa 3, znotrajcelične signalne poti, ligandi, osrednje živčevje, nevrofarmakologija

Histaminski receptor tipa 3 je odkril Schwartz s sodelavci leta 1983, vendar so njegov genski zapis klonirali šele leta 1999. Izražanje histaminskega receptorja tipa 3 je v veliki meri omejeno na osrednje živčevje. Za receptorje je značilna velika stopnja molekularne in funkcijske heterogenosti, kar je posledica razlik v transkripcijskih in posttranskripcijskih obdelavah molekule. Svojevrstna značilnost je tudi konstitutivna aktivnost v razmerah *in vivo* in pestrost znotrajceličnih signalnih poti, ki preko regulatornih proteinov  $G\alpha_{i/o}$  vključujejo adenilat ciklazo, fosfolipazo  $A_2$ , z mitogenom aktivirano protein kinazo in signalno pot Akt/glikogen-sintaza-kinaza 3. Omenjene signalne poti so pomembne pri signaliziranju na ravni nevroplastičnosti v osrednjem živčevju, zato je razvoj zdravilnih učinkovin, ki delujejo na histaminske receptorje tipa 3, trenutno osrednjega pomena na področju histamina v farmacevtski industriji. Histaminski receptor tipa 3 deluje kot inhibitorni avtoreceptor ali heteroreceptor. Aktivacija avtoreceptorjev na histaminergičnih nevronih pomeni zavrtje proženja celičnih signalov, zaviranje izgradnje histamina in njegovega sproščanja. Kot predsinaptični heteroreceptor na ostalih nevronskih populacijah nadzira sproščanje številnih živčnih prenašalcev, kot so biogeni amini, acetilholin, glutamat in  $\gamma$ -aminomaslena kislina. Delovanje histaminskega receptorja tipa 3 je vpleteno v kognitivne procese, obnašanje, uravnavanje budnosti in spanja, lokomocijo, uravnavanje apetita ter prenos bolečinskih dražljajev.

---

### ABSTRACT

**KEY WORDS:** histamine, histamine receptor type 3, intracellular signalling, ligands, central nervous system, neuropharmacology

Histamine receptor type 3 was discovered in 1983 by Schwartz and coworkers and cloned in 1999. The expression of histamine receptor type 3 is largely confined to the central nervous system, where differential transcriptional and posttranscriptional processing lead to a high degree of molecular and functional heterogeneity. Histamine receptor type 3 has unique properties including constitutive activity *in vivo* and the recruitment of plasticity-related signal transduction pathways, including  $G\alpha_{i/o}$ -proteins, adenylyl cyclase, phospholipase  $A_2$ , mitogen-activated protein kinase and Akt/glycogen synthase kinase 3 signalling. These make the histamine receptor type 3 the most prominent target for histaminergic drug development. Histamine receptor type 3 can function both as an autoreceptor and as a heteroreceptor. As an autoreceptor on histaminergic neurons, histamine receptor type 3 activation inhibits cell

<sup>1</sup> Asist. dr. Lovro Žiberna, mag. farm., Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova ulica 2, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Asist. dr. znan. sod. Damijana Mojca Jurič, univ. dipl. kem., Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova ulica 2, 1000 Ljubljana; damijana-mojca.juric@mf.uni-lj.si

firing, histamine synthesis and release. As a presynaptic heteroreceptors on other neurons, histamine receptors type 3 abundantly control the outflow of various neurotransmitters, including biogenic amines, acetylcholine, glutamate and  $\gamma$ -amino butyric acid. The histamine receptor type 3 functioning is associated with cognition, behaviour, wakefulness and sleep regulation, locomotion, appetite regulation and pain perception.

## UVOD

Histamin (2-(1H-imidazol-4-il)etanamin) je pomemben biogeni amin, ki kot lokalni hormon, živčni prenašalec in/ali nevromodulator uravnava številne fiziološke in patofiziološke procese v organizmu. Nastaja z dekarboksilacijo aminokislina L-histidin, ki jo katalitsko uravnava histidin dekarboksilaza, razgrajuje pa se preko oksidativne deaminacije, ki jo katalizira diaminooksidaza in preko metilacije s histamin-N-metiltransferazo. Histamin posreduje svoje učinke preko aktivacije histaminskih receptorjev. Na osnovi preučevanja genskega zapisa, znotrajceličnih signalnih poti in edinstvenih farmakoloških lastnosti so bili do sedaj prepoznani štiri podtipi histaminskih receptorjev, ki so poimenovani tip 1 ( $H_1R$ ), tip 2 ( $H_2R$ ), tip 3 ( $H_3R$ ) in tip 4 ( $H_4R$ ), ki jih uvrščamo v razred receptorjev, sklopljenih z regulatornimi proteini G (1, 2).

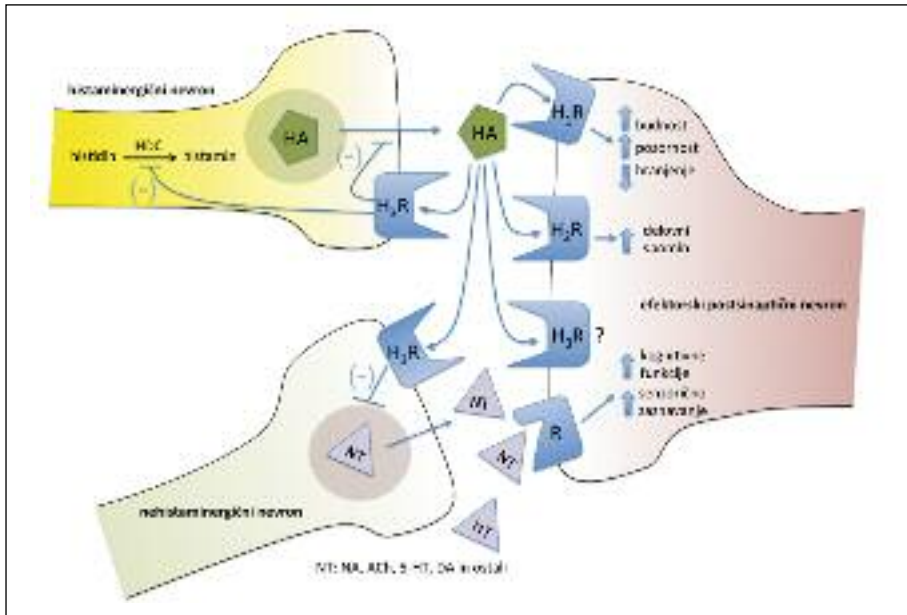
Histaminski sistem je že od prvih študij v začetku prejšnjega stoletja, ki jih je opravil pionir sodobne farmakologije in Nobelov nagradenec Sir Henry Hallett Dale, pomembna tarča za razvoj zdravilnih učinkovin (3, 4). Odkritje prvih antihistaminikov (antagonistov  $H_1R$ ) leta 1936 je povzročilo pravi razcvet raziskav na področju histamina (5). Te so omogočile natančen vpogled v vlogo in način delovanja histamina v organizmu in privedle do odkritja visoko selektivnih antagonistov  $H_1R$  in  $H_2R$  (antihistaminikov), pomembnih zdravilnih učinkovin, ki danes lajšajo alergijske reakcije in simptome želodčne razjede milijonom ljudi po svetu. Izjemnost odkritij histaminskih raziskav potrjujeta tudi Nobelovi nagradi, ki sta ju prejela dr. Daniel Bovet leta 1957 in Sir James Black leta 1988.

V zadnjih dveh desetletjih se je zanimanje številnih raziskovalcev in histaminergične farmacevtske industrije usmerilo v potencialno terapevtsko vlogo mediatorjev novejših dveh histaminskih receptorjev,  $H_3R$  in  $H_4R$ .  $H_3R$  je poglobilni dejavnik pri uravnavanju fizioloških učinkov histaminergičnega signaliziranja v osrednjem živčevju, pomembno pa vpliva tudi na aktivnost drugih živčnih prenašalcev. Zadnje raziskave potrjujejo potencialno terapevtsko uporabo ligandov  $H_3R$  za zdravljenje različnih nevrodegenerativnih stanj in motenj spanja. Vloga nedavno odkritega  $H_4R$  še ni dokončno pojasnjena, predklinične študije pa nakazujejo udeležnost pri vnetnih in imunomodulatornih procesih.

## HISTAMINSKI RECEPTOR TIPA 3

Schwartz s sodelavci je odkril  $H_3R$  leta 1983, ko je ugotavljal, da histaminergične živčne celice uravnava svojo aktivnost preko presinaptičnega avtoreceptorja tako, da preko negativne povratne zanke zavirajo sproženje celičnih signalov ter s tem izgradnjo in sproščanje histamina v možganih (slika 1) (6). Študije porazdelitve receptorja so potrdile, da je izražanje  $H_3R$  v veliki meri omejeno na osrednje živčevje, kjer je prisoten v večini možganskih področij, z največjo gostoto v možganski skorji, hipokampusu, bazalnih ganglijah in hipotalamusu (7).

V možganih vretenčarjev se nahajajo telesa histaminergičnih živčnih celic samo v tuberomamilarnem jedru posteriornega dela hipotalamusa, od koder preko ascendentnih in descendentnih eferentnih poti projicirajo široko skozi možgane, tudi v prej omenjena področja. Ta področja uravnava številne



Slika 1. Shematski prikaz porazdelitve in delovanja  $H_3R$  na nevronih v sinapsi (16). HA – histamin,  $H_1R$  – histaminski receptor tipa 1,  $H_2R$  – histaminski receptor tipa 2,  $H_3R$  – histaminski receptor tipa 3, R – drugi (nehistaminski) receptori v osrednjem živčevju, NT – živčni prenašalec (neurotransmitor), NA – noradrenalin, ACh – acetilholin, 5-HT – 5-hidroksitriptamin (serotonin), DA – dopamin, HDC – histidin dekarboksilaza.

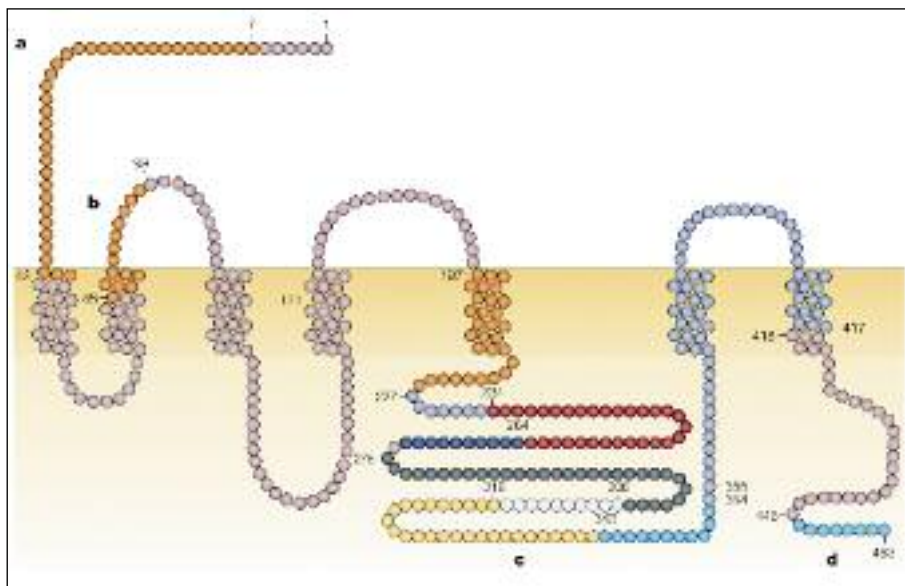
homeostatske fiziološke procese (hipotalamus) kot tudi višje možganske funkcije (možganska skorja in hipokampus) (2). V osrednjem živčevju se  $H_3R$  izraža tudi v področjih, ki so povezana z nocicepcijo (specifična področja v talamusu, dorzalnih koreninskih ganglijih in v hrbtenjači), zato predstavlja potencialno terapevtsko mesto za uravnavanje bolečinskih dražljajev (8).

Izražanje  $H_3R$  ni omejeno le na histaminergične nevrone, pač pa tudi na norepinefrenične populacije živčnih celic, kjer kot presinaptični heteroreceptor uravnava izgradnjo in sproščanje drugih pomembnih živčnih prenašalcev v možganih. Pri glodalcih in človeku tako aktivacija  $H_3R$  zavira sproščanje acetilholina, noradrenalina, dopamina, serotonina,  $\gamma$ -aminomaslene kisline (angl. *gamma-aminobutyric acid*, GABA), glutamata in neuropeptidov (slika 1) (9–15). Pojavlja se tudi kot posinaptični receptor na perikarionu različnih populacij živčnih celic, vendar njegova fiziološka vloga na tem mestu še ni pojasnjena (7).

Poleg osrednjega živčevja se  $H_3R$  izraža tudi v perifernih tkivih, predvsem na nevro-nih perifernega živčnega tkiva v prebavilih, dihalnih poteh in srčno-žilnem sistemu (8). Stopnja izražanja v perifernih tkivih je v primerjavi z osrednjim živčevjem nizka, kar pa je v primeru bodoče uporabe zdravil z delovanjem na ta receptor velika prednost, saj posledično lahko pričakujemo manj perifernih neželenih učinkov.

## MOLEKULARNA BIOLOGIJA GENA HISTAMINSKEGA RECEPTORJA TIPA 3

Genski zapis za  $H_3R$  je leta 1999 uspešno kloniral in natančno določil Lovenberg s sodelavci (17). Izolirana komplementarna DNA človeškega  $H_3R$  (angl. *human histamine receptor type 3*, h $H_3R$ ) kodira 445 aminokislinskih dolgih kisli proteinov z vsemi lastnostmi proteinov iz družine A rodopsinu podobnih, z regulatornimi proteini G sklopljenih receptorjev (18). Glede na stopnjo homologije v aminokislinskih



Slika 2. Različne izooblike histaminskega receptora tipa 3 so posledica alternativnega izrezovanja predinformacijske RNA v zapisu za štiri različne regije proteina (označene a–d) (21). Alternativno izrezovanje v prvi regiji (regija a) lahko privede do krajšega N-terminalnega dela proteina (delecija aminokislin 7–43), izrezovanje v drugi regiji (regija b) pa povzroči delno delečijo druge transmembranske domene in prve znotrajcelične zanke (delecija aminokislin 85–98). V regiji c je alternativno izrezovanje najobsežnejše in vodi do različno dolge tretje znotrajcelične zanke ali do izgradnje histaminskega receptora tipa 3 z odsotnimi transmembranskimi domenami 5, 6 in 7. V regiji d alternativno izrezovanje vodi do nastanka izooblik z osmimi dodatnimi aminokisljinami (446–453) na C-terminalnem delu proteina.

skem zaporedju je hH<sub>3</sub>R najbolj podoben hH<sub>4</sub>R (≈ 60 % homologija na področju transmembranskih domen), mnogo manj pa hH<sub>1</sub>R in hH<sub>2</sub>R (≈ 20 % homologija na področju transmembranskih domen) (17, 19, 20). To je tudi razlog za tako pozno določitev genskega zapisa receptorja hH<sub>3</sub>R, saj kloniranje na osnovi homologij s hH<sub>1</sub>R in hH<sub>2</sub>R ni bilo uspešno.

Gen za hH<sub>3</sub>R se nahaja na kromosomu 20 na lokusu 20q13.133 (HRH3 GeneID: 11255). Za razliko od genov za hH<sub>1</sub>R in hH<sub>2</sub>R, ki ju kodirata eksona brez vmesnih intronov, se v kodirajoče regije hH<sub>3</sub>R vrinjajo trije introni. Posledica take genske strukture je alternativno izrezovanje predinformacijske RNA (angl. *pre-messenger RNA*, pre-mRNA) in s tem izgradnja več izooblik receptorja. Znanih je preko 20 izooblik hH<sub>3</sub>R z različno dolgimi aminskimi (N-) konci, inkluzijami na karboksilnem (C-) koncu, z delecijami na transmembranskih domenah in z različno dolgo tretjo znotrajcelično zanko (slika 2) (21). Izooblike z inkluzijami ali delecijami na tretji

znotrajcelični zanki so deležne največje pozornosti raziskovalcev, saj je ta domena ključna za sklapljanje receptorske molekule z regulatornimi proteini G in tudi razlog za različne farmakološke lastnosti, kot so signalni mehanizmi, vezavne afinitete ligandov ali spontana aktivnost. Vse izooblike nimajo izražene proteinske G-aktivnosti, vendar se predvideva, da sodelujejo pri uravnavanju drugih funkcionalnih izooblik.

Gen za H<sub>3</sub>R so do sedaj klonirali tudi pri različnih živalskih vrstah (pri miši, podgani, morskem prašičku in opici) in pri vseh potrdili prisotnost izooblik (22–29). Med receptorji obstajajo vrstno specifične razlike, ki pomembno vplivajo na molekularne lastnosti, in sicer porazdelitev, funkcionalne lastnosti in farmakološki odziv receptorjev, kar otežuje raziskovalno delo pri vrednotenju učinkovitosti selektivnih ligandov v razmerah *in vivo* (30).

Poleg različnih izooblik receptorja so študije potrdile tudi genske polimorfizme hH<sub>3</sub>R.

Do danes so bili opisani trije polimorfni aleli gena (17, 31, 32). Pretvorbo citozina v timidin na mestu 839 (C839T) gena za  $H_3R$  in zamenjavo alanina z valinom na aminokislinskem mestu 280 (A280V) so odkrili pri bolniku s Shy-Dragerjevimi sindromom (idiopatsko ortostatsko hipotenzijo) – neurodegenerativno boleznijo osrednjega živčevja, za katero je značilna tudi napredujoča disfunkcija avtonomnega živčevja (31, 32). Omenjeni polimorfizem naj bi zaradi mutiranega receptorja povzročil pretirano zaviranje izločanja noradrenalina in tako prispeval k etiologiji omenjenega sindroma (31).

### ZNOTRAJCELIČNE SIGNALNE POTI HISTAMINSKEGA RECEPTORJA TIPA 3

Svojevrsna značilnost  $H_3R$  je velika pestrost znotrajceličnih signalnih poti (slika 3) (33). Pri preučevanju vezave [ $^{35}S$ ] gvanozin trifosfat gama S (angl. [ $^{35}S$ ] *guanosine triphosphate gamma S*, [ $^{35}S$ ]GTP $\gamma$ S) na možganskih tkivih podgane so v prisotnosti toksina oslovskega kašlja ugotovili, da se  $H_3R$  sklaplja z regulatornimi proteini  $G\alpha_{i/o}$  (34). Študije na rekombinantnih in nativnih receptorjih so potrdile, da  $H_3R$  preko proteina  $G\alpha_{i/o}$  inhibira adenilat ciklazo – encim, ki je odgovoren za pretvorbo adenosin-5'-trifosfata (angl. *adenosine 5'-triphosphate*, ATP) v ciklični adenosin-3', 5'-monofosfat (angl. *3'-5'-cyclic adenosine monophosphate*, cAMP). Znižanje znotrajcelične koncentracije cAMP privede do manjše aktivnosti protein kinaze A (PKA), ki uravnava tako transkripcijo genov preko vezavnega proteina za odzivni element za cAMP (angl. *cAMP responsive element binding protein*, CREB), kot tudi aktivnost številnih encimov in receptorjev (35). Preko aktivacije proteina  $G_{i/o}$  sproži  $H_3R$  tudi fosforilacijo z mitogenom aktivirane protein kinaze (MAP-kinaze) in fosfatidilinozitol 3-kinaze (angl. *phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K), aktivira fosfolipazo  $A_2$  (angl. *phospholipase A\_2*, PLA $_2$ ), kar vodi do sproščanja arahidonske kisline, inhibira izmenjevalec  $Na^+/H^+$  in inhibira s  $K^+$ -induciran prehod kalcijevih ionov v celice (slika 3) (33).

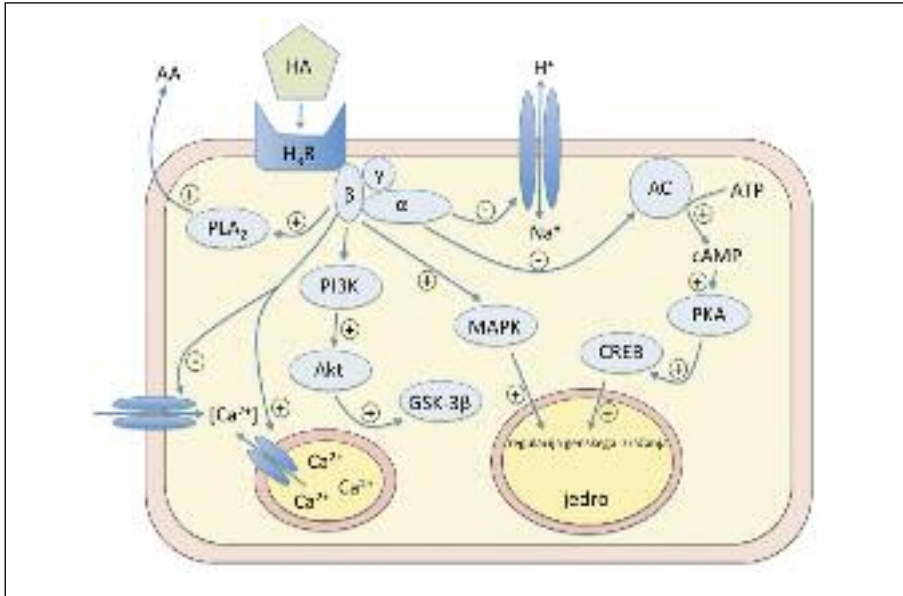
Inhibicija nivojev cAMP in cAMP/PKA kaskade ter signalne poti kalcija in od kalmo-

dulina odvisne protein kinaze II predstavlja glavno signalno pot, preko katere  $H_3R$  na histaminergičnih živčnih končičih zavira izgradnjo in sproščanje histamina (36–38). Podobni signalni mehanizmi naj bi bili udeleženi tudi pri zaviranju sproščanja drugih živčnih prenašalcev, ki poteka po aktivaciji heterogenega  $H_3R$  na nehistaminergičnih živčnih celicah (39, 40). MAP-kinazna pot uravnava celično rast, diferenciacijo in preživetje nevronov, zato je pomembna pri vzdrževanju sinaptične plastičnosti in s tem kognitivnih funkcij (npr. spomin) (41). PI3K aktivira protein kinazo B (znana tudi kot Akt), ki nadalje fosforilira in s tem inhibira delovanje glikogen-sintaze-kinaze 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) – poglavitne tau kinaze v možganih (42).

Med embrionalnim razvojem je  $H_3R$  specifično izražen le v določenih predelih možganov, zato se predvideva, da je aktivacija Akt preko teh receptorjev pomembna pri nadzoru nevronske migracije (43). V odraslem živčevju normalna Akt/GSK-3 $\beta$ -kinazna aktivnost zavira apoptozo nevronov, medtem ko spremembe njene aktivnosti spremljajo Alzheimerjevo bolezen, nevrološke motnje in shizofrenijo (44–46). V patoloških stanjih, kot so ishemične poškodbe, Alzheimerjeva bolezen in Parkinsonova bolezen, je bila ugotovljena tudi pretirana aktivnost PLA $_2$ , ki poleg arahidonske kisline povzroča sproščanje lipidnih mediatorjev, ki prožijo nevronske apoptozo (47).

### SPONTANA AKTIVNOST HISTAMINSKEGA RECEPTORJA TIPA 3

H kompleksnemu delovanju  $H_3R$  prispeva poleg pestrosti znotrajceličnih signalnih poti tudi visoka stopnja spontane (konstitutivne) aktivnosti, tj. aktivnosti v odsotnosti agonista (48).  $H_3R$  je alosterični protein, ki v ravnotežnem stanju zavzema različne konformacijske oblike. Spontano aktivna oblika receptorja se sklaplja s proteinom G in sproža znotrajcelične signalne poti. Spontana aktivnost  $H_3R$  je bila sprva določena na celičnih linijah, kjer je velika gostota nekaterih rekombinantno izraženih izooblik sovpadala s spontano inhibicijo adenilat ciklaze, vezavo [ $^{35}S$ ]GTP $\gamma$ S in s povečanim sproščanjem arahidonske kisli-



Slika 3. Znotrajcelične signalne poti, ki potekajo preko aktivacije histaminskih receptorjev tipa 3. Receptor preko aktivacije proteinov  $G_{\beta/\gamma}$  sproži inhibicijo adenilat ciklaze, fosforilacijo z mitogenom aktivirane proteinske kinaze in fosfoinozitolid 3-kinaze, spodbuja fosfolipazo  $A_2$ , kar vodi do sproščanja arahidonske kisline, inhibira izmenjevalec  $Na^+/H^+$  in s  $K^+$ -induciranim prehodom kalcijevih ionov v celice (21). AA – arahidonska kislina (angl. arachidonic acid), HA – histamin,  $H_3R$  – histaminski receptor tipa 3,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  – podenote proteinov G,  $PLA_2$  – fosfolipaza  $A_2$  (angl. phospholipase  $A_2$ ),  $PI3K$  – fosfatidilinozitol 3-kinaza (angl. phosphatidylinositol 3-kinase), Akt – protein kinaza B,  $GSK3\beta$  – glikogen-sintaze-kinaza  $3\beta$ , MAPK – z mitogenom aktivirana protein kinaza, AC – adenilat ciklaza, ATP – adenzin-5'-trifosfat (angl. adenosine 5'-triphosphate), cAMP – ciklični adenzin-3',5'-monofosfat (angl. 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate), PKA – protein kinaza A, CREB – vezavni protein za odzivni element za ciklični adenzin-3',5'-monofosfat (angl. cAMP responsive element binding protein).

ne (49–51). Študije na možganih glodavcev so visok delež spontano aktivnih  $H_3R$  določile tudi v razmerah *in vivo* in potrdile njihovo pomembno fiziološko vlogo, saj naj bi presinaptični receptor preko tega mehanizma zaviral nevronske aktivnosti (37, 49–51).

Stopnja spontane aktivnosti receptorja je odvisna od živalske vrste, izooblike, celične gostote ter znotrajceličnih signalnih poti, zanj pa je odgovorno kratko aminokislinsko zaporedje na C-koncu tretje znotrajcelične zanke (32, 52). Spontano aktivnost receptorja lahko učinkovito inhibirajo samo inverzni agonisti; to so snovi, ki se vežejo na isti receptor kot agonisti, ga ne aktivirajo, ampak povzročijo nasprotni učinek kot agonisti, ker stabilizirajo receptor v njegovi neaktivni konformaciji. Tako preprečujejo sklapljanje  $H_3R$  s proteinom G in posledično aktivirajo endogeno sproščanje histamina in drugih živčnih

prenašalcev. Številni klasični antagonisti  $H_3R$  (npr. tioperamid, klobenoprit in ciproksifan) v resnici delujejo kot inverzni agonisti (49, 50).

## HISTAMINSKI RECEPTOR TIPA 3 IN ASTROCITI

Astrociti so najštevilnejše celice glije, ki so zaradi svoje edinstvene sposobnosti spreminjanja funkcije in prilagajanja na spremembe v mikrookolju aktivni dejavniki delovanja osrednjega živčevja. Interakcije med astrociti in živčnimi celicami so ključne za uravnavanje strukturne in funkcionalne sinaptične plastičnosti v času razvoja živčevja in pri odraslih, posegajo pa tudi v procese regeneracije poškodovanih možganov (53–55). Astrociti so pomembne tarčne celice histaminergičnih nevronov. Študije so potrdile, da astrociti iz različnih predelov osrednjega živčevja sesal-

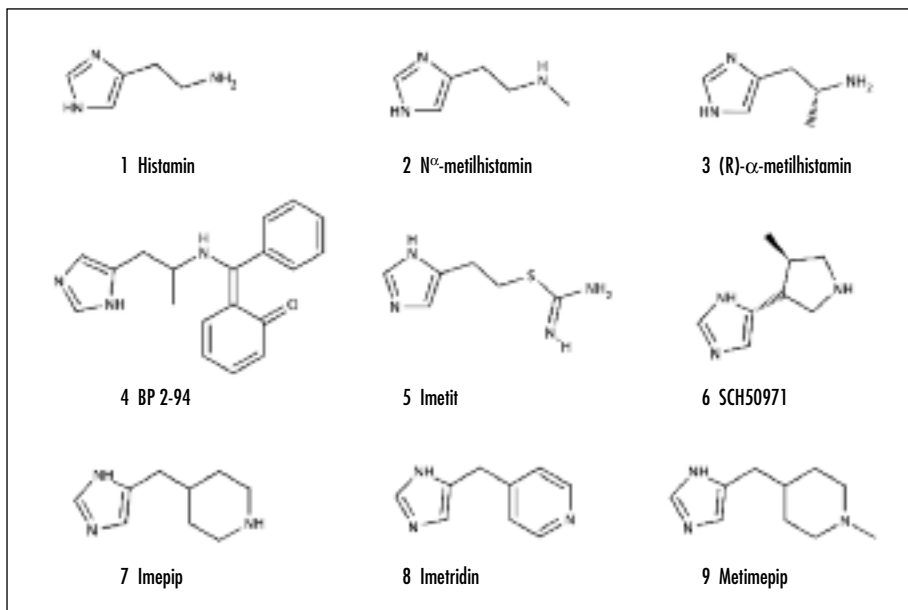
cev izražajo  $H_1R$  in  $H_2R$  (56–58). Astrociti privzemajo in razgrajujejo histamin iz okolja, histamin pa uravnava astrocitno rast in proliferacijo, razgradnjo glikogena ter preko  $H_1R$  zvišuje znotrajcelično aktivnost kalcija, kar pomembno prispeva k sproščanju t. i. glijalnih prenašalcev (glijatransmitorjev) (59–65). Histamin uravnava tudi izgradnjo astrocitnih citokinov in nevrotrofičnih dejavnikov (58, 66–68).

Naša študija na astrocitih možganske skorje podgane je pokazala, da poleg že znanih dveh podtipov histaminskih receptorjev te celice izražajo tudi  $H_3R$  (69). Tako kot nevronski se tudi astrocitni  $H_3R$  sklaplja s proteini  $G\alpha_{i/o}$ , preko inhibicije adenilat ciklaze znižuje znotrajcelične koncentracije cAMP, aktivira MAP-kinazno signalno pot, preko fosfolipaze C pa aktivira protein kinazo C. Zanimivo je, da spontane aktivnosti tega receptorja, ki bi uravnava nivoje znotrajceličnega cAMP, nismo zaznali. Potrdili smo tudi funkcionalno vlogo astrocitnega  $H_3R$ , saj histamin preko aktivacije vseh treh histaminskih receptorskih podtipov in njihovih znotrajceličnih signalnih poti, ki se združijo na nivoju aktivacije MAP-kinazne poti, spodbuja gensko izražanje in proteinsko izgradnjo nevrotrofičnega dejavnika

nevrotrofina-3 (NT-3) (69). V možganih podgane so izolirali več izooblik  $H_3R$ , zato želimo ugotoviti prisotnost teh izooblik tudi na astrocitih ter proučiti njihove vezavne lastnosti in specifične signalne poti (23). Odkritje astrocitnega  $H_3R$  pomembno prispeva k poznavanju interakcij med histaminskim sistemom in glijalnimi celicami, njegove funkcionalne lastnosti pa potrjujejo kompleksno naravo in nakazujejo udeležnost pri uravnavanju delovanja osrednjega živčevja.

## LIGANDI HISTAMINSKIH RECEPTORJEV TIPA 3

Histamin se veže na  $H_3R$  z visoko afiniteto, zato je v začetni fazi razvoja specifičnih ligandov veljalo prepričanje, da je imidazolni obroč, ki je strukturna lastnost histamina, nujen za doseg potrebne afinitete za vezavo na receptor. Izgradnja dodatnih funkcionalnih skupin (substituentov) na imidazolni obroč je preprečila vezavo na  $H_3R$ , modifikacija endogenega liganda v stranski verigi pa je vodila v izgradnjo 4-substituiranih imidazolov – učinkovitih in selektivnih agonistov  $H_3R$  (slika 4) (70). (R)- $\alpha$ -metilhistamin je danes v farmakologiji najbolj pogosto uporab-

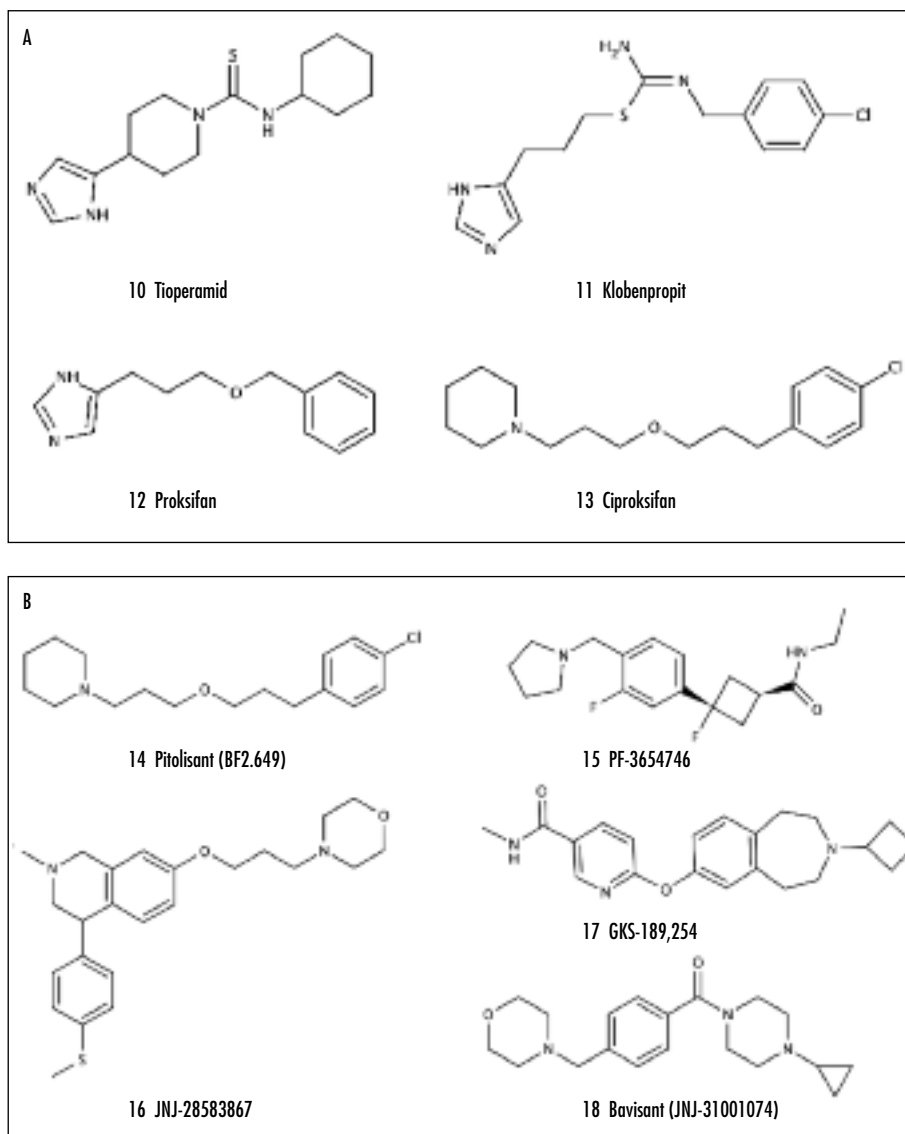


Slika 4. Histamin in predstavniki sinteznih agonistov histaminskih receptorjev tipa 3.

ljen agonist, vendar je njegova uporaba v razmerah *in vivo* precej omejena zaradi visoke bazičnosti in hidrofilnosti ter obsežnega metabolizma prvega prehoda (71).

Z vezavo azometinske skupine na (R)- $\alpha$ -metilhistamin je nastala spojina BP 2-94 – predzdravilo z večjo biološko uporabnostjo in izboljšanimi farmakokinetičnimi lastnostmi ter prva učinkovina s potencialno terapevtsko uporabnostjo za različna periferna bolezenska sta-

nja (72, 73). Zamenjava aminske skupine z izotiosečnino (imetit) in pretvorba fleksibilne stranske verige v rigidno strukturo z uvedbo pirolidinskega (SCH50971) ali piperidinskega obroča (imepip) je povečala selektivnost in afiniteto vezave agonistov na  $H_3R$  ter sposobnost njihovega prehajanja v osrednje živčevje (74–76). S strukturnimi modifikacijami se je povečala tudi selektivnost agonistov za  $H_3R$  v primerjavi z receptorjem  $H_4R$ ; imetri-



Slika 5. A – imidazolni antagonisti histaminskega receptorja tipa 3, B – neimidazolni antagonisti histaminskega receptorja tipa 3.



din je 300-krat in metimepip 2.000-krat selektivnejši za H<sub>3</sub>R (77, 78).

Tako kot prva generacija agonistov je bila tudi prva generacija antagonistov H<sub>3</sub>R osnovana na strukturi histaminskega imidazolnega heterocikla (slika 5A). Tioperamid, ciproksifan, proksifan in klobenpripit so veljali za referenčne spojine, vendar se je izkazalo, da je bazični imidazolni obroč odgovoren za številne stranske in nepredvidljive učinke, kot so interakcije s citokromi P450 in slabo prehajanje v osrednje živčevje (79). Imidazolni antagonistni imajo manjšo potencialno terapevtsko uporabnost v primerjavi z neimidazolnimi, vendar so zelo uporabni v številnih nekliničnih farmakoloških raziskavah, kot so vezavne študije, klasifikacija histaminskih podtipov, poskusi v razmerah *in vitro* ipd.

Vrstno specifične razlike v učinkovitosti imidazolnih antagonistov ter razlike v vrednotenju njihove učinkovitosti v razmerah *in vivo* so pospešile iskanje drugačnih bazičnih skupin in s tem razvoj neimidazolnih antagonistov H<sub>3</sub>R (slika 5B). Imidazolni obroč so zamenjali z različnimi sekundarnimi in s terciarnimi aminami, predvsem v obliki alifatskih heterociklov, kot so npr. piperidin, piperazin, pirolidin, 2-aminopirolidin in morfolin (80). Zaradi močnejših farmakoloških učinkov in manjših far-

makokinetičnih interakcij danes med neimidazolnimi antagonistami H<sub>3</sub>R prevladujejo spojine, ki vsebujejo piperidin (slika 5B) (81).

Razvoj zdravilnih učinkovin, ki delujejo na H<sub>3</sub>R, je usmerjen v izgradnjo spojin, ki so sposobne učinkovito inhibirati agonistično delovanja histamina in zavirati spontano aktivnost receptorja. Kompleksno delovanje receptorja in spremenljivost njegovih lastnosti med živalskimi vrstami in pri človeku zahteva skrbno načrtovanje novih selektivnih antagonistov/inverznih agonistov, ki jih bomo v prihodnosti lahko uporabljali v klinične namene. Raziskave na tem področju so intenzivne, saj je več takih spojin že v fazi II in III kliničnega preizkušanja zdravil za zdravljenje nekaterih bolezni, ki prizadenejo kognitivne funkcije, stanje budnosti in energijsko homeostazo (tabela 1) (82–84).

## POTENCIALNA TERAPEVTSKA UPORABA LIGANDOV HISTAMINSKIH RECEPTORJEV TIPA 3

### Upad kognitivnih funkcij

Kognitivne oz. spoznavne funkcije so tiste zmožnosti, ki so najbolj značilne za človeka

Tabela 1. Antagonisti/inverzni agonisti histaminskega receptorja tipa 3, ki so v kliničnih fazah preizkušanja zdravil za zdravljenje bolezni osrednjega živčevja (84). ADHD – motnja pomanjkanja pozornosti s hiperaktivnostjo (angl. attention deficit hyperactivity disorder).

Obolenje	Učinkovina	Indikacija	Klinična faza
narkolepsija	Pitolisant (BF2.649)	zaspanost	III
	Pitolisant (BF2.649)	katapleksija	III
	JNJ-17216498 <sup>a</sup>	zaspanost	II
	PF-03654746	zaspanost	II
	GSK-189,254	zaspanost	II
Alzheimerjeva bolezen	GSK-189,254	blaga/srednja	II
	MK-0249 <sup>a</sup>	blaga/srednja	II
	PF-03654746	blaga/srednja	I
ADHD	JNJ-31001074 (Bovisant)	odrasli in otroci	II
shizofrenija	Pitolisant (BF2.649)	kognitivna oškodovanost	II
	GSK-239512 <sup>a</sup>	kognitivna oškodovanost	II
	MK-0249 <sup>a</sup>	kognitivna oškodovanost	II
Parkinsonova bolezen	Pitolisant (BF2.649)	zaspanost	III

<sup>a</sup> Kemijske strukture še niso poznane, ker so pod patentno zaščito.

in vključujejo sposobnost učenja, pomnjenja, koncentracije, motivacije, pozornosti ipd. Nastajajo v kompleksni mreži asociacijskih področij možganske skorje in ostalih delov živčevja (85). Različna nevrodegenerativna obolenja in duševne motnje, vključno z motnjo pomanjkanja pozornosti s hiperaktivnostjo (angl. *attention deficit hyperactivity disorder*, ADHD), Alzheimerjevo boleznijo (angl. *Alzheimer's disease*, AD) in shizofrenijo, spremlja upad kognitivnih sposobnosti. Na voljo je veliko terapevtskih pristopov za zdravljenje omenjenih stanj (psihostimulansi pri ADHD, holinesterazni inhibitorji pri AD, antipsihotiki pri shizofreniji), vendar je njihova učinkovitost nepopolna, neželeni učinki pa pogosti.

Histaminski sistem je pomemben modulator kognitivnih funkcij (83, 85–87). Histamin kot ekscitatorni živčni prenašalec, ki posinaptično vzburja  $H_1R$  in  $H_2R$  ter povzroči obsežno aktivacijo možganske skorje, spodbuja budnost in pozornost. Z delovanjem na  $H_3R$  uravnava svojo izgradnjo in sproščanje, pa tudi eksocitozo drugih živčnih prenašalcev. Farmakološka blokada inhibitornega  $H_3R$  s selektivnimi antagonistami/inverzni agonisti lahko spodbudi sproščanje živčnih prenašalcev in aktivira nevrnske poti, ki so udeležene pri uravnavanju kognitivnih procesov v osrednjem živčevju, zato predstavlja modulacija  $H_3R$  obetaven način zdravljenja okrnjenih kognitivnih funkcij in izjemno zanimivo področje predkliničnih in kliničnih raziskav (1, 85).

Predklinične raziskave so potrdile, da antagonistami/inverzni agonisti  $H_3R$  aktivirajo histaminergične živčne celice in spodbujajo različne nevrokemijske in vedenjske odzive (16, 83, 86). Študije so potekale na modelnih sistemih glodavcev, ki so jim z uporabo antiholinergikov (npr. skopolamin) ali antagonistov N-metil-D-aspartata (NMDA) (npr. dizocilpin) oslabili normalno kognitivno delovanje. Živali so izgubile prostorsko orientiranost in sposobnosti pomnjenja, kar je značilno za bolnike z AD. Omenjeni posegi so jim oslabili tudi socialni spomin, kar spremlja AD, shizofrenijo in ADHD. Na teh živalskih modelih je bilo možno oceniti tudi impulzivnost (pomemben sestavni del ADHD) in izvršilno dejavnost (motena pri shizofreniji) (87).

Strukturno različni antagonistami/inverzni agonisti  $H_3R$  so v vedenjskih testih na glodavcih, kot so socialni spomin, delovni spomin, prepoznavanje objektov, orientiranje v labirintih ipd., preprečili spremembe, inducirane s skopolaminom. Njihovi prokognitivni učinki so bili posledica inhibicije  $H_3R$  v holineričnem bazalnem jedru, kar je močno povečalo nivoje acetilholina – ključnega živčnega prenašalca pri uravnavanju pozornosti in pomnjenja – v možganski skorji, ugotovljena pa je bila tudi aktivacija dopaminergičnih in noradrenergičnih živčnih celic v prefrontalni možganski skorji (83). Z vlogo inhibitorjev  $H_3R$  se ujema tudi poskus na  $H_3R^{-/-}$ -miših, ki ne vsebujejo genskega zapisa za  $H_3R$ . Te živali so imele normalno sposobnost pomnjenja in učenja, vendar so bile odporne na amnestično delovanje skopolamina (88).

Modulacija sproščanja dopamina predstavlja terapevtski izziv za zdravljenje shizofrenije, kjer nezadostna aktivnost dopaminskega sistema povzroča negativne simptome in kognitivni upad (89). Ker histaminergične živčne celice oživčujejo področja, ki so tesno povezana z razvojem shizofrenije, bi antagonistami/inverzni agonisti  $H_3R$  lahko vplivali na patofiziologijo bolezni. Raziskave na živalskih modelih za študij mehanizmov shizofrenije, pozornosti in kognitivnih sposobnosti so potrdile njihovo antipsihotično delovanje, saj so spodbujali nivoje dopamina in acetilholina v prefrontalni možganski skorji, zmanjšali primanjkljaj senzorične aktivnosti ali zavrli z metamfetaminom povzročeno psihomotorično aktivnost (90).

Antagonisti/inverzni agonisti  $H_3R$  vplivajo na prenos več živčnih prenašalcev v osrednjem živčevju, zato predstavljajo velik izziv za razvoj učinkovitih zdravilnih snovi, ki bodo ponovno vzpostavile okrnjeno delovanje živčnih prenašalcev, brez sočasnega vpliva na normalno delovanje možganov. Hkrati s predkliničnimi študijami potekajo tudi klinične raziskave, ki preučujejo prokognitivne lastnosti antagonistov/inverzni agonistov, kot so Pitolisant ali BF2.649, GSK-239512, MK-0249, PF-03654746 in JNJ-31001074 pri bolnikih z AD ali shizofrenijo (91, 92). Prav tako je v začetnih fazah preizkušanja substanca JNJ-31001074, ki je v predkliničnih študijah na živalskem modelu ADHD učinkovito

zavirala pretirano aktivnost in impulzivnost ter predstavlja obetaven izboljševalec kognicije pri motnjah pozornosti (93). Rezultati kliničnih študij omenjenih ligandov  $H_3R$  vlivajo upanje, da bo v prihodnosti možno tudi z njihovo pomočjo omiliti upad kognitivnih funkcij pri bolnikih z različnimi nevrodegenerativnimi obolenji in duševnimi motnjami (tabela 1).

## Motnje spanja

Kompleksno izmenjavo budnosti in spanja v cirkadianem ritmu uravnava več sistemov živčnih prenašalcev (histamin, noradrenalin, glutamat, acetilholin, GABA ter oreksin, ki je peptidni nevrotransmitor, ki vpliva na hranjenje in budnost in katerega pomanjkanje ima ključno vlogo pri narkolepsiji) (85, 94). Fiziološka vloga histamina pri tem procesu je bila prvič omenjena v 70. letih prejšnjega stoletja, danes pa je podprta s številnimi študijami, ki potrjujejo, da projekcije histaminergičnih živčnih celic v možgansko skorjo in nekatere druge predele osrednjega živčevja predstavljajo eno glavnih nevronske poti, ki spodbujajo zavest in budnost (95). Histaminergični nevroni imajo večjo prožilno aktivnost v budnem stanju kot v spanju (94). Zavariranje inhibitornega delovanja  $H_3R$  poveča vzdražnost in odzivnost histaminskih živčnih celic in spodbuja sproščanje histamina, ki s stimulacijo posinaptičnih  $H_1R$  povzroči obsežno aktivacijo osrednjega živčevja (96, 97). Za vrsto antagonistov/inverznih agonistov  $H_3R$  so na različnih živalskih modelih potrdili, da spodbujajo izgradnjo in sproščanje histamina, ohranjanje budnosti, zmanjšajo fazo spanja s hitrim gibanjem očesnih zrkel (angl. *rapid-eye movement*) in skrajšajo čas spanja v stanju nizke možganske aktivnosti, njihova sposobnost ohranjanja budnosti pa je povezana s povečano aktivnostjo histaminskega sistema in drugih ascendentnih sistemov retikularne formacije (noradrenergičnega, holinergičnega ali dopaminergičnega) (96, 98, 99).

Obetavni rezultati predkliničnih raziskav na različnih živalskih modelnih sistemih so nakazali možnost klinične uporabe inverznih agonistov  $H_3R$  za zdravljenje simptomov prekomerne zaspanosti (narkolepsija s katapleksijo, Parkinsonova bolezen) (16, 84, 96). Pitolisant ali BF2.649 je bil prvi inverzni

agonist  $H_3R$ , ki so ga uporabili v pilotskih kliničnih raziskavah pri bolnikih z različnimi motnjami budnosti. Rezultati kliničnih raziskav faze II in III so pokazali značilno zmanjšanje števila in trajanje dnevnega spanja ter zmanjšanje frekvence katapleksičnih epizod pri bolnikih z narkolepsijo, opazno pa je bilo tudi zmanjšanje dnevne zaspanosti pri bolnikih s Parkinsonovo boleznijo (93). Drugi inverzni agonisti, kot so JNJ-17216498, PF-03654746 ali GSK-189254, šele vstopajo v fazo II kliničnih raziskav za zdravljenje narkolepsije, zato rezultati še niso znani (tabela 1).

## Debelost

Debelost je kronična bolezen energijske homeostaze, ki postaja zdravstveni problem epidemičnih razsežnosti. S prekomerno telesno težo se pomembno povečuje pojavnost srčnožilnih obolenj, sladkorne bolezni tipa 2, nekaterih rakavih obolenj, obstruktivne apneje v spanju in ostalih bolezni, zato predstavlja učinkovito zdravljenje debelosti pomemben izziv za farmacevtsko industrijo. Farmakološko zdravljenje debelosti temelji na modulaciji presnove maščob (orlistat – periferni inhibitor lipaz), uporaba centralnih zaviralcev apetita pa zaradi resnih psihiatričnih in srčnožilnih neželenih učinkov za zdaj ni varna. Nezadostna učinkovitost zdravljenja te bolezni zato vodi v iskanje novih terapevtskih pristopov.

Histaminski sistem je udeležen pri uravnavanju apetita in energijske homeostaze (100). Študije na živalskih modelih debelosti so pokazale, da histamin preko posinaptičnega  $H_1R$  v ventromedialnem delu hipotalamusa zavira vnos hrane, akumulacijo maščob in nivo leptina ter omili inzulinsko rezistenco (101–104). Udeležnost  $H_1R$  in z njim povezane aktivacije hipotalamične adenosin-5'-monofosfat (angl. *adenosine-5'-monophosphate*, AMP) kinaze pri uravnavanju apetita so potrdile tudi študije na modelu miši z izbitim genom za  $H_1R$  ter neželeni učinki zdravljenja s klasičnimi antihistaminiki ( $H_1R$ -antagonisti prve generacije), antidepresivi in antipsihotiki z afiniteto do  $H_1R$ , za katere je znano, da povečujejo apetit in telesno težo pri živalih in ljudeh (105). Zaradi omenjene vloge histamina pri nadzoru apetita so predvidevali,

da bi lahko z inhibicijo  $H_3R$  dosegli povišanje nivojev histamina v osrednjem živčevju in tako zmanjšali vnos hrane, kar je študija s klobenpropitom na živalskem modelu debelosti tudi potrdila (106).

Nekatere raziskave tej hipotezi nasprotujejo. Tako je npr. tioperamid povečal, imetit (agonist  $H_3R$ ) pa zmanjšal apetit in vnos hrane; ta učinek je bil pri miših z izbitim genom za  $H_3R$  odsoten (107). Študije torej kažejo, da je delovanje modulatorjev  $H_3R$  pri uravnavanju apetita kompleksno in poleg histamina odvisno tudi od drugih živčnih prenašalcev in njihovih vplivov na oreksinski sistem. Antagonisti/inverzni agonisti  $H_3R$ , ki so v kliničnih fazah preizkušanja zdravil za zdravljenje narkolepsije ali ADHD, niso imeli pomembnega vpliva na telesno težo (tabela 1). Zanimivo bo videti, ali bo faza II klinične raziskave s substanco SCH 497079 potrdila vpliv na zmanjšan vnos hrane in izgubo telesne teže.

## Bolečina

Histamin je eden izmed glavnih posrednikov lokalnega vnetja in je vključen tako v periferno kot tudi v centralno nocicepcijo (108). Kadar se histamin sprošča na perifernih mestih, povzroča bolečino in aktivacijo z bolečino povezanih signalnih poti v primarnih aferentnih živčnih vlaknih. V osrednjem živčevju histamin vpliva na prenos bolečinskih signalov, predvsem preko vpliva na bolečinsko zaznavanje v talamusu in možganski skorji. Pokazali so, da je tioperamid (antagonist  $H_3R$ ) preprečil z imetitom povzročeno hiperalgezijo le v pozni fazi, ki je odgovorna za vnetno bolečino (109). V primeru aplikacije tioperamida v možganske prekate (intracerebroventrikularno) pride do povišanja bolečinskega vzdražnega praga na modelu nevropatške bolečine z delno ligacijo perifernega živca, medtem ko ga sistemska (intravenska) aplikacija zniža (110).

Ti podatki kažejo, da bi lahko bili agonisti  $H_3R$  uporabni za zdravljenje vnetnega tipa bolečine, antagonisti  $H_3R$  pa za zdravljenje nevropatške bolečine. Razlaga teh rezultatov

je še posebej težka, saj imajo svojo vlogo pri prenosu bolečine tudi  $H_4R$ . Pri tem je treba omeniti, da sta agonist imetit in antagonist tioperamid tudi liganda  $H_4R$ . Uporaba bolj specifičnega antagonista/inverznega agonista GSK207040 je značilno inhibirala s kapsaicinom povzročeno sekundarno alodinijo (tj. stanje, pri katerem normalno neboleči dražljaji povzročijo bolečino) v primerjavi s kontrolno skupino (111). To dokazuje, da so pri bolečini, povezani z vnetjem, antagonisti  $H_3R$  učinkovitejši kot agonisti. Vsekakor bodo potrebne nadaljnje raziskave, ki bodo natančneje pojasnile vlogo perifernih, spinalnih in možganskih  $H_3R$  pri različnih tipih bolečine.

## ZAKLJUČEK

Veliko zanimanje raziskovalcev je pripomoglo k pomembnemu napredku pri poznavanju vloge  $H_3R$  v osrednjem živčevju. Preko preučevanja molekularnih (izoblike, tkivna porazdelitev), farmakoloških (vezavne afinitete ligandov) in funkcionalnih lastnosti (spontana aktivnost, znotrajcelični signalni mehanizmi) danes bolje razumemo njegovo izjemno kompleksno naravo. Izgradnja visoko učinkovitih in selektivnih antagonistov/inverzni agonistov  $H_3R$  je omogočila številne predklinične študije na živalskih modelih ter začetne klinične raziskave nekaterih od teh ligandov za zdravljenje različnih bolezni, ki prizadenejo kognitivne funkcije, budnost in energijsko homeostazo.

Cilj razvoja ligandov  $H_3R$  je terapevtska uporabnost. Iz trenutno javno dostopnih podatkov je govoriti o uspehu ali neuspehu posameznih zdravilnih učinkovin prehitro, saj je večina kliničnih raziskav še v teku. Hkrati je nemogoče predvideti, ali bodo antagonisti/inverzni agonisti  $H_3R$  enako uspešni pri ljudeh, kot so bili pri glodavcih. Razvoj učinkovin, ki delujejo na ta receptor, je intenziven in finančno podprt – odprto ostaja le vprašanje, ali bomo kmalu videli oglaševanje v smislu »postanite pametnejši in vitkejši« ali pa bo interes farmacevtske industrije zaradi dolgotrajnosti raziskav zamrl.

## LITERATURA

1. Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O. Histamine in the nervous system. *Physiol Rev.* 2008; 88 (3): 1183–241.
2. Hough LB, Leurs R. Histamine. In: Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, et al., eds. *Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects.* 7th ed. Burlington (MA): Elsevier Academic Press; 2006. p. 249–65.
3. Barger G, Dale HH. Chemical structure and sympathomimetic action of amines. *J Physiol.* 1910; 41 (12): 19–59.
4. Dale HH, Laidlaw PP. The physiological action of beta-imidazolylethylamine. *J Physiol.* 1910; 41 (5): 318–44.
5. Bovet D, Staub A. Action protectrice des éthers phénoliques au course de l'intoxication histaminique. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1936; 124: 547–9.
6. Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature.* 1983; 302 (5911): 832–7.
7. Pillot C, Heron A, Cochois V, et al. A detailed mapping of the histamine H(3) receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience.* 2002; 114 (1): 173–93.
8. Cannon KE, Chazot PL, Hann V, et al. Immunohistochemical localization of histamine H3 receptors in rodent skin, dorsal root ganglia, superior cervical ganglia, and spinal cord: potential antinociceptive targets. *Pain.* 2007; 129 (1–2): 76–92.
9. Clapham J, Kilpatrick GJ. Histamine H3 receptors modulate the release of [3H]-acetylcholine from slices of rat entorhinal cortex: evidence for the possible existence of H3 receptor subtypes. *Br J Pharmacol.* 1992; 107 (4): 919–23.
10. Schlicker E, Fink K, Hinterthaler M, et al. Inhibition of noradrenaline release in the rat brain cortex via presynaptic H3 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1989; 340 (6): 633–8.
11. Schlicker E, Fink K, Detzner M, et al. Histamine inhibits dopamine release in the mouse striatum via presynaptic H3 receptors. *J Neural Transm Gen Sect.* 1993; 93 (1): 1–10.
12. Schlicker E, Betz R, Göthert M. Histamine H3 receptor-mediated inhibition of serotonin release in the rat brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1988; 337 (5): 588–90.
13. Arias-Montaña JA, Floran B, Garcia M, et al. Histamine H(3) receptor-mediated inhibition of depolarization-induced, dopamine D(1) receptor-dependent release of [(3)H]-gamma-aminobutyric acid from rat striatal slices. *Br J Pharmacol.* 2001; 133 (1): 165–71.
14. Molina-Hernández A, Nuñez A, Sierra JJ, et al. Histamine H3 receptor activation inhibits glutamate release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology.* 2001; 41 (8): 928–34.
15. Pillot C, Héron A, Schwartz JC, et al. Ciproxifan, a histamine H3-receptor antagonist/inverse agonist, modulates the effects of methamphetamine on neuropeptide mRNA expression in rat striatum. *Eur J Neurosci.* 2003; 17 (2): 307–14.
16. Esbenschade TA, Fox GB, Cowart MD. Histamine H3 receptor antagonists: preclinical promise for treating obesity and cognitive disorders. *Mol Interv.* 2006; 6 (2): 77–88.
17. Lovenberg TW, Roland BL, Wilson SJ, et al. Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor. *Mol Pharmacol.* 1999; 55 (6): 1101–7.
18. Leurs R, Hoffmann M, Wieland K, et al. H3 receptor gene is cloned at last. *Trends Pharmacol Sci.* 2000; 21 (1): 11–2.
19. Zhu Y, Michalovich D, Wu H, et al. Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor. *Mol Pharmacol.* 2001; 59 (3): 434–41.
20. Liu C, Ma X, Jiang X, et al. Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H(4)) expressed in bone marrow. *Mol Pharmacol.* 2001; 59 (3): 420–6.
21. Leurs R, Bakker RA, Timmerman H, et al. The histamine H3 receptor: from gene cloning to H3 receptor drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4 (2): 107–20.
22. Chen J, Liu C, Lovenberg TW. Molecular and pharmacological characterization of the mouse histamine H3 receptor. *Eur J Pharmacol.* 2003; 467 (1–3): 57–65.
23. Drutel G, Peitsaro N, Karlstedt K, et al. Identification of rat H3 receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. *Mol Pharmacol.* 2001; 59 (1): 1–8.
24. Cassar S. Cloning of the guinea pig H3 receptor. *Neuroreport.* 2000; 11 (12): L3–4.
25. Yao BB, Sharma R, Cassar S, et al. Cloning and pharmacological characterization of the monkey histamine H3 receptor. *Eur J Pharmacol.* 2003; 482 (1–3): 49–60.
26. Rouleau A, Heron A, Cochois V, et al. Cloning and expression of the mouse histamine H3 receptor: evidence for multiple isoforms. *J Neurochem.* 2004; 90 (6): 1331–8.
27. Morisset S, Sasse A, Gbahou F, et al. The rat H3 receptor: gene organization and multiple isoforms. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 280 (1): 75–80.
28. Tardivel-Lacombe J, Rouleau A, Héron A, et al. Cloning and cerebral expression of the guinea pig histamine H3 receptor: evidence for two isoforms. *Neuroreport.* 2000; 11 (4): 755–9.
29. Strakhova MI, Fox GB, Carr TL, et al. Cloning and characterization of the monkey histamine H3 receptor isoforms. *Eur J Pharmacol.* 2008; 601 (1–3): 8–15.

30. Lovenberg TW, Pyati J, Chang H, et al. Cloning of rat histamine H(3) receptor reveals distinct species pharmacological profiles. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 293 (3): 771–8.
31. Wiedemann P, Bönisch H, Oerters F, et al. Structure of the human histamine H3 receptor gene (HRH3) and identification of naturally occurring variations. *J Neural Transm.* 2002; 109 (4): 443–53.
32. Hancock AA, Esbenshade TA, Krueger KM, et al. Genetic and pharmacological aspects of histamine H3 receptor heterogeneity. *Life Sci.* 2003; 73 (24): 3043–72.
33. Bongers G, Bakker RA, Leurs R. Molecular aspects of the histamine H3 receptor. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73 (8): 1195–204.
34. Clark EA, Hill SJ. Sensitivity of histamine H3 receptor agonist-stimulated [35S]GTP gamma[S] binding to pertussis toxin. *Eur J Pharmacol.* 1996; 296 (2): 223–5.
35. Brandon EP, Idzerda RL, McKnight GS. PKA isoforms, neural pathways, and behaviour: making the connection. *Curr Opin Neurobiol.* 1997; 7 (3): 397–403.
36. Torrent A, Moreno-Delgado D, Gómez-Ramírez J, et al. H3 autoreceptors modulate histamine synthesis through calcium/calmodulin- and cAMP-dependent protein kinase pathways. *Mol Pharmacol.* 2005; 67 (1): 195–203.
37. Moreno-Delgado D, Torrent A, Gómez-Ramírez J, et al. Constitutive activity of H3 autoreceptors modulates histamine synthesis in rat brain through the cAMP/PKA pathway. *Neuropharmacology.* 2006; 51 (3): 517–23.
38. Moreno-Delgado D, Gómez-Ramírez J, Torrent-Moreno A, et al. Different role of cAMP dependent protein kinase and CaMKII in H3 receptor regulation of histamine synthesis and release. *Neuroscience.* 2009; 164 (3): 1244–51.
39. Rittenhouse AR, Zigmond RE. Role of N- and L-type calcium channels in depolarization-induced activation of tyrosine hydroxylase and release of norepinephrine by sympathetic cell bodies and nerve terminals. *J Neurobiol.* 1999; 40 (2): 137–48.
40. Seyedi N, Mackins CJ, Machida T, et al. Histamine H3-receptor-induced attenuation of norepinephrine exocytosis: a decreased protein kinase A activity mediates a reduction in intracellular calcium. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 312 (1): 272–80.
41. Thomas GM, Hagan RL. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5 (3): 173–83.
42. Sun W, Qureshi HY, Cafferty PW, et al. Glycogen synthase kinase-3beta is complexed with tau protein in brain microtubules. *J Biol Chem.* 2002; 277 (14): 11933–40.
43. Karlstedt K, Ahman MJ, Anichtchik OV, et al. Expression of the H3 receptor in the developing CNS and brown fat suggests novel roles for histamine. *Mol Cell Neurosci.* 2003; 24 (3): 614–22.
44. Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci.* 2004; 29 (5): 233–42.
45. Rickle A, Bogdanovic N, Volkman I, et al. Akt activity in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Neuroreport.* 2004; 15 (6): 955–9.
46. Emamian ES, Hall D, Birnbaum MJ, et al. Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia. *Nat Genet.* 2004; 36 (2): 131–7.
47. Faroouqui AA, Horrocks LA. Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad, and the ugly. *Neuroscientist.* 2006; 12 (3): 245–60.
48. Arrang JM, Morisset S, Gbahou F. Constitutive activity of the histamine H3 receptor. *Trends Pharmacol Sci.* 2007; 28 (7): 350–7.
49. Morisset S, Rouleau A, Ligneau X, et al. High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature.* 2000; 408 (6814): 860–4.
50. Wieland K, Bongers G, Yamamoto Y, et al. Constitutive activity of histamine h(3) receptors stably expressed in SK-N-MC cells: display of agonism and inverse agonism by H(3) antagonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 299 (3): 908–14.
51. Rouleau A, Ligneau X, Tardivel-Lacombe J, et al. Histamine H3-receptor-mediated [35S]GTP gamma[S] binding: evidence for constitutive activity of the recombinant and native rat and human H3 receptors. *Br J Pharmacol.* 2002; 135 (2): 383–92.
52. Takahashi K, Tokita S, Kotani H. Generation and characterization of highly constitutive active histamine H3 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 307 (1): 213–8.
53. Araque A, Carmignoto G, Haydon PG. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol.* 2001; 63: 795–813.
54. Fellin T, Carmignoto G. Neuron to astrocyte signaling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J Physiol.* 2004; 559 (Pt 1): 3–15.
55. Elmariah SB, Hughes EG, Joo Oh, et al. Neurotrophin signaling among neurons and glia during formation of tripartite synapses. *Neuron Glia Biol.* 2005; 10: 1–11.
56. Hösl L, Hösl E, Schneider U, et al. Evidence for the existence of histamine H1- and H2-receptors on astrocytes of cultured rat central nervous system. *Neurosci Lett.* 1984; 48 (3): 287–91.
57. Čarman-Kržan M, Lipnik-Štangelj M. Molecular properties of central and peripheral histamine H1 and H2 receptors. *Pflugers Arch.* 2000; 439 (3 Suppl): R131–2.

58. Lipnik-Štangelj M, Čarman-Kržan M. Activation of histamine H1-receptor enhances neurotrophic factor secretion from cultured astrocytes. *Inflamm Res*. 2004; 53 (6): 245–52.
59. Rafałowska U, Waśkiewicz J, Albrecht J. Is neurotransmitter histamine predominantly inactivated in astrocytes? *Neurosci Lett*. 1987; 80 (1): 106–10.
60. Osredkar D, Burnik-Papler T, Pečavar B, et al. Kinetic and pharmacological properties of [(3)H]-histamine transport into cultured type 1 astrocytes from neonatal rats. *Inflamm Res*. 2009; 58 (2): 94–102.
61. Rodríguez J, Moran J, Blanco I, et al. Effect of histamine on the development of astroglial cells in culture. *Neurochem Res*. 1989; 14 (7): 693–700.
62. Arbonés L, Pícastoste F, García A. Histamine stimulates glycogen breakdown and increases  $45\text{Ca}^{2+}$  permeability in rat astrocytes in primary culture. *Mol Pharmacol*. 1990; 37 (6): 921–7.
63. Jung S, Pfeiffer F, Deitmer JW. Histamine-induced calcium entry in rat cerebellar astrocytes: evidence for capacitative and non-capacitative mechanisms. *J Physiol*. 2000; 527 (Pt 3): 549–61.
64. Barajas M, Andrade A, Hernandez-Hernandez O, et al. Histamine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  entry in human astrocytoma U373 MG cells: evidence for involvement of store-operated channels. *J Neurosci Res*. 2008; 86 (15): 3456–68.
65. Shelton MK, McCarthy KD. Hippocampal astrocytes exhibit  $\text{Ca}^{2+}$ -elevating muscarinic cholinergic and histaminergic receptors in situ. *J Neurochem*. 2000; 74 (2): 555–63.
66. Cadman ED, Witte DG, Lee CM. Regulation of the release of interleukin-6 from human astrocytoma cells. *J Neurochem*. 1994; 63 (3): 980–7.
67. Miklič Š, Jurič DM, Čarman-Kržan M. Differences in the regulation of BDNF and NGF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes. *Int J Dev Neurosci*. 2004; 22 (3): 119–30.
68. Lipnik-Štangelj M. Multiple role of histamine H1-receptor-PKC-MAPK signalling pathway in histamine-stimulated nerve growth factor synthesis and secretion. *Biochem Pharmacol*. 2006; 72 (11): 1375–81.
69. Jurič DM, Mele T, Čarman-Kržan M. Involvement of histaminergic receptor mechanisms in the stimulation of NT-3 synthesis in astrocytes. *Neuropharmacology*. 2011; 60 (7–8): 1309–17.
70. Leurs R, Vollinga RC, Timmerman H. The medicinal chemistry and therapeutic potentials of ligands of the histamine H3 receptor. *Prog Drug Res*. 1995; 45: 107–65.
71. Arrang JM, Garbarg M, Lancelot JC, et al. Highly potent and selective ligands for histamine H3-receptors. *Nature*. 1987; 327 (6118): 117–23.
72. Krause M, Rouleau A, Stark H, et al. Synthesis, X-ray crystallography, and pharmacokinetics of novel azomethine prodrugs of (R)-alpha-methylhistamine: highly potent and selective histamine H3 receptor agonists. *J Med Chem*. 1995; 38 (20): 4070–9.
73. Rouleau A, Garbarg M, Ligneau X, et al. Bioavailability, antinociceptive and antiinflammatory properties of BP 2–94, a histamine H3 receptor agonist prodrug. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997; 281 (3): 1085–94.
74. Garbarg M, Arrang JM, Rouleau A, et al. S-[2-(4-imidazolyl)ethyl]isothiourea, a highly specific and potent histamine H3 receptor agonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992; 263 (1): 304–10.
75. Hey JA, Aslanian R, Bolser DC, et al. Studies on the pharmacology of the novel histamine H3 receptor agonist Sch 50971. *Arzneimittelforschung*. 1998; 48 (9): 881–8.
76. Jansen FP, Mochizuki T, Yamamoto Y, et al. In vivo modulation of rat hypothalamic histamine release by the histamine H3 receptor ligands, imnepip and clobenpropit. Effects of intrahypothalamic and peripheral application. *Eur J Pharmacol*. 1998; 362 (2–3): 149–55.
77. Kitbunnadaj R, Zuiderveld OP, Christophe B, et al. Identification of 4-(1H-imidazol-4(5)-ylmethyl)pyridine (immetridine) as a novel, potent, and highly selective histamine H(3) receptor agonist. *J Med Chem*. 2004; 47 (10): 2414–7.
78. Kitbunnadaj R, Hashimoto T, Poli E, et al. N-substituted piperidinyl alkyl imidazoles: discovery of methimepip as a potent and selective histamine H3 receptor agonist. *J Med Chem*. 2005; 48 (6): 2100–7.
79. Stephanos JJ. Drug-protein interactions: two-site binding of heterocyclic ligands to a monomeric hemoglobin. *J Inorg Biochem*. 1996; 62 (3): 155–69.
80. Ganellin CR, Leurquin F, Piripitsi A, et al. Synthesis of potent non-imidazole histamine H3-receptor antagonists. *Arch Pharm (Weinheim)*. 1998; 331 (12): 395–404.
81. Meier G, Apelt J, Reichert U, et al. Influence of imidazole replacement in different structural classes of histamine H(3)-receptor antagonists. *Eur J Pharm Sci*. 2001; 13 (3): 249–59.
82. Sander K, Kottke T, Stark H. Histamine H3 receptor antagonists go to clinics. *Biol Pharm Bull*. 2008; 31 (12): 2163–81.
83. Esbenschade TA, Browman KE, Bitner RS, et al. The histamine H3 receptor: an attractive target for the treatment of cognitive disorders. *Br J Pharmacol*. 2008; 154 (6): 1166–81.
84. Passani MB, Blandina P. Histamine receptors in the CNS as targets for therapeutic intervention. *Trends Pharmacol Sci*. 2011; 32 (4): 242–9.
85. Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC, eds. *Molecular Neuropharmacology. A foundation for Clinical Neuroscience*. 2nd ed. McGraw-Hill: New York; 2008.

86. Brioni JD, Esbenshade TA, Garrison TR, et al. Discovery of histamine H3 antagonists for the treatment of cognitive disorders and Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 336 (1): 38–46.
87. Wrenn CC, Kinney JW, Marriott LK, et al. Learning and memory performance in mice lacking the GAL-R1 subtype of galanin receptor. *Eur J Neurosci.* 2004; 19 (5): 1384–96.
88. Toyota H, Dugovic C, Koehl M, et al. Behavioral characterization of mice lacking histamine H(3) receptors. *Mol Pharmacol.* 2002; 62 (2): 389–97.
89. Goldman-Rakic PS, Castner SA, Svensson TH, et al. Targeting the dopamine D1 receptor in schizophrenia: insights for cognitive dysfunction. *Psychopharmacology (Berl).* 2004; 174 (1): 3–16.
90. Southam E, Cilia J, Gartlon JE, et al. Preclinical investigations into the antipsychotic potential of the novel histamine H3 receptor antagonist GSK207040. *Psychopharmacology (Berl).* 2009; 201 (4): 483–94.
91. Ligneau X, Perrin D, Landais L, et al. BF2.649 [1-{3-[3-(4Chlorophenyl)propoxy]propyl} piperidine, hydrochloride], a nonimidazole inverse agonist/antagonist at the human histamine H3 receptor: Preclinical pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 320 (1): 365–75.
92. Schwartz JC. The histamine H3 receptor: from discovery to clinical trials with pitolisant. *Br J Pharmacol.* 2011; 163 (4): 713–21.
93. Bonaventure P, Letavic M, Dugovic C, et al. Histamine H3 receptor antagonists: from target identification to drug leads. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73 (8): 1084–96.
94. Lin JS, Sergeeva OA, Haas HL. Histamine H3 receptors and sleep-wake regulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 336 (1): 17–23.
95. Schwartz JC. Histaminergic mechanisms in brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1977; 17: 325–39.
96. Monti JM, Jantos H, Boussard M, et al. Effects of selective activation or blockade of the histamine H3 receptor on sleep and wakefulness. *Eur J Pharmacol.* 1991; 205 (3): 283–7.
97. Ligneau X, Lin J, Vanni-Mercier G, et al. Neurochemical and behavioral effects of ciproxifan, a potent histamine H3-receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 287 (2): 658–66.
98. Le S, Gruner JA, Mathiasen JR, et al. Correlation between ex vivo receptor occupancy and wake-promoting activity of selective H3 receptor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 325 (3): 902–9.
99. Parmentier R, Anaclet C, Guhenec C, et al. The brain H3-receptor as a novel therapeutic target for vigilance and sleep-wake disorders. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73 (8): 1157–71.
100. Passani MB, Blandina P, Torrealba F. The histamine H3 receptor and eating behavior. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 336 (1): 24–9.
101. Itoh Y, Oishi R, Saeki K. Feeding-induced increase in the extracellular concentration of histamine in rat hypothalamus as measured by in vivo microdialysis. *Neurosci Lett.* 1991; 125 (2): 235–7.
102. Mercer LP, Kelley DS, Humphries LL, et al. Manipulation of central nervous system histamine or histaminergic receptors (H1) affects food intake in rats. *J Nutr.* 1994; 124 (7): 1029–36.
103. Ookuma K, Sakata T, Fukagawa K, et al. Neuronal histamine in the hypothalamus suppresses food intake in rats. *Brain Res.* 1993; 628 (1-2): 235–42.
104. Masaki T, Yoshimatsu H, Chiba S, et al. Central infusion of histamine reduces fat accumulation and upregulates UCP family in leptin-resistant obese mice. *Diabetes.* 2001; 50 (2): 376–84.
105. Kim SF, Huang AS, Snowman AM, et al. From the cover: antipsychotic drug-induced weight gain mediated by histamine H1 receptor-linked activation of hypothalamic AMP-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104 (9): 3456–9.
106. Ishizuka T, Hatano K, Murotani T, et al. Comparison of the effect of an H(3)-inverse agonist on energy intake and hypothalamic histamine release in normal mice and leptin resistant mice with high fat diet-induced obesity. *Behav Brain Res.* 2008; 188 (2): 250–4.
107. Yoshimoto R, Miyamoto Y, Shimamura K, et al. Therapeutic potential of histamine H3 receptor agonist for the treatment of obesity and diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103 (37): 13866–71.
108. Hough LB, Rice FL. H3 receptors and pain modulation: peripheral, spinal, and brain interactions. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 336 (1): 30–7.
109. Farzin D, Nosrati F. Modification of formalin-induced nociception by different histamine receptor agonists and antagonists. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2007; 17 (2): 122–8.
110. Huang L, Adachi N, Nagaro T, et al. Histaminergic involvement in neuropathic pain produced by partial ligation of the sciatic nerve in rats. *Reg Anesth Pain Med.* 2007; 32 (2): 124–9.
111. Medhurst AD, Briggs MA, Bruton G, et al. Structurally novel histamine H3 receptor antagonists GSK207040 and GSK334429 improve scopolamine-induced memory impairment and capsaicin-induced secondary allodynia in rats. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73 (8): 1182–94.