



**DIE TEENWOORDIGHEID VAN HISTAMIEN H₃-RESEPTORE
OP LIMFOSIETE EN NEUTROFIELE**

deur

SM LE ROUX

Voorgelê ter vervulling van 'n deel van die vereistes vir die graad

Magister Scientiae in Farmakologie

in die

Departement Farmakologie,

Fakulteit Geneeskunde,

Universiteit van Pretoria

Promotor: Prof JR Snyman

2000

**Aan my ouers, en my eggenoot Polla
Dankie vir u liefde en ondersteuning**

**Aan my Hemelse Vader waarsonder dit onmoontlik sou wees.
Dankie vir genade op genade.**

BEDANKINGS

Ek wil my opregte dank en waardering teenoor die volgende persone betuig:

My promotor, Prof. Jacques Snyman vir sy eindelose geduld, leiding en aanmoediging.

Die personeel van Departement Farmakologie vir hul aanmoediging en behulpsaamheid.

Die personeel van Departement Hematologie vir die gebruik van hul apparaat en hul behulpsaamheid.

Die biblioteekpersoneel vir hul hulp met die versameling van literatuur.

INHOUDSOPGAWE

HOOFSTUK 1

AGTERGRONDSTUDIE: HISTAMIENRESEPTORE EN IMMUUNMODULERING

1.1	Inleiding	1
1.2	Verskillende histamienreseptore	1
1.3	Werkingsmeganismes en effekte van histamienreseptore	2
1.3.1	Histamien H ₁ -reseptor	2
1.3.2	Histamien H ₂ -reseptor	3
1.3.3	Histamien H ₃ -reseptor	3
1.3.3.1	Werkingsmeganisme	3
1.3.3.2	Die voorkoms van die H ₃ -reseptor in die liggaam	4
1.3.3.3	Die rol van die H ₃ -reseptor by immuunmodulering	8
1.4	Histamien en immuunmodulering	9
1.4.1	Limfosiete en histamien	9
1.4.2	Eosinofiele en histamien	15
1.4.3	Neutrofiele en histamien	17
1.4.4	Basofiele en histamien	17
1.4.5	Mastselle en histamien	20
1.4.6	Monosiete, makrofage en histamien	21
1.5	Studie motivering	22

HOOFSTUK 2

MEDIA EN REAGENSE

2.1	Media	23
2.2	Reagense en hul eienskappe	28

HOOFSTUK 3

BEPALING VAN RESEPTOREFFEKTE DEUR MIDDEL VAN EVALUERING VAN SELPROLIFERASIE EN OORLEWING, DEUR GEBRUIK TE MAAK VAN DIE MTT-METODE

3.1	Inleiding	31
3.2	Metode	31
3.3	Resultate	35
3.4	Bespreking	41

HOOFSTUK 4

BEPALING VAN MONONUKLEÊRE LEUKOSIETTRANSFORMASIES DEUR MIDDEL VAN RADIO-AKTIEWE TIMIDIEN.

4.1	Inleiding	43
4.2	Metode	43
4.3	Resultate	44
4.4	Bespreking	48

HOOFSTUK 5

BEPALING VAN SUURSTOF VRYRADIKALE DEUR MIDDEL VAN LUMINOL

5.1	Inleiding	49
5.2	Mononukleêre leukosiete	51
5.2.1	Metode	51
5.2.2	Resultate	52
5.2.3	Bespreking	58
5.3	Polimorfonukleêre leukosiete	59

5.3.1	Metode	59
5.3.2	Resultate	61
5.3.3	Bespreking	68
HOOFSTUK 6		
	GEVOLGTREKKING	70
HOOFSTUK 7		
	BIBLIOGRAFIE	73

Afkortings

5-HT	5-hidroksietrpitamien
DMSO	Dimetielsulfoksied
EDTA	Etileen-diamien-tetra-asynsuur,
FBS	Fosfaatgebufferde soutoplossing
FHA	Fitohemagglutinien
fMLP	N-formiel-methioniel-leusiel-feniellalanien
FTA	Hemagglutinasie buffer
Ha	Histamien
HISSE	Histamien geïnduseerde oplosbare onderdrukkerfaktor
HRF	Histamienvrystellingsfaktor
HSF	Histamien geïnduseerde onderdrukkerfaktor
IL	Interleukien
LTC ₄	Leukotrien C ₄
LuCl	Luminol-afhanklike-chemiluminessensie
Luminol	5-amino-2,3-dihidro-1,4,- phthalazinedioon
Mh	R- α -metielhistamien
MHC	Hoofweefselaanvaarbaarheidskompleks
MIF	Migrasie-inhiberende faktor
MN	Mononukleêre
MTT	3-[4,5-dimetieltiasol-2-iel]-2,5-difenieltetrasoliumbromied
NO	Endoteel afkomstige ontspanningsfaktor
Opm	Omwentelinge per minuut
PMN	Polimorfonukleêre
R.l.e.	Relatiewe ligenhede
Sa	Standaardafwyking
Set	Setirisien
Sim	Simetidien



SIRS	Oplosbare immuunrespons-onderdrukker
Tc	Sitolitiese limfosiet
Th	Limfosiethelper
Tio	Tioperamied
Ts	Onderdrukker limfosiet

HOOFTUK 1

AGTERGRONDSTUDIE: HISTAMIENRESEPTORE EN IMMUUNMODULERING

1.1 Inleiding

Histamien is aan die begin van die eeu vir die eerste keer geïsoleer. Beavan (1) het gevind dat histamien geassosieer word met mastselle, in omtrent alle weefsel, as 'n bemiddelaar van inflammatoriese reaksies. Later, is histamien ook ontdek in onder andere basofiele (2), bloedplaatjies (3), enterochromaffienagtige selle (4) en endoteelselle (5).

Kahlson *et al* (6) vind dat nuut gesintetiseerde histamien betrokke is by selproliferasie, waarskynlik via 'n intrasellulêre aksie. Die verhoogde aktiwiteit van die ensiem, histidiendekarboksilase, wat die vorming van histamien vanaf histidien kataliseer, is ook gerapporteer in weefsel wat vinnige selverdeling of groei ondergaan (7). Dit sluit o.a rotfetale weefsel, weefsel wat betrokke is by wondheling, asook sekere tumore in (8, 9). Bartholeyns (10) ondersteun hierdie hipotese met sy observasies dat 'n histidiendekarboksilase inhibeerder, tumor groei inhibeer.

1.2 Verskillende histamienreseptore

Reseptore vir histamien is oorspronklik deur Ash en Schild (11) onderverdeel. Die H₁-reseptor is toe beskryf as die klas histamienreseptor wat sensitief is vir inhibering deur antihistamiene soos prometasiene en mepiramien. Omdat slegs sekere effekte van histamien, byvoorbeeld die sametrekking van die viserale gladde spier, insluitend die trachea, die uterus en die ileum, teengegaan kon word, met hierdie reagentie, het die hipotese ontstaan dat histamien ten minste twee verskillende reseptor subtypes het (11).

Die histamienreseptor wat nie geblok kon word deur H₁-reseptorantagoniste soos mepiramien nie, en wat verantwoordelik is vir die stimulasie van suursekresie deur die gastriese mukosa en die positief chronotrope effek op die regter atrium, is die H₂-reseptor genoem (12, 11).

Arrang *et al* (13) het vir die eerste keer in 1983 'n derde klas histamienreseptor, naamlik die H₃-reseptor, beskryf. Hy het gevind dat histamien sy eie vrystelling in die rotserebrale korteks inhibeer, deur die aktivering van 'n histamienreseptor wat verskil van die H₁ en H₂-reseptore. Die H₃-reseptor is beskryf as 'n presinaptiese, outoreseptor op histaminerge senuwee-eindpunte, wat histamiensintese vanaf histidien, sowel as die histamienvrystelling in die brein, beheer.

Later is die H₃-reseptor ook beskryf as 'n heteroreseptor, toe Schlicker *et al* (14) bewys het dat histamien deur middel van die H₃-reseptor, ook die vrystelling van ander neurotransmittore beide in die sentrale senuweesisteem en die perifere senuweestelsels, inhibeer.

1.3 Werkingsmeganismes en effekte van histamienreseptore:

1.3.1 Histamien H₁-reseptor

Die histamien H₁-reseptor, word gekoppel aan guanilaatsiklase (15) en inositolfosfolipied-hidrolise. Soos reeds genoem, veroorsaak H₁-reseptorstimulasie onder andere gladdespier sametrekking in die lugweë (16), 'n toename in vaskulêre deurlaatbaarheid, hormoonvrystelling en serebrale glikogenolise. Bogenoemde effekte word bemiddel deur intrasellulêre Ca⁺⁺ mobilisering en Ca⁺⁺ influks (17). Die H₁-reseptor bemiddel ook die endoteel afhanklike dilaterende effek wat histamien op bloedvate het (18). In die geval van submukosale bloedvate, word vasodilatasie bemiddel deur die vrystelling van nitraatoksied vanuit die endoteel (19).

1.3.2 Histamien H₂-reseptor

Die histamien H₂-reseptor, word gekoppel aan adenielsiklase via 'n G_s – proteïen (20) en die vorming van intrasellulêre sikliese AMP. H₂-reseptorstimulasie veroorsaak onder andere gastriese suursekresie (21), gladdespier verslapping in die lugweë (22, 16), 'n inhibisie van limfosietfunksies deur die stimulasie van T onderdrukker selle (23, 24) en het 'n positief inotropiese en chronotropiese effek op die hartspier (17).

1.3.3 Histamien H₃-reseptor

1.3.3.1 Werkingsmeganisme

Aanvanklik was daar 'n aantal moontlikhede vir die effektorsisteem, wat gekoppel is aan die H₃-reseptor. Hierdie moontlikhede het die inhibisie van adenielsiklase aktiwiteit, die aktivering van kaliumkanale en die inhibisie van die stroom-afhanklike kalsiumkanale ingesluit (25). Studies wat op die hippokampus gedoen is, het getoon dat H₃-reseptore nie negatief gekoppel is aan adenielsiklase nie en dit skakel dus die eerste moontlikheid uit (26).

Later is bewys dat die binding van agoniste aan die H₃-reseptor deur guanienukleotiede beheer word, wat 'n G proteïenverbinding impliseer (27, 28, 29). Schwartz *et al* (30) bevestig dat die H₃-reseptor wel gekoppel is aan die effektorsisteem via 'n G proteïen (31, 32, 33) waarskynlik van die G_i- (34) of G_o- (35) subklas.

Schlicker (33) bewys dat die H₃-reseptor negatief gekoppel is aan fosfolipase C (36) en dat die aktivering van die H₃-reseptor veroorsaak dat inositolfosfaatvorming geïnhibeer word (33).

Arrang (37) vind in 1985 dat die H₃-reseptor die influks van die kalsiumione deur die N-tipe kanaal, in die histamien bevattende senuwee-eindpunte, wat

noodsaaklik is vir histamienvrystelling, blokkeer (29). Die mate van outoïnhibisie wat deur die H₃-reseptor uitgeoefen word, kan dus gemoduleer word deur die ekstrasellulêre Ca⁺⁺ konsentrasie te verander en die H₃-reseptor reguleer dus die histamienvrystelling deur middel van 'n kontrole oor Ca⁺⁺ invloed (37, 38). Die Ca⁺⁺ afhanklike vrystelling van histamien, word vergesel van 'n toename in die sintese van histamien, vanaf histidien via die aksie van die ensiem L-histidiendekarboksilase (13, 39, 40). Dit wil dus voorkom asof Ca⁺⁺ wel die 2de boodskapper is by sowel die vrystelling, as die sintese van histamien (41, 30).

Die inhibisie van histamiensintese in die brein deur R-(α)-metielhistamien (H₃-reseptoragonis) kan omgekeer word deur tioperamied (H₃-reseptorantagonis). Wanneer tioperamied egter alleen toegedien word, is daar 'n toename in die sintese van histamien. Bogenoemde dui daarop dat die H₃-reseptor in die brein normaalweg tonies geïnhibeer word (42). Hierdie toniese inhibisie is ook *in vivo* in die longe sowel as in die abdominale vel (7) bewys. Verdere studies gedoen deur Van der Werf (40) op die rotkorteks, bewys ook dat daar 'n reseptorreserwe vir die H₃-reseptor bestaan.

1.3.3.2 Die voorkoms van die H₃-reseptor in die liggaam

Die H₃-reseptor is nie beperk tot die presinaptiese senuwee-eindpunte nie. Die H₃-reseptor is ook al onder andere geïdentifiseer in die longe, abdominale vel en milt, waar dit geassosieer word met mastselle (42), in die cholinerge senuwee-eindes van die ileumselle (43), in die gladdespier van die trachea (44), in die outonome senuwee-eindes van die vaskulêre gladdespier (45), in die striatum, substantia-nigra, neokorteks, diênkefalon, mediale septum, dorsale hippokampus, dorsolaterale tegmentum en die nukleus van die solitêre baan in die brein waar dit geassosieer word met histaminerge senuwees (46). So is die H₃-reseptor ook al geïdentifiseer in die gastriese

mukosa (47), die simpatiese senuwee op die spier wat dilatasie van die iris teweeg bring (48), die simpatiese senuwees van die menslike safeneusvene (49) en die gladdespier membraan van die safeneusarterie (50). Bo en behalwe hierdie effekte is die H₃-reseptor ook betrokke by die patologie van hoofpyn en kardiëse isgemie (51).

Die H₃-reseptor beheer ook die vrystelling van ander neurotransmittore in die brein byvoorbeeld dopamien (52), noradrenalin (53, 54, 55), 5-hidroksitriptamien (5-HT) (14, 52, 33, 30) en asetiëcholien (56). Arrang (57) vind dat die H₃-reseptor wat die asetiëcholiëvrystelling in die entorhinale korteks moduleer, nie presinapties op die cholinergiese senuwee-eindpunte geleë is nie.

Die vrystelling van verskillende hormone, byvoorbeeld prolaktien (58) en adenokortikotrofiëse hormoon vanaf die hipofise (59), word ook deur die H₃-reseptor gemoduleer. Die histamien omset in die hipotalamus verhoog in reaksie tot hipoglukemie. Aan die ander kant word die werking van prolaktien, adenokortikotrofiëse hormoon en α -endorfië op stress of insulien geïnduseerde hipoglukemie geïnhibeer, deur die blokkade van histamiënsintese, en dus deur die stimulasie van die H₃-reseptor (60).

Die histamien geïnduseerde potensieëring van die postganglioniese saamgestelde aksiepotensiaal, is waarskynlik toe te skryf aan die aktivering van die H₁-reseptor, terwyl die onderdrukking daarvan as gevolg van H₃-reseptor aktivering is (61).

Christiaan (61) kom tot die gevolgtrekking dat die endogene histamiëvrystelling gedurende 'n immunologiese reaksie as gevolg van

antigeen teenwoordigheid, die H₁- en H₃-reseptore aktiveer, en so die sinaptiese uitset in die simpatiese ganglia moduleer.

Die presinaptiese H₃-reseptor inhibeer ook die vrystelling van substans P. Hierdie inhibisie van substans P-vrystelling vanaf sensoriese senuwee-eindpunte deur die presinaptiese H₃-reseptor, word verkry deur die aktivering van die ATP sensitiewe K⁺ kanaal, wat gekoppel is aan die histamien H₃-reseptor (62).

Die H₃-reseptor is verantwoordelik vir vasodilatasie in onder andere die mesenteriese arteries (45), middelserebrale arterie (63), sowel as in die submukosale arteries (19), deurdat die H₃-reseptor in die perivaskulêre senuwees, die vrystelling van simpatiese neurotransmittore inhibeer (45, 19). Die H₃-reseptor bemiddelde dilatasie van die serebrale arterie, sluit ook die vrystelling van prostasiklien en endoteel afkomstige ontspanningsfaktor (NO) in. Die vrystellingseffekte van hierdie twee endogene verbindings lyk asof dit sinergisties is (64). Die vrystelling van arginienvasopressien word ook deur histamien gestimuleer en omdat die H₃-reseptor histamienvrystelling moduleer, is die H₃-reseptor dus ook by die arginienvasopressienvrystelling in die hipotalamus betrokke (65).

Afgesien van die verlaging in die bloeddruk en die totale perifere weerstand deur die presinaptiese aktivering van die H₃-reseptor wat noradrenalienvrystelling vanaf simpatiese effektorsenuwees op weerstandsvate inhibeer en sodoende adrenergiese aksies moduleer (66, 67, 68), het die stimulasie van die H₃-reseptor ook 'n negatiewe inotropiese en chronotropiese effek op die geïsoleerde atria. Die blokkade van die H₃-reseptor word dus geassosieer met 'n hoër harttempo en 'n hoër slagvolume (69). Hierdie negatiewe inotropiese en chronotropiese effek van die H₃-

reseptor word ook geassosieer met 'n merkbare afname in die endogene noradrenaliën vrystelling. Hierdie bevindinge toon dat die presinaptiese histamien H₃-reseptor, die depolarisasie afhanklike noradrenaliënvystelling vanaf simpatiese senuwee-eindpunte in die miokardium moduleer (29, 55). Ook hier is die H₃-reseptor waarskynlik gekoppel aan 'n G_i-of G_o-proteïen en veroorsaak die stimulasie van die H₃-reseptor 'n afname in die Ca⁺⁺ stroom. Die H₃-reseptor speel dus 'n modulatoriese rol in die kardiëse adrenergiese funksie (29), asook by hipertensie (70).

Die stimulasie van die H₃-reseptor op die gladdespier van die trachea, het 'n dilaterende effek op die trachea (44), terwyl die H₁-reseptor verantwoordelik is vir die konstriksie van die trachea (71). Op die postganglioniese senuwee-eindpunte van die vagale eksitatoriese efferente senuwees, word die cholinerge neurotransmissie in die long ook gemoduleer deur die H₃-reseptor. Wanneer die H₃-reseptor hier gestimuleer word, word die vagus bemiddelde konstriksie van die geïsoleerde lugweë geïnhibeer, omdat die H₃-reseptor die asetielcholiënvystelling in die vagale baan inhibeer. Die H₃-reseptor speel dus 'n rol in die modulering van neurale brongokonstriksie in die allergiese siekte wanneer histamien vrygestel word in die lugwegmastselle in die omgewing van die lugwegganglia en cholinerge senuwees (72). Die vrystelling van neurotransmittore word ook in die nie-adrenergiese nie-cholinergiese senuwee-eindpunte van die lugweë (73) geïnhibeer, tydens die stimulasie van die H₃-reseptor, waarskynlik deur die produksie van salpetersuur (74). Die H₃-reseptor is ook betrokke by die epiteel-afhanklike dilatasie deur die vrystelling van betrokke metaboliëte van argidoonsuur in die bronchiole (75) asook by die antigeen geïnduseerde lekkasie in die lugweë, deurdat die H₃-reseptor die simpatiese senuwees inhibeer (76).

Die H₃-reseptor is verantwoordelik vir die presinaptiese inhibisie van asetielcholienvrystelling in die distale kolon (77) asook in die res van die spysverteringskanaal (78). Die noradrenergiese neurotransmissie in die spysverteringskanaal word ook deur die H₃-reseptor gemoduleer (79). Elektriesgestimuleerde ileumkontraksies (43) sowel as gestimuleerde gastriese suursekresie (80, 81, 82) word ook deur die H₃-reseptorstimulasie geïnhibeer, aangesien die aktiwiteit van die parasimpatiese senusistiem deur die H₃-reseptor gereguleer word (83, 84, 72). Soldani (82) bewys dat die H₃-reseptor nie net 'n inhibitiese rol speel nie maar 'n toniese inhibitiese rol vervul in die regulering van die basale suursekresie. In die ileum moduleer die H₃-reseptor die vrystelling van nie-adrenergiese, nie-cholinergiese neurotransmittore, waarvan een substans P is (85). Ook die vrystelling van 5-HT in die enterochromaffienselle van die varkdunderm word deur die H₃-reseptor geïnhibeer (86).

Arrang (57) kom tot die gevolgtreking dat daar ook H₃-reseptorsubtypes is. West (87) gaan verder en onderskei tussen die H_{3A} en H_{3B} histamienreseptore. Schlicker (53) bewys op sy beurt dat noradrenalienvrystelling deur die H_{3A}-reseptor eerder as die H_{3B}-reseptor beheer word.

1.3.3.3 Die rol van die H₃-reseptor by immuunmodulering

Snyman, (88) toon aan dat die H₃-reseptore 'n rol in die kutane hipersensitiwiteitsreaksies speel. Die blokkering van die H₃-reseptore in hierdie studies, het 'n toename in eosinofiel- en neutrofielvakuolisering en aktiwiteit tot gevolg gehad. Dit was egter slegs omstandigheidsgetuieis vir die betrokkenheid van die H₃-reseptorsistiem by immuunregulasie en dui nie op die teenwoordigheid van die reseptor op enige spesifieke sel nie.

1.4 Histamien en immuunmodulering

Histamien het beide anti- en pro-inflammatoriese aktiwiteite en moduleer die aktiwiteit van immuunkompetente selle deur middel van selmembraanreseptore (89). Die pro-inflammatoriese aktiwiteite behels onder andere 'n verhoogde vaskulêre deurlaatbaarheid vir faktore wat 'n rol speel in inflammasie. Die reseptor wat hier 'n rol speel is hoofsaaklik die H₁-reseptor, maar H₂-reseptor betrokkenheid kan nie uitgesluit word nie (90).

Die anti-inflammatoriese aksies van histamien behels onder andere dat histamien deur middel van die H₂-reseptor, verantwoordelik is vir die inhibisie van 'n verskeidenheid van limfosietfunksies soos die proliferasie reaksie tot mitogene, antiliggamsintese en sitolise (31).

Wanneer die komplementsisteam geaktiveer word, word die komplementkomponente C3a en C5a gegenereer, wat nie net chemotakties is vir leukosiete nie, maar wat ook deur die vrystelling van lisosomale ensieme te stimuleer, inflammasie kan versterk. Hierdie komplementkomponente, C3a en C5a, stel ook histamien vry vanaf mastselle. Op sy beurt verminder histamien die inflammatoriese reaksie deur die stimulering van die H₂-reseptor op granuloseite wat dan weer die lisosomale ensiemvrystelling inhibeer. Histamien het dus of 'n versterkende, of 'n inhiberende effek op die inflammatoriese reaksie, afhangende van die stadium van inflammasie, watter selle geaffekteer word en of die H₁- of die H₂-reseptor gestimuleer word (91).

1.4.1 Limfosiete en histamien

Histamien is 'n reguleerder in beide humorale en selbemiddelde immuniteit. Dit beïnvloed 'n verskeidenheid limfosietfunksies, soos onder andere die limfosietreaksie op mitogeen en oorplantingsantigene (92), vertraagde hipersensitiwiteit (93), limfosiet-toksisiteit (94) natuurlike moordsel- en K-

selaktiwitiete (95), sitolitiese T-selontwikkeling en effektorfunksie (96), antiliggaamproduksie (97) en limfokiensekresie (98).

Die teenwoordigheid van beide die H₁-reseptor (99, 100) en die H₂-reseptor (101) is al op limfosiete bewys.

Alhoewel sommige outeurs 'n onderdrukkende effek van histamien op limfosietproliferasie gevind het (97, 102), het ander egter die teenoorgestelde, nl. 'n verhoogde proliferasie, gerapporteer. Hierdie gebrek aan eenstemmigheid is waarskynlik die resultaat van heterogene selpopulasies. Ten minste een van hierdie populasies het waarskynlik ander selle as T-selle, nl. B-selle en/of monosiete met histamienreseptore, bevat. Die heterogeniteit van histamiengeïnduseerde effekte *in vitro*, kan dus nie gebruik word om die *in vivo* effekte te voorspel nie (15).

Later het dit moontlik geraak om die perifere limfosiethelper- (Th), sitolitiese- (Tc) en die onderdrukker- (Ts) selle van mekaar te skei en kon navorsing op die verskillende limfosietfraksies gedoen word. Khan (103) bewys ook dat histamienreseptore nie lukraak op hierdie limfosietsubgroepe versprei is nie (103).

Dit is al bewys dat elkeen van hierdie subgroepe op histamien reageer, deurdat H₂-reseptor-stimulasie 'n akkumulاسie van intrasellulêre sAMP veroorsaak. Daar is gevind dat die Ts subgroepe betekenisvol meer reaktief is tot histamien (gemeet in die toename in sAMP) as Th- en moordselle (103).

Daar is ook 'n interafhanklikheid in die limfosietsubgroepe in hul reaksie tot geselekteerde middels (103). Die teenwoordigheid van menslike Ts-selle beïnvloed die reaksie van menslike moordselle en Th-selle op FHA- of

Concanavalin A-histamien stimulasie. Die meganisme hier betrokke in die modulering van die reseptorfunksie, was spesifiek vir histamien en nie vir ander outokoïed, soos β -adenergiese agoniste, nie (15). Later word dit gevind dat Ts-selle die uitdrukking van histamienreseptore op Th- en Tc-selle beheer. Histamien inhibeer op sy beurt die produksie (97) en vrystelling van limfokiene, terwyl limfokiene weer die vrystelling van histamien beïnvloed en beheer (23).

Die meganisme van die histamienbemiddelde onderdrukking van die immuunrespons, is dus die vrystelling van oplosbare faktore deur die Ts-selle. Die immuunonderdrukkende limfokiene wat gesekreter word na die aktivering van die H_2 -reseptor, sluit onder andere histamien geïnduseerde onderdrukkerfaktor (HSF) (97), oplosbare immuunrespons-onderdrukker (SIRS), histamien geïnduseerde oplosbare onderdrukkerfaktor (HISSF) (23) en migrasie inhibitiese faktor (MIF) (93), in. Die vrygestelde onderdrukkende limfokien, HSF, (97), verhoog die prostaglandiensintese by monosiete (104). Prostaglandien E₂, stimuleer dan die Ts-selle om onderdrukkende limfokienes voort te bring wat op die ou end verantwoordelik is vir die inhibering van limfosietproliferasie en ander funksies. Limfosiete stel ook histamienvrystellingsfaktor (HRF) vry, wat op mastselle inwerk (105) en histamienvrystelling veroorsaak.

Soos reeds genoem, word Tsel funksies soos mitogeen gestimuleerde limfosietproliferasie deur histamien geïnhibeer (97). Verdere indiepte studies toon dat histamienbehandelde Ts-selle beide FHA geïnduseerde T-selproliferasie en lakplantmitogeengeïnduseerde B-selproliferasie inhibeer (15). Die induksie van die onderdrukking word deur die H_2 -reseptor bemiddel (106, 107). Beaulieu (108) bevestig bogenoemde bevindinge, deurdat hy vind dat hoë konsentrasies van H_1 -reseptor agoniste, 2-metiel histamien en 2-

piridiel etielamien en H₂-reseptoragoniste, 4-metiel histamien en dimaprit (10⁻³ tot 10⁻⁴M) 'n onderdrukking van die immuunreaksies induseer, deur die induksie van Ts-selle, wat vergelykbaar is met die onderdrukking wat verkry is met histamien. By laer konsentrasies (10⁻⁶M) is die onderdrukking slegs waargeneem in die teenwoordigheid van H₂-reseptoragoniste. Hierdie onderdrukking kon ook omgekeer word met 'n H₂-reseptorantagonis, simetidien (108). Die vrystelling van histamien deur basofiele en eosinofiele kan dus die Ts-selle aktiveer om die immuunrespons te moduleer (106).

By die mens lyk dit dus asof die H₂-reseptor die regulerende histamienreseptor op Ts- en Tc-limfosiete is. Nie alleen veroorsaak H₂-reseptor-stimulasie dat Ts-selle ander selffunksies soos bv. Th-selproliferasie, *in vitro* en *in vivo* onderdruk nie (102), maar ook dat die normale litiese funksie van die Tc-selle (96, 97, 94), limfokienproduksie (97) sowel as antiliggaamsintese en sitolise (17, 94) onderdruk word. Snyman (109) kom tot die gevolgtrekking dat 'n verbetering in immuniteit veroorsaak word deur die H₂-reseptorblokkade en nie deur ander nie-histamienreseptor-bemiddelde effekte nie.

Daar bestaan egter 'n variasie tussen spesies. Muis natuurlike Ts-selle besit ook beide H₁- en H₂-reseptore (98) en die stimulasie van die H₂-reseptor verhoog ook die intrasellulêre sAMP-akkumulاسie. Dit is egter die stimulasie van die H₁-reseptor wat die onderdrukkende kapasiteit van die natuurlike Ts-selle verhoog, onafhanklik van enige veranderinge in die konsentrasie intrasellulêre sAMP. In die teenwoordigheid van H₁-reseptorantagoniste, het histamien intrasellulêre sAMP-akkumulاسie geïnduseer, maar dit het nie die onderdrukkende kapasiteit van die natuurlike Ts-selle beïnvloed nie (15).

Die stimulasie van menslike mononukleêre selle deur histamien of deur 'n H_1 -reseptoragonis, veroorsaak die regenerasie van superoksiedanione in makrofage, die aktivering van kontra-onderdrukkerselle en die inhibisie van spontane limfosietsitotoksiese aktiwiteit. Daar is 'n spesifieke H_1 -reseptor bindingsposisie op die Th-, Ts-, B-selle en makrofage. Die aktivering van die T-selle het tot gevolg dat daar 'n viervoudige toename is in die aantal van die H_1 -reseptore, en hiermee tesame 'n afname in die bindingsaffiniteit. Die teenwoordigheid van 'n enkele hoë affiniteit histamien H_1 -reseptor op Th-selle en Ts-selle, B-selle en monosiete word dus bewys (99).

T- limfosiete, anders as B limfosiete, herken antigene as dit geassosieer is met membraangebonde produkte van die hoofweefselaanvaarbaarheidskompleks (MHC). Hierdie tweeledige herkening nl: beide die antigeen en MHC, is belangrik vir die aktivering van beide moordeffektorselle en die immuunregulatoriese selle. Tydens stimulasie van limfosiete, deur antigene en die hoofweefselaanvaarbaarheidskompleksreseptor, bind die eksterne teken aan die reseptor wat die inligting deur 'n G-proteïen oordra (110), waarna fosfolipase C gestimuleer word. Fosfatidilinositol 4,5-difosfaat word gehidroliseer na 'n tweede stel boodskappers nl. inositol 1,4,5 trifosfaat en 1,2 diasielgliserol. Die inositoltrifosfaat is wateroplosbaar en diffundeer in die sitosol in en stel endogene Ca^{++} , uit die store in die endoplasmiese retikulum, vry. Dit dien ook as 'n 2de boodskapper om die transmembraan Ca^{++} kanaal te open. Die sitoplasmiese Ca^{++} konsentrasie neem dus toe. Die diasielgliserol bly in die plasmamembraan, waar dit proteïenkinase C aktiveer, te same met die nodige fosfolipiedkofaktor, fosfatidielserien (110, 111). Die toename in die vrye sitoplasmiese Ca^{++} konsentrasie is essensieël vir die induksie van die endogene IL-2 geen in Th-, Ts- en moordselle. Die moordselle liseer spesifieke teikenselle, insluitend tumorselle en selle wat

geïnfekteer is deur virusse. Immuunregulatoriese selle werk as induseerders en onderdrukkers van interaksies tussen T-selle, B-selle en makrofage (110).

Die aktivering en uitdrukking van die effektorfunksie van histamien-bemiddelde Ts-selle, behels ook komplekse interaksies tussen T limfosiete en makrofage en hul oplosbare produkte. Tydens 'n analise van hierdie interaksies is gevind dat interleukien (IL)-1, as 'n ko-faktor 'n vereiste is vir die aktivering van T-limfosiete met histamienreseptore, bo en behalwe as die bindingsmiddel (104). Die effek van histamien op IL-2-sekresie deur Th-selle is op sy beurt, óf inhibitories óf stimulatories, afhangend van die wyse waarop die inkubasie met die histamien gedoen is. Wanneer Th-selle met histamien gepreïnkubeer is, word die sekresie van IL-2 verhoog, maar as histamien bygevoeg word in die teenwoordigheid van antigene, word die IL-2-sekresie geïnhibeer (98). Die histamienbemiddelde IL-2-sekresie word net waargeneem by Th-selle wat op histamien reageer deur 'n toename in sAMP en dus Th-selle wat H₂-reseptore het. Die histamienbemiddelde afname van IL-2-sekresie, was nie as gevolg van die onderdrukking van selproliferasie nie (98).

Histamien bevattende selle kom in groot getalle naby die voorloperselle van die immuunsisteem, voor. CD8-selle wat voorloperselle is van Ts- en Tc-selle, het ook twee keer meer H₁-reseptore as die CD4-selle wat voorloperselle van Th-selle is (23). Histamien aktiveer die CD8-selle deur die H₂-reseptor. Ook hierdie reaksie was omkeerbaar met simetidien (H₂-reseptorantagonis), maar nie met mepiramien (H₁-reseptorantagoniste) nie. Die preïnkubasie van die voorloperselle met histamien vir 30 sekondes, was doeltreffend om 'n 5voudige verhoging in sAMP te gee (106, 15). Daar is ook gevind dat Ts voorloperselle nie nodig het om te prolifereer om

funksioneel te word nie (106, 15). Timosiete is egter onreaktief tot histamien (15) alhoewel histamien timosietmaturasie beïnvloed.

Voorloper B-selle het waarskynlik nie histamienreseptore nie, terwyl dié wat verbind is tot die produksie van antiliggame, reaktief word teenoor histamien (15).

B-selle word nie direk geïnhibeer deur histamien nie. Histamien toevoeging by mononukleêre selle wat gestimuleer is met lakplantmitogeen, veroorsaak 'n dosis afhanklike onderdrukking van IgG-sintese *in vitro* (97). Difenhidramien (H_1 -reseptorantagonis) alleen is in 'n groter mate in staat om IgG-produksie te onderdruk as histamien. Histamien en difenhidramien tesame het nie 'n additiewe effek getoon nie. Simetidien (H_2 -reseptorantagonis) het geen effek op die lakplantgeïnduseerde IgG-sintese gehad nie. Toe simetidien saam met histamien toegedien is, het dit nie die vlak van die histamiengeïnduseerde onderdrukking verander nie. Die H_1 - en H_2 -reseptoragoniste afsonderlik het die produksie van die IgG betekenisvol onderdruk. Hierdie resultate toon aan dat beide die H_1 - en H_2 -reseptore betrokke is by die aktivering van histamiengeïnduseerde Ts-selle wat betrokke is by die beheer van IgG-sintese. Hierdie resultate kontrasteer met ander studies wat op die effek van histamien op T-selfunksies gedoen is, waar daar bevind is dat die H_2 -reseptor meer dominant betrokke is (97).

1.4.2 Eosinofiele en histamien

Die toename in die getal eosinofiele, beide in die weefsel en die sirkulasiesisteem, is 'n kenmerk van siektes wat geassosieerd is met onmiddellike tipe hipersensitiwiteit. Sekere produkte van die anafilaktiese reaksie, byvoorbeeld eosinofiel chemotaktiese faktor van anafilakse,

histamien en imidasool-asynsuur, is *in vitro*, chemotakties vir eosinofiele (112).

By konsentrasies van $10^{-5}M$ en hoër, inhibeer histamien egter eosinofielchemotakse. Volgens Anderson (113) word dit bemiddel deur die H_2 -reseptor en geassosieer met 'n toename in die intrasellulêre vlak van sAMP (24). Clark (114) vind egter dat die chemotaktiese effek van histamien op eosinofiele slegs geblok kan word deur 'n kombinasie van H_1 en H_2 antagoniste maar nie deur een van hierdie antagoniste afsonderlik nie. Clark (114) stel dus voor dat 'n derde tipe histamienreseptor by bogenoemde betrokke is.

Behalwe eosinofielchemotakse, het histamien ook ander effekte op eosinofielfunksies soos die regulering van selmigrasie (23) en die verskyning van komplementreseptore (112). Histamienafhanklike verhoging van eosinofielmigrasie, word bemiddel deur die H_1 -reseptor (24).

Eosinofiele het reseptore vir IgG en komplemente C4, C3b en C3d, wat waarskynlik betrokke is by die aanhegting van eosinofiele aan ge-opsoneerde deeltjies (112). Deur middel van die H_1 -reseptor laat eksogene en toegevoegde histamien die aantal menslike eosinofiel C3b- en C4-reseptore toeneem. Die verhoogde uitdrukking van die C3b- en C4-reseptore, het onder andere die vergemakliking van eosinafhanklike doding van sekere parasiete soos die *Shistosomula* tot gevolg (112, 115, 116). Omdat parasitisme geassosieer word met hoë vlakke van IgE, vind antigeengeïnduseerde degranulasie by gesensitiseerde mastselle plaas en word histamien vrygestel. Die vrygestelde histamien lok die eosinofiele na die area van die reaksie, stimuleer vasklewing (117) en verhoog hul potensiële vermoë om die parasiete te vernietig (118).

1.4.3 Neutrofiële en histamien

Immuunregulatoriese effekte van histamien by neutrofiële sluit onder andere die onderdrukking van lisosomale ensiemvrystelling (91), neutrofielchemotakse (113), selvasklewing, 'n verhoging in chemokinese, superoksied-anioonproduksie en waterstofperoksied-vorming in (118).

Die effek van histamien op neutrofielbeweging, selvasklewing, neutrofielchemotakse (113), *in vitro* en *in vivo* (102), en die inhibisie van die vrystelling van die lisosomale ensiem, β -glukuronidase, vanaf menslike neutrofiële, in die teenwoordigheid van serumgeaktiveerde simosan (91) word bemiddel deur die H₂-reseptor, deur middel van 'n toename in sAMP (119,120). In 1998 bewys Schaefer verder dat die vasklewing van neutrofiel aan endoteel selle die gevolg is van H₂-reseptor sowel as die H₁-reseptor bemiddelde aktivering van fosfolipase C, nitraatoksied sintetase isosieme en guanilaatsiklase (120).

By konsentrasies van $1 \times 10^{-5}M$ tot $5 \times 10^{-5}M$, verhoog histamien neutrofielbeweging konstant, terwyl chemotakse geïnhibeer word deur dieselfde konsentrasies. Neutrofielbeweging word in totaal veroorsaak deur die stimulasie van chemokinese (gestimuleerde lukraak migrasie) (113).

Histamien het egter nie, soos by eosinofiele die uitdrukking van die C3b-reseptore verhoog by óf neutrofiële óf monosiete nie (112).

1.4.4 Basofiele en histamien

Die vrystelling van histamien en ander bemiddellaars in die allergiese reaksie is 'n proses van sekresie (eksositose) met die selgebonde IgE antiliggaam wat optree as die reseptor terwyl die antigeen die rol van die vrystellings agent vervul. Hierdie sekretoriese sisteem word beheer deur sAMP. Agente wat die

sAMP verhoog, inhibeer die histamienvrystelling vanaf menslike basofiele en mast selle. Ekstrasellulêre histamien verhoog die sAMP vlakke in basofiele (121) en inhibeer dus histamienvrystelling deur die basofiele (96, 122). Die betrokke histamienreseptor in basofiele is vermoedelik die H₂-reseptor omdat die H₂-reseptorantagoniste, burimamied en metiamied, die histamiengeïnduseerde inhibisie van histamienvrystelling sowel as die toename in sAMP, geblok het. Die H₂-reseptorantagoniste kon egter in die afwesigheid van histamien, nie die vrystelling óf die inhibisie van histamienvrystelling beïnvloed nie (121). Lichtenstein (121) bevind dat H₁-reseptorantagoniste nie die inhibisie van die histamienvrystelling of die toename in intrasellulêre sAMP, veroorsaak deur histamien, blokkeer nie. By hoë konsentrasies (1mM), het dit egter histamienvrystelling veroorsaak en by lae konsentrasies (0.1mM), het dit die antigeengeïnduseerde histamienvrystelling geïnhibeer. Die meganisme van inhibisie is nie deur middel van gedeeltelike agonisaktiwiteit nie, aangesien die H₁-reseptorantagoniste 'n merkbare val in sAMP veroorsaak het (121). Die toevoeging van histamien of 'n H₁-reseptoragonis by basofiele, het wel 'n toename in histidien opname tot gevolg gehad (99).

Behalwe histamien, induseer anti IgE stimulasie van basofiele, ook 'n konsentrasie afhanklike vrystelling van leukotrien C₄ (LTC₄). Net soos histamien, kan LTC₄ vrystelling geïnhibeer word deur die stimulasie van die H₂-reseptor op die sel oppervlakte en dit geskied ook deur middel van verhoogde vlakke van sAMP. Die LTC₄ is waarskynlik die bemiddelaar van vasodilatasie en die toename in vaskulêre deurlaatbaarheid in inflammatoriese dermatose. Bull (123) kom tot die gevolgtrekking dat die H₃-reseptor nie betrokke is by die anti-IgE bemiddelde vrystelling van histamien vanaf basofiele nie. Die outeur bevestig dat histamien sy eie vrystelling vanaf

basofiele reguleer deur middel van die H₂-reseptor en dat die teenwoordigheid van die H₃-reseptor by basofiele, onwaarskynlik is.

Kleine Tebbe (124) vind 'n verhoogde vrystelling van histamien met die inkubasie van gemengde leukosiete met N- α -asileerde histamien (H₃-reseptorantagonis) wat dui op die teenwoordigheid van 'n H₃-reseptor op een van die leukosiettypes. Die proses was afhanklik van dosis, tyd en temperatuur maar onafhanklik van kalsium en magnesium. IgE bemiddelde histamienvrystelling kon egter nie gemoduleer word nie ten spyte van histamien toename. Pre-inkubasie met twee spesifieke histidiendekarboksilasie-inhibitore nl. L-histidien-metielester en α -florometiel-histidien, sowel as die pre-inkubasie met die H₃-reseptoragonis (R)- α -metielhistamien of die adenielsiklase stimulerende agent, forskolin, het geen effek op die toename van histamien gehad nie. [3H]-L-histidien is dus nie gedekarboksileer na [3H]-histamien nie, ten spyte van die histamietoename. Die inkubasie van gesuiwerde basofiele met N- α -geasileerde histamien het nie 'n verhoging in die histamienvlakke veroorsaak nie, terwyl dieselfde reagens by gesuiwerde eosinofiele en neutrofiele 'n verhoging in histamien veroorsaak het. Die H₃-reseptorantagonis, tioperamied, het nie 'n toename in die histamienvlakke veroorsaak nie en ook nie die IgE bemiddelde antigeen geïnduseerde histamienvrystelling van gemengde leukosiete beïnvloed nie. Baie hoë konsentrasies tioperamied (10⁻⁴M) het egter 'n inhibisie van die leukosiet histamienvrystelling veroorsaak. N- α -geasileerde histamien bestaan egter uit 'n histamiengedeelte en 'n amino-groep en die moontlikheid bestaan dus dat eosinofiel- en neutrofiel-ensieme hierdie produk mag opbreek en so dan 'n verhoogde histamien vlak veroorsaak. H₃-reseptorantagoniste sonder die histamiengedeelte was nie in staat om die IgE bemiddelde histamienvrystelling in basofiele te moduleer nie

(124). Kleine Tebbe (124) lewer dus dieselfde getuienis as Bull (123) dat dit onwaarskynlik is dat die H₃-reseptor op basofiele voorkom.

1.4.5 Mast selle en histamien

Die onmiddellike hipersensitiwiteitsreaksie word gekenmerk deur die toename in die kutane vlakke van histamien, leukotrien C₄ (LTC₄) en prostaglandien D₂ (PGD₂). Mast selle is verantwoordelik vir die vrystelling van histamien en PGD₂, terwyl die LTC₄ se oorsprong, infiltrerende eosinofiele is (123).

Die mast selle speel dus 'n baie belangrike rol in die patogenese van allergie. Die gestoorde histamien in die mast selle word vrygestel in reaksie op 'n antigeen, via 'n IgE-bemiddelde meganisme. Limfosiete stel histamienvrystellingsfaktor (HRF) vry, wat dan inwerk op mast selle en die histamienvrystelling veroorsaak (105).

Die waarneming dat mast selle geassosieerd is met limfoïede weefsel en dat degranulasie plaasvind gedurende die vertraagde tipe hipersensitiwiteit-reaksies, het gelei tot die aanname dat mast selle die funksie van limfosiete moduleer. Khan MM (125) toon aan dat mast selle in hoë getalle ($>10^5$) die proliferasie van muis Th-selle onderdruk en by lae getalle (10^3 tot 6×10^4) dit verhoog. Mast selle verhoog ook die onderdrukkende kapasiteit van natuurlike Ts-selle. Byvoeging van histamien tot kokulture van muismast selle en Th-selle, het die mast selbemiddelde proliferasie van muis Th-selle verhoog, waarskynlik d.m.v. 'n H₁-reseptor-afhanklike meganisme, omdat die H₁-reseptoragoniste die effek kon namaak en die H₁-reseptorantagoniste die effek onderdruk het. Die H₂-reseptorantagonis, impromidien, het nie die H₁-reseptor-geïnduseerde proliferasie verander nie. Hierdie *in vitro* studies

ondersteun die teorie dat die H₁-reseptor in die moontlike modulering interaksie, tussen muis-mastselle, Th-selle en natuurlike Ts-selle betrokke is (15).

Bent vind in 1991 (126) dat H₁ en H₂-reseptorantagoniste (hidroksisien en simetidien) nie die histamienvrystelling vanaf mastselle beïnvloed by konsentrasies wat relevant is tot die *in vivo* omstandighede, nie. Tioperamied het egter wel die vrystelling van histamien verhoog. Dit mag dui op die teenwoordigheid van die H₃-reseptor op mastselle. Later is die teenwoordigheid van die H₃-reseptor op mastselle wel bevestig (127, 128) en daar is gevind dat die toniese kontrole oor mastsel aktiwiteit, en die histamiensintese vanaf histidien, deur die H₃-reseptor bemiddel word (129).

Die inhibisie van histamienvrystelling wat wel deur hidroksisien en simetidien, by baie hoë konsentrasies, verkry word, kan toegeskryf word aan 'n membraanstabiliserende effek. Die histamienvrystellings-effek deur impromidien, 'n H₂-reseptorantagonis, lyk asof dit tipies is vir die menslike mastselle, aangesien die IgE geïnduseerde histamienvrystelling van die mastselle geïnhibeer word by laer konsentrasies en weer opgehef word by hoër konsentrasies (130).

1.4.6 Monosiete, makrofage en histamien

Die teenwoordigheid van beide die H₁-reseptor (99) sowel as die H₂-reseptor is al op monosiete bewys.

Die immuunregulatoriese effekte van histamien, sluit onder andere 'n dosis afhanklike inhibisie van die produksie van komplement-komponent C2 deur monosiete, in. Hierdie effek word bemiddel deur die H₂-reseptor. Die histamien, wat vrygestel word deur basofiele en mastselle deur die C3 en C5

kliewings-produkte nl. C3a en C5a onderskeidelik, kan dus 'n negatiewe terugvoer op verdere C3 en C5 kliewing, deur die vorming van C3 en C5 konvertases nl. C42 en C423, te beperk, veroorsaak (131).

Histamien moduleer egter nie die menslike monosietchemotakse nie (132) en vermeerder ook nie die monosiet C3b-reseptore nie (116). Anders as die ander sAMP-aktiewe agente, moduleer histamien ook nie die aksie van makrofaag migrasie-inhiberende faktor (MIF) op makrofage nie (93), en dit aktiveer ook nie die makrofaag adenilaatsiklase nie (133).

1.5 Studie motivering

In die voorafgaande agtergrondstudie het 'n paar punte na vore gekom wat gelei het tot onbeantwoorde vrae. Hierdie punte kan as volg saamgevat word:

- die H₃-reseptor veroorsaak veranderinge in 'n gemengde leukosiet populasie,
- die H₃-reseptor is nie lukraak by die meeste weefsel-tipes betrokke nie,
- die H₁-reseptor en H₂-reseptor verklaar nie alle effekte nie.

In 'n poging om hierdie vrae te beantwoord is studies onderneem om die teenwoordigheid van die H₃-reseptor op limfosiete en neutrofiele te ondersoek.

HOOFSTUK 2

MEDIA EN REAGENSE

2.1 MEDIA

N-formiel-methioniel-leusiel-fenielalanien (fMLP)

fMLP (Sigma)

DMSO (dimetielsulfoksied, Merck)

Hanks (gebufferde gebalanseerde soutoplossing)

Maak fMLP op in DMSO tot 'n konsentrasie van 2 mM.

Vries by -70°C

Verdun net voor gebruik met Hanks tot 10^{-7}M sodat die finale konsentrasie van die fMLP in die kuvet, uiteindelik 10^{-6}M sal wees.

Gebufferde ammoniumchloried-oplossing

8.4g NH_4CL (Holpro)

1g NaHCO_3 (Merck)

0.124g EDTA (etileen-diamien-tetra-asynsuur, Sigma)

1l gedeïoniseerde + gedistilleerde water

Meng en bêre in yskas

Filtreer voor gebruik

Ge-opsoneerde simosan

10ml 1M NaOH

500mg Simosan (simosan A vanaf *Saccharomyces cerevisiae*. Sigma) in glasbuis.

500ml Bloedplasma

FBS (fosfaat gebufferde soutoplossing)

Voeg die NaOH by glasbuis met simosan en meng goed.

Plaas glasbuis in 'n houer met water wat gekook het en laat staan vir 'n paar minute.

Ontvries 500ml van die plasma wat voorheen by -70°C gevries is deur dit by kamertemperatuur te laat staan.

Sentrifugeer die plasma teen 3000opm vir 10minute by 4°C om die bloedplaatjies te verwyder.

Gooi plasma oor in skoon buise en herhaal sentrifugering 4 keer.

Versprei die plasma in 10 buise sodat elke buis 50ml plasma bevat.

Voeg by elke buis 1ml simosan. Die konsentrasie van die simosan is dus 500mg simosan / 500ml plasma.

Meng goed en inkubeer in 37°C waterbad vir 30-60 minute. Meng gereeld. Gedurende hierdie periode bind opsoniene soos antiliggame en die afbraakprodukte van komplement (bv. C3b), met die simosan. Dit word dus nou ge-opsoneerde simosan genoem.

Sentrifugeer buise teen 2000-3000opm vir 5minute.

Verwyder die plasma en voeg die sedimente saam in een buis.

Was die sediment 2 keer met FBS.

Voeg 50ml FBS by en meng goed. Die konsentrasie simosan/ FBS is dus 500mg/50ml of 10mg/ml.

Versprei in 50 plastiese buise sodat elke buis 1ml van die mengsel bevat.

Vries by -70°C

Wanneer benodig word, ontvries en voeg 1ml Hanks of FBS by sodat dit 1:1 verdun word. Die uiteindelijke konsentrasie wat gebruik word is dus 5mg/ml.

Deur 100 μl by elke kuvet te voeg word dit weer outomaties 10 keer verdun.

Die finale konsentrasie van simosan in die kuvet is dus 0.5mg/ml.

Hanks-oplossing:

Hanks (Hanks' gebufferde gebalanseerde soutoplossing, sonder kalsium, antibiotika, magnesium en bikarbonaat, Sigma)

Verdun Hanks 10 keer met gedistilleerde water.

Heparien - oplossing

500 eenhede heparien sonder preseveermiddels (Sigma) / ml gedeïoniseerde water

Filtreer

Voeg 0.1ml van die bereide heparien oplossing by 10ml vars bloed om stolling te voorkom.

Luminol:

0.00199g Luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4,- phthalazinedioon, Sigma)

1ml DMSO

FBS

Meng luminol en DMSO goed

Voeg 9ml FBS by. Die konsentrasie van die luminol is dus 10^{-3} M.

Verdun 10 keer in FBS tot die konsentrasie van 10^{-4} M.

Liseer-oplossing (NH₄Cl):

8.3g NH₄Cl

1.0g KHCO₃

800ml gedistilleerde water

Meng bogenoemde goed.

MTT

5mg [3-(4,5-dimetieltiasol-2-iel)-2,5-difeniel tetrasolium bromied, Sigma]

1ml FBS

Meng en steriliseer deur te filtreer.

Bedek met foelie en bêre in donker in yskas sodat dit beskerm is teen lig.

Fosfaat gebufferde – soutoplossing (FBS)

9.23g FTA hemaglutinasie buffer (BBL)

1 l gedistileerde water

Meng en pas pH aan tot 7.2 ± 0.1

FHA –oplossing

2mg suiwer FHA (Fitohemagglutinien met die biologiese bron *Phaseolus vulgaris*, Murex Diagnostics Ltd).

2ml steriele volledige RPMI.

Meng bogenoemde

Plaas hoeveelhede van 100 μ l van oplossing in buisies en vries by -70°C tot benodig word.

Voeg net voor gebruik 1.9ml steriele volledige RPMI by 'n buisie wat 0.1ml FHA bevat.

20 μ l van die oplossing word per putjie in die mikrotiterplaatjies gebruik. Die FHA word dus outomaties 10x verdun in putjie/kuvette en die finale konsentrasie van die FHA in die putjie/kuvette is dus 0.005mg/ml.

Volledige RPMI

445ml RPMI 1640-meduim met 1% L-glutamien, sonder antibiotika (Highveld Biological)

Antibiotika en antifungale middel [Penisilien G natruim (10mg/ml) plus streptomisien sulfaat (10 mg/ml) plus amfoterisien B (20µg/ml) (Highveld Biological)]

50ml 10% fetale kalfserum (Highveld Biological)

Ontdooi 5ml van die oplossing van antibiotika en antifungale middel in 'n waterbad en voeg by RPMI.

Ontdooi die 10% fetale kalfserum in 'n waterbad en inaktiveer daarna in 'n 56°C waterbad vir 45 minute. Sentrifugeer die fetale kalfserum teen 2000opm vir 5 minute en gooi sediment weg. Voeg by RPMI mengsel.

Bêre in yskas.

Witseltelvroeststof

1ml 1% kristalviolet (Merck)

2ml asynsuur (Holpro)

100ml gedeïoniseerde water

Meng bogenoemde goed

2.2 REAGENSE EN HUL EIENSKAPPE

Histamien:

2-(4-imidasool)-etielamien (Sigma) $C_5H_9N_3$ MM=111.15. Water oplosbaar.

In die lig daarvan dat dit reeds voorheen bewys is dat histamien by 'n konsentrasie van $10^{-4}M$ 'n inhibisie in die proliferasievermoë van menslike limfosiete veroorsaak (134, 106), was die konsentrasies histamien wat gebruik is in hierdie proewe rondom $10^{-4}M$.

Histamien is 'n H_1 -, H_2 - en H_3 -reseptoragonis (135) en is geredelik omkeerbaar op die H_3 -reseptor (136).

Setirisien:

2-[4-(4-chlorobenshidriel)piperasien-1-iel]et-oksi-asynsuur (UCB-Pharma)
 $C_{21}H_{25}ClN_2O_3 \cdot 2HCl$. MM=461.8

Dit is reeds bewys dat chemotakse en superoksied generasie by eosinofiele geïnhibeer word deur setirisien by konsentrasies tussen 0.01 en $1\mu g/ml$ (2.6×10^{-8} tot $2.6 \times 10^{-6}M$) (137) terwyl monosietchemotakse geïnhibeer word by konsentrasies tussen 0.25 en $2.5\mu g/ml$ (138). In ons proewe het ons dus konsentrasies gebruik rondom $10^{-6}M$.

Setirisien is 'n H_1 -reseptor antagonis (138).

Simetidien

Simetidien. $C_{10}H_{16}N_6S$. MM=252.3 (Sigma)

Ichinose (84) gebruik simetidien as 'n H_2 -reseptor blokker in die menslike lugweë by konsentrasies van $10^{-4}M$. In ons proewe het ons dus ook konsentrasies rondom $10^{-4}M$ gebruik.

Simetidien is 'n H_2 -reseptor antagonis (108).

(R)-(-)- α -metielhistamien (R- α -metielhistamien):

(R)- α -metiel-1H-imidasool-4-etanamien (Sigma) $C_6H_{11}N_3 \cdot 2HCl$. MM = 198,1 Water oplosbaar.

Dit is reeds bewys dat die interaksie van α -metielhistamien met die H_3 -reseptor stereospesifiek is en dat die R-isomeer 100 keer meer potent is as die S-isomeer (40). R- α -metielhistamien is op sy beurt omtrent vyftien maal meer potent as histamien (42).

Konsentrasies wat voorheen vir R- α -metielhistamien gebruik is om histamien vrystelling te ondersoek by mastselle was tussen 10^{-9} en $10^{-7}M$ (126), terwyl die konsentrasies histamien wat gebruik is by basofiele tussen 10^{-8} en $10^{-7}M$ was (123). Die konsentrasies wat ons in ons proewe gebruik het, was dus rondom $10^{-6}M$.

R- α -metielhistamien en S- α -metielhistamien is H_3 -reseptoragoniste (139) met swak H_1 -reseptor agonistiese (140) en H_2 -reseptor aktiwiteit (40).

Tioperamied:

Tioperamied maleaat. N-sikloheksiel-4-(1H-imidasool-4-iel)-1-piperidien-karbotioperamied maleaat. (RBI Research Biochemical International)
 $C_{15}H_{24}N_4S \cdot C_4H_4O_4$. MM = 408.52. Water oplosbaar.

Konsentrasies tioperamied wat gebruik is om die histamien vrystelling by beide mast selle (126), sowel as by basofiele te ondersoek, was tussen 10^{-4} en $10^{-6}M$ (123). Dieselfde konsentrasiegrense is dus met ons proewe gebruik.

Tioperamied is 'n selektiewe H_3 -reseptorantagonis (40). Effek van tioperamied op die H_3 -reseptor is egter geredelik omkeerbaar (136).

HOOFSTUK 3

BEPALING VAN RESEPTOREFFEKTE DEUR MIDDEL VAN EVALUERING VAN SELPROLIFERASIE EN OORLEWING, DEUR GEBRUIK TE MAAK VAN DIE MTT-METODE

3.1 INLEIDING

MTT (3-[4,5-dimetieltiasol-2-iel]-2,5-difenieltetrasoliumbromied) is gebruik vir die kwantitatiewe spektrofotometriese bepaling van die proliferasie vermoë sowel as die oorlewing van selle. Die beginsel van die toets berus daarop dat die tetrasoliumring slegs in aktiewe mitochondria geklief word en die reaksie vind dus nie in dooie selle plaas nie.

MTT is 'n bleek, geel substraat, en lewer na die reaksie in die mitochondria, 'n formasanprodukt, wat donkerblou is. Die hoeveelheid formasan wat gegeneer word, is reg eweredig aan die aantal lewensvatbare selle (141). Die mate van aktivering van die selle, die proliferasie vermoë van die selle en die sitotoksiteit kan dus bepaal word deur die mate van verkleuring wat verkry word na inkubasie met MTT.

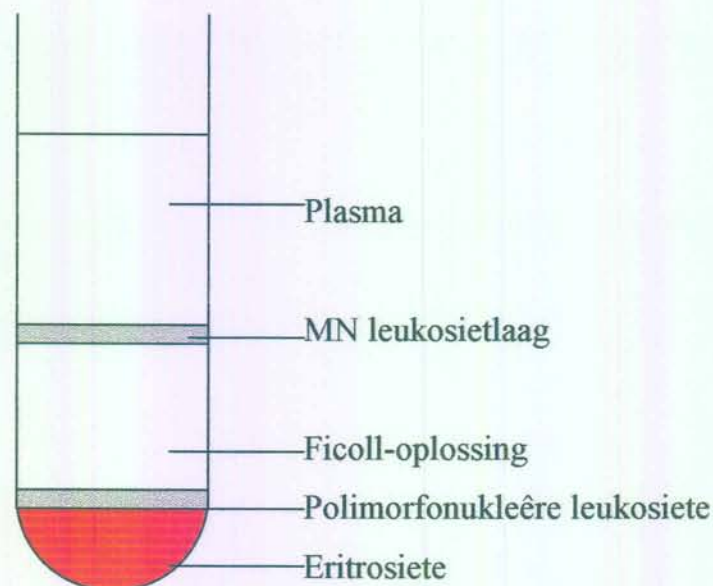
3.2 METODE

Vorbereiding van suiwer mononukleêre (MN) leukosiete:

Heparien (5 eenhede per ml bloed), is by veneuse menslike bloed gevoeg om stolling te voorkom. Een derde van 'n steriele 50ml polipropileen-sentrifugeer-buis is met steriele ficoll (Histopaque ®- 1077, Sigma) gevul en die buis is verder opgevul met die gehepariniseerde bloed, deur dit stadig met behulp van 'n pipet, op die ficollmeniskus te laat loop. Die buis is vir 25 minute teen 1200 omwentelinge per minuut (opm) (335g) by kamertemperatuur, gesentrifugeer. Na sentrifugasie, was die bloedkomponente en ficoll in verskillende lae geskei. Sien figuur 3.1. Die

plasma is versigtig met behulp van 'n steriele plastiese pipet afgesuig tot ongeveer 5mm bokant die MN leukosietband. Die MN leukosietband is ook met behulp van 'n pipet verwyder en in 3 steriele 50ml sentrifugeerbuis versprei. Die buise is opgevol met RPMI (RPMI 1640, Highveld Biological Pty Ltd), liggies geskud, en vir 15 minute by kamertemperatuur gesentrifugeer teen 950 opm (200g). Die supernatant is verwyder en die sedimente van die drie buise is saamgevoeg in een buis. Die buis is opgevol met gefiltreerde NH_3Cl -oplossing en vir 10-15 minute op ys geïnkubeer, sodat die eritrosiete kon liseer. Die buisie is vir 10 minute by kamertemperatuur teen 950 opm gesentrifugeer. Die sediment is hierna twee maal met RPMI by kamertemperatuur teen 950 opm gewas. Die sediment is opgemaak tot 1ml.

Figuur 1: 'n Diagrammatiese voorstelling van die proefbuis met ficoll-oplossing en heparienbehandelde bloed na sentrifugasie.



Standaardisering van die MN leukosietsuspensie:

'n Standaard MN leukosietsuspensie is soos volg berei: 0.45ml witseltelvloeistof is in 'n 5ml proefbuis gegooi. Hierby is 50 μ l van die MN leukosietsuspensie gepipeteer, goed geskud en die hoeveelheid MN leukosiete is mikroskopies met behulp van 'n haemasitometer bepaal en dienooreenkomstig tot 2×10^6 MN leukosiet per milliliter opgemaak.

MN leukosiettransformasie:

Hierdie deel van die tegniek is op mikrotiterplate [ronde bodem, 96 putjies mikrotiterplaatjie, (Sigma)], uitgevoer. 100 μ l van die MN leukosietsuspensie is in al die putjies, behalwe een, geplaas. Hierdie putjie het in totaal 200 μ l volledige RPMI medium gekry. Die MN leukosietsuspensie is deurentyd gemeng terwyl dit in die putjies geplaas is, sodat die konsentrasie van selle wat ingespuut is, dieselfde kon bly. Omdat die uiteindelijke volume van die putjies 200 μ l is, en dit 100 μ l van die MN leukosietsuspensie ontvang het, is die MN leukosietsuspensie dus outomaties 2x verdun en was die finale konsentrasie selle in die mikrotiterplaatjie dus 1×10^6 MN leukosiete per milliliter. Die mikrotiterplaatjie is vir 'n halfuur by 37°C in 'n vogtige 5% CO₂ atmosfeer, geïnkubeer.

20 μ l reagens en kombinasies van reagense, is waar nodig bygevoeg en die mikrotiterplaatjie is weer vir 30 minute in dieselfde inkubator geïnkubeer. Tydens die MN leukosiettransformasie was dit belangrik dat die totale volume per mikrotiterputjie deurentyd dieselfde gehou is, met die gevolg dat die volume medium (volledige RPMI) wat per mikrotiterputjie gebruik is, van die totale volume van die res van die reagense wat in die putjie gevoeg is, afgehang het. Die volledige RPMI wat in die mikrotiterplaatjies gebruik is, het 1% antibiotika (Penicillin G + Streptomisien sulfaat, Highveld Biological) en 10 % fetale kalfserum (Highveld Biological) bevat.

20 μ l FHA (fitohemagglutinien waarvan die biologiese bron *Phaseolus vulgaris* is), om die selle te aktiveer, is by al die putjies, behalwe 3, gevoeg sodat die finale konsentrasie van die FHA in elke putjie 5 μ g/ml was. Die 3 putjies wat nie FHA ontvang het nie, het slegs selle en volledige RPMI ontvang. Die drie kontrole putjies het slegs selle, volledige RPMI en FHA ontvang. Laasgenoemde putjies het dus nie reagense ontvang nie en is as basislyn gebruik. Die totale volume van al die putjies was dus 200 μ l. Hierna is die mikrotiterplaatjie vir 72 uur by 37°C in 'n vogtige 5% CO₂ atmosfeer, geïnkubeer.

MTT bepaling:

Na die inkubasie van 72 uur, is 20 μ l MTT by al die putjies bygevoeg en die mikrotiterplaatjie is weer vir 4 uur geïnkubeer. Vervolgens is dit gesentrifugeer vir 10 min teen 2000 opm (900g) by kamertemperatuur.

Tot op hierdie stadium is daar deurgaans steriel te werk gegaan. Na die inkubasie is die supernatant met behulp van 'n tuberkulienspuitjie afgetrek. Die putjies is gewas met 150 μ l nie gefiltreerde fosfaatgebufferde soutoplossing (FBS) en 100 μ l DMSO (Dimetielsulfoksied, Merck) is bygevoeg. Die mikrotiterplaatjie is in 'n donker plek, oornag gelaat, sodat die blou kristalle kon oplos. Die steeds onopgeloste blou kristalle is die volgende dag opgelos deur dit goed met behulp van 'n tuberkulienspuitjie, te meng. Die mikrotiterplaatjie is hierna deur middel van 'n ELISA plaatleser (Ceres UV 900hdi, Bio-Tek Instruments, INC) by 'n toetsgolflengte van 540nm, 'n verwysingsgolflengte van 620nm, en 'n kalibrasie-instelling van 1.99, gelees.

3.3 RESULTATE

Elke konsentrasie is in triplikaat gedoen. Die resultaat word uitgedruk nadat die kontrole afgetrek is en vermenigvuldig is met 1000. 'n Positiewe resultaat dui dus op 'n stimulasie, terwyl 'n negatiewe resultaat op 'n onderdrukking in proliferasie dui. Die invloed van histamien (Ha), R- α -metielhistamien (Mh), en tioperamied (Tio) op die proliferasie van MN leukosiete, word in tabel 3.1, 3.2 en 3.3, sowel as in figuur 3.1, 3.2 en 3.3 opgesom.

Tabel 3.1

Die gemiddelde verandering (x1000) vanaf die kontrole in die proliferasie van MN leukosiete, onder die invloed van 10^{-5} M tioperamied en verskillende konsentrasies histamien.

Konsentrasie	Histamien alleen	Tioperamied (10^{-5} M) + Histamien
10^{-8} M	106.45	72.9
10^{-7} M	124.52	92.9
10^{-6} M	156.13	120
10^{-5} M	165.81	91.61
10^{-4} M	120.00	95.48
10^{-3} M	110.97	123.87
10^{-2} M	100.67	84.52

Tabel 3.2

Die gemiddelde verandering (x1000) vanaf die kontrole in die proliferasie van MN leukosiete, onder die invloed van verskillende konsentrasies tioperamied en histamien (10^{-4} M of 10^{-5} M).

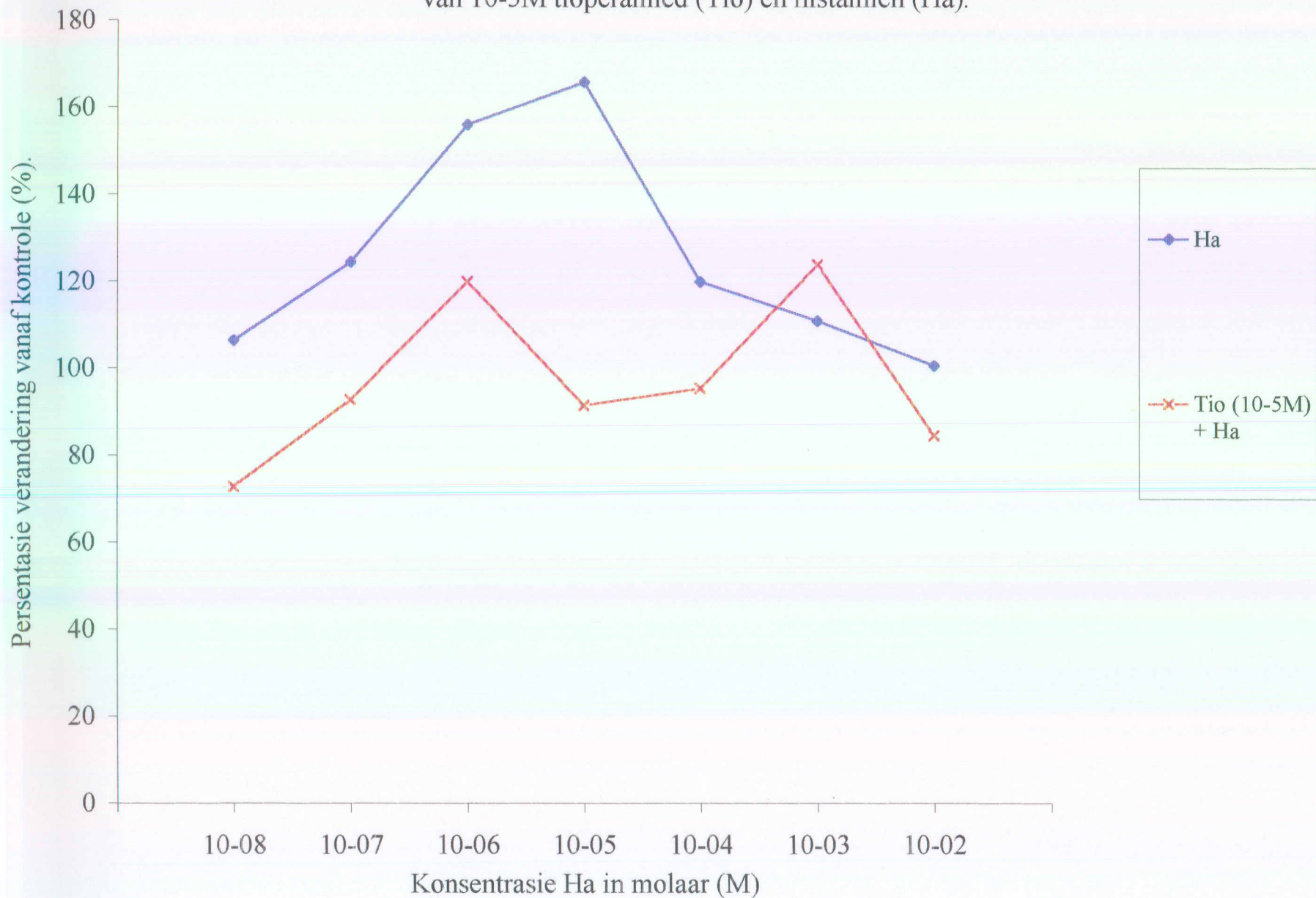
Konsentrasie Tioperamied gebruik	Tioperamied + Histamien (10^{-4} M)	Tioperamied + Histamien (10^{-5} M)
10^{-14} M	--	-156
10^{-13} M	-156	-112
10^{-12} M	-99	-108
10^{-11} M	-141	-94
10^{-10} M	-94	-56
10^{-9} M	-89	-51
10^{-8} M	-24	--
10^{-7} M	-7	--

Tabel 3.3

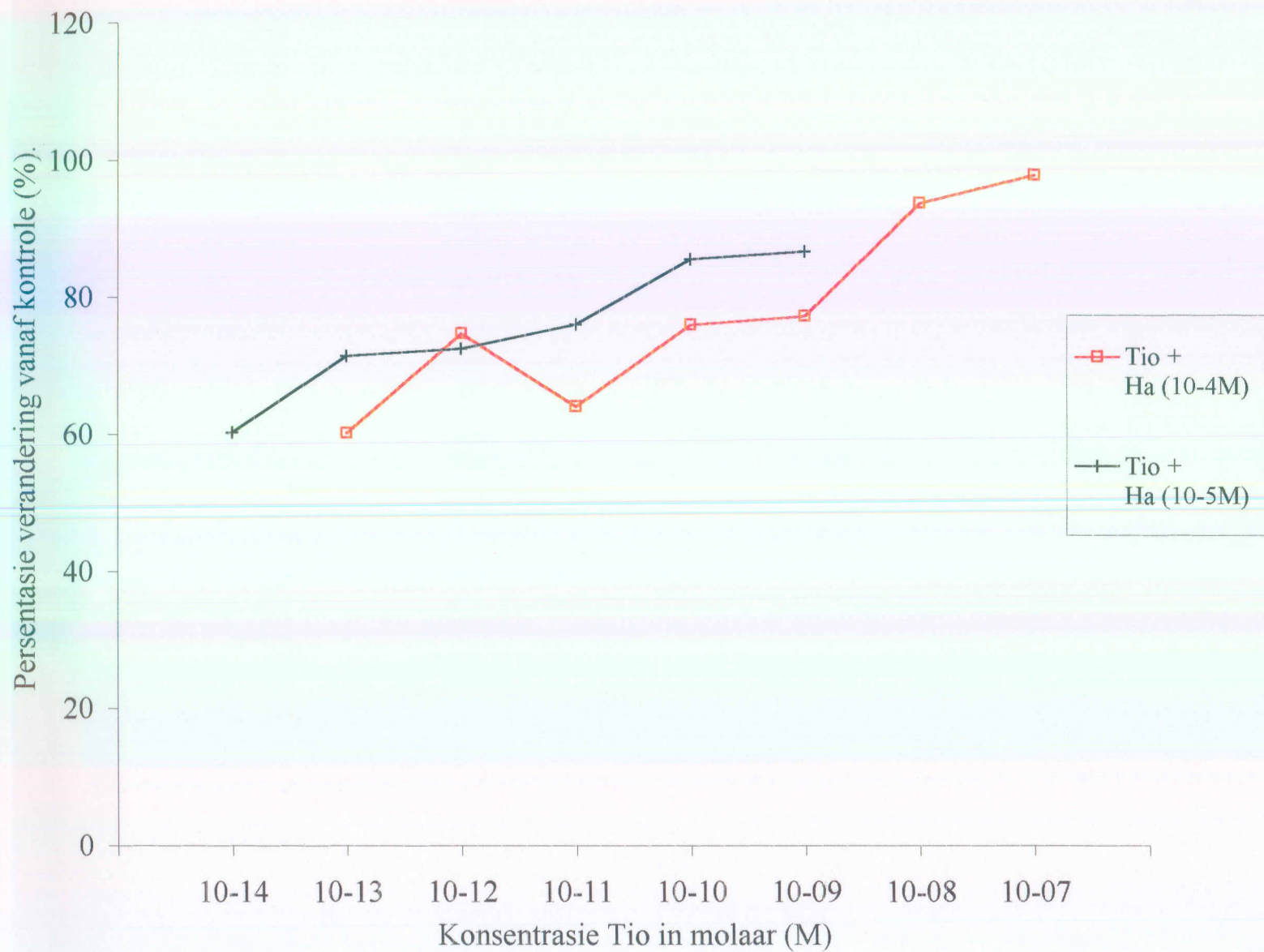
Die gemiddelde verandering (x1000) vanaf die kontrole in die proliferasie van MN leukosiete, onder die invloed van verskillende konsentrasies R- α -metielhistamien en tioperamied.

Konsentrasie	R- α -metielhistamien	Tioperamied (10^{-4} M) + R- α -metielhistamien
R- α -metielhistamien	alleen	
10^{-12} M	-12	-51
10^{-11} M	22	-10
10^{-10} M	-14	-15
10^{-9} M	11	-16
10^{-8} M	59	48
10^{-7} M	36	5
10^{-6} M	35	54
10^{-5} M	17	-140

Figuur 3.1 MTT as merker van limfosiet aktiwiteit. Gemiddelde persentasie verandering vanaf die kontrole in die proliferasie van FHA gestimuleerde mononukleêre leukosiete onder die invloed van 10-5M tioperamied (Tio) en histamien (Ha).



Figuur 3.2 MTT reaksie as merker van limfosiet aktiwiteit. Gemiddelde persentasie verandering vanaf die kontrole in die proliferasie van FHA gestimuleerde mononukleêre leukosiete, onder die invloed van tioperamied (Tio) en histamien (Ha).



Figuur 3.3 MTT reaksie as merker van limfosiet aktiwiteit. Gemiddelde persentasie verandering vanaf die kontrole in die proliferasie van FHA gestimuleerde mononukleêre leukosiete, onder die invloed van tioperamied (Tio) en R-metielhistamien (Mh).



Die data in tabel 3.1 en figuur 3.1 toon dat FHA gestimuleerde MN leukosiete matig gestimuleer word met histamien (10^{-3} tot 10^{-8} M). Tioperamied by 'n vaste konsentrasie (10^{-5} M) in die teenwoordigheid van histamien, demp egter hierdie stimulerende effek van histamien. Die stimulasie van die H₁- en H₂-reseptor in die teenwoordigheid van H₃-reseptorblokkade lei dus tot 'n mate van opheffing van die stimulerende effek van histamien by laer konsentrasies. Sodra die H₃-reseptorblokkade by hoër konsentrasies verplaas word, verdwyn die effek egter.

In tabel 3.2 en figuur 3.2 word bewys dat in die teenwoordigheid van gevestigde tioperamied (H₃-reseptorantagonis), histamien by konsentrasies van beide 10^{-4} M en 10^{-5} M aanleiding gee tot die onderdrukking van FHA gestimuleerde MN leukosiete. Hierdie onderdrukkende effek is meer uitgesproke by laer konsentrasies tioperamied en verminder sodra tioperamied se konsentrasies styg. Die stimulasie van die H₁-, H₂- en H₃-reseptore tesame met die blokkade van die H₃-reseptor by lae konsentrasies tioperamied, lei dus tot onderdrukking. Hoe groter die H₃-reseptor blokkade, hoe meer word die onderdrukkende effek opgehef. Dit wil dus voorkom asof die onderdrukkende effek in 'n mate van H₃-reseptor stimulasie afhanklik is.

Volgens tabel 3.3 en figuur 3.3 lyk dit asof R- α -metielhistamien op sy beurt, 'n effense stimulerende effek op die proliferasie het. Laasgenoemde effek word ook deur tioperamied gedemp.

3.5 BESPREKING

MN leukosiete bestaan hoofsaaklik uit limfosiete aangesien die verhouding van limfosiete tot monosiete in hierdie groep selle $\pm 10:1$ is. Die resultate verkry deur MN leukosiete kan dus grootliks toegeskryf word aan die reaksie van die limfosiete (142).

Hierdie studie bevestig eerstens dat die histamienreseptore betrokke is by die proliferasie van die limfosiete, aangesien histamien die proliferasie van limfosiete gestimuleer het. Dit is in ooreenstemming met vorige werk wat deur ander outeurs gedoen is. Dit is ook reeds bekend dat die H₃-reseptor op neurone aan 'n negatiewe terugvoersisteem gekoppel is (13). By neurone veroorsaak die stimulasie van die H₃-reseptor, dus 'n afname in die vrystelling van neurotransmittore (13, 33). Ons sou dus ook hier verwag dat die stimulasie van die H₃-reseptor 'n afname in proliferasie sou veroorsaak en dat die blokkering van die H₃-reseptor die proliferasie sou stimuleer of ten minste die inhibisie sou ophef. Die H₁- en H₂-reseptore word egter ook terselfder tyd deur histamien gestimuleer en kompliseer die situasie. Ons vind egter dat R- α -metielhistamien, 'n selektiewe H₃-reseptoragonis, die proliferasie van limfosiete effens gestimuleer het en dat die stimulasie weer deur tioperamied opgehef is.

Tioperamied het ook die stimulasie wat deur histamien veroorsaak is, op 'n dosisafhanklike manier geïnhibeer. In hierdie eksperimente lyk dit dus asof die H₃-reseptor wel op limfosiete voorkom. Dit wil dus voorkom asof H₃-reseptor stimulasie in 'n mate aan onderdrukking gekoppel is. Omdat die tipe limfosiet subpopulasie nie geïdentifiseer is nie en alle eksperimente nie hierdie bevinding bevestig nie, word verdere navorsing aanbeveel.

HOOFSTUK 4

BEPALING VAN MONONUKLEËRE LEUKOSIETTRANSFORMASIES DEUR MIDDEL VAN RADIO-AKTIEWE TIMIDIEN

4.1 INLEIDING

Limfosiettransformasie sluit 'n reeks biochemiese veranderinge soos die aktivering van adeniel siklase, 'n verhoogde vlak van intrasellulêre sAMP, sAMP-afhanklike kinase en tirosienkinase, asook die sintese van proteïene soos RNS en uiteindelik DNS, in. Tydens die vermeerdering en groei (toename in grootte) van limfosiete, is daar dus 'n toename in die DNS-sintese, wat gekwantifiseer kan word deur die inkorporering van radioaktiewe ³H-gemerkte timidien. Die aantal β-tellings wat deur middel van die β-teller verkry word, is dan reg eweredig aan die mate van limfosiettransformasie wat plaas gevind het (110).

4.2 METODE

Voorbereiding van suiwer MN leukosiete:

Die MN leukosiete is op dieselfde manier voorberei as in 2.1.

Standaardisering van die MN leukosietsuspensie:

Die MN leukosietsuspensie is op dieselfde manier as in 2.1 gestandaardiseer.

Radioaktiewe ³H-gemerkte timidieneksperiment:

100μl selle is in mikrotiterputjies gevoeg en vir 30 minute by 37°C en 5% CO₂ geïnkubeer. Die verskillende reagense en volledige RPMI is bygevoeg en die mikrotiterplaatjie is daarna weer vir 30 minute geïnkubeer. 20μl FHA is by elke putjie bygevoeg. Die volume van elke putjie is opgevol tot 200μl met RPMI en die mikrotiterplaatjie is vir 48 uur by 37°C en 5% CO₂ geïnkubeer.

Tydens die inkubasieperiode van die mikrotiterplaatjie, is die ^3H -timidien (Timidien-metiel- ^3H , Sigma) se radioaktiwiteit getoets deur 50 μl timidien by 1,5ml RPMI te voeg. 20 μl van hierdie mengsel is in 'n glasbuis geplaas en 3ml sintilasievloeistof (Ultima gold XR, High flash point liquid scintillation cocktail ®, Packard), is bygevoeg. Die radioaktiwiteit is in 'n β -sintillasievloeistofteller (1211 Minibela Liquid Scintillation Counter, LKB, Wallace) gemeet (360 00 – 700 000 β tellings per minuut) en indien dit nodig was, is dit verder verdun totdat 'n waarde van 360 000 β - tellings per minuut verkry is.

Nadat die periode van inkubasie van die mikrotiterplaatjie van 48 uur voltooi is, is 20 μl van die ^3H -gemerke timidien by elke putjie gevoeg. Hierna is dit weer vir 4 uur geïnkubeer.

Die selle met die ^3H -gemerke timidien is met behulp van 'n selspoelmasjien (PHD Cell Harvester, Cambridge Technology) op filters ge-oes. Eerstens is die oortollige ^3H -timidien uitgewas, sodat slegs die getransformeerde MN leukosiete, met ander woorde die MN leukosiete wat die ^3H -timidien tydens die DNS sintese opgeneem het, op die filtreerpapier agter gebly het. By elke filter is 3ml sintillasievloeistof gevoeg en na 'n stabiliseringsperiode van 'n half uur die radioaktiwiteit is weer gemeet.

4.3 RESULTATE

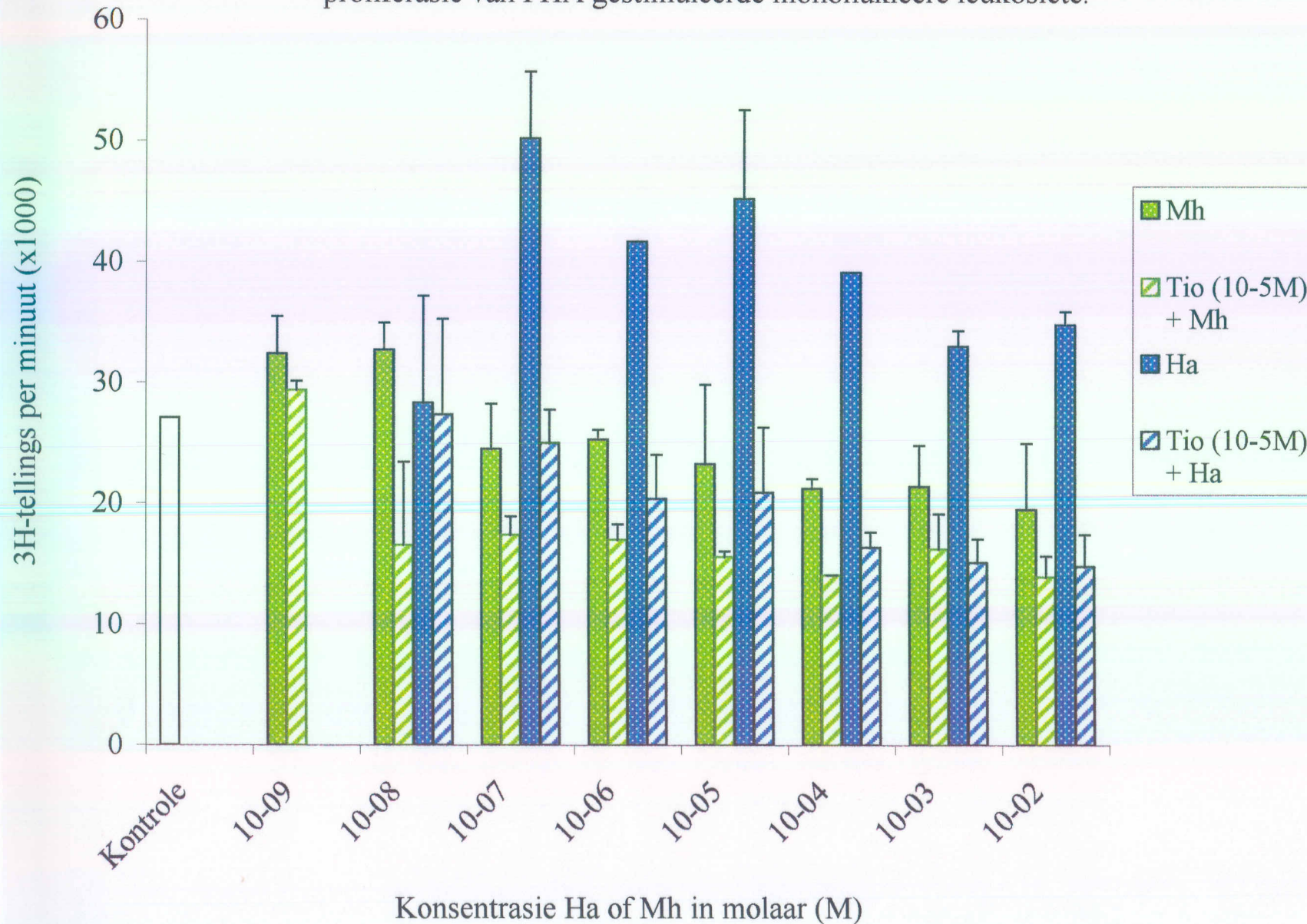
Die resultaat is uitgedruk as 'n gemiddelde, \pm standaardafwyking (sa) van 3 eksperimente. Die selle wat geen reagense ontvang het nie, is as die kontrole geneem. Die effek van histamien (Ha), tioperamied (Tio) en R- α -metielhistamien (Mh) op die proliferasie van MN leukosiete, word met behulp van tabel 4.1 en histogramme in figuur 4.1 en figuur 4.2 uitgedruk.

Tabel 4.1

Die gemiddelde x 1000 (\pm standaardafwyking) van FHA gestimuleerde MN leukosiettransformasies in die teenwoordigheid van verskillende konsentrasies histamien, tioperamied (Tio) en R- α -metielhistamien (Mh).

Konsentrasie Histamien of Mh	Histamien	Tio (10^{-5} M) + Histamien	Mh	Tio (10^{-5} M) + Mh
10^{-09}			32.38 (3.103)	29.408 (0.7)
10^{-08}	28.343 (8.86)	27.361 (7.925)	32.721 (2.218)	16.577 (6.894)
10^{-07}	50.223 (5.504)	25.013 (2.777)	24.526 (3.732)	17.404 (1.551)
10^{-06}	41.687 (0.00)	20.387 (3.65)	25.287 (0.799)	17.028 (1.296)
10^{-05}	45.236 (7.341)	20.892 (5.422)	23.279 (6.549)	15.601 (0.481)
10^{-04}	1.156 (0.00)	16.353 (1.251)	21.22 (0.811)	14.071 (0.00)
10^{-03}	33.01 (1.306)	15.082 (1.979)	21.41 (3.392)	16.253 (2.923)
10^{-02}	34.796 (1.089)	14.76 (2.674)	19.475 (5.482)	13.934 (1.755)
Kontrole	27.064			

Figuur 4.1 3H-timidien inkorporasie in limfosiete as merker van aktiwiteit. Die effek van histamien (Ha), R-metielhistamien (Mh) en tioperamied (Tio) (gemiddeld \pm sa) op die proliferasie van FHA gestimuleerde mononukleêre leukosiete.



Die data in tabel 4.1 en figuur 4.1 dui daarop dat histamien by laer konsentrasies (10^{-2} en 10^{-7} M) FHA gestimuleerde MN leukosiettransformasies in 'n geringe mate stimuleer. Hierdie stimulasie neem in 'n geringe mate af by hoër konsentrasies histamien, soortgelyk as wat waargeneem is tydens die MTT proewe. In die teenwoordigheid van tioperamied (10^{-5} M) het die stimulerende effek van histamien by laer konsentrasies, verdwyn. By hoër konsentrasies histamien, wat die tioperamied van die H_3 -reseptor verplaas, vind verdere demping plaas. Die onderdrukking wat gevind word by hoër konsentrasies histamien het dus waarskynlik te doen met H_3 -reseptor stimulasie.

Die effek van H_1 - en H_2 -reseptor stimulasie by alle konsentrasies histamien, sowel as verskille in subpopulasies, moet egter ook in aanmerking geneem word. Die gevestigde H_3 -reseptor blokkade kan waarskynlik intrasellulêre 2de boodskappersisteme sodanig beïnvloed dat H_1 - en H_2 -reseptor effekte ook beïnvloed word en daarom die opheffing van die aanvanklike stimulasie van histamien by laer konsentrasies.

R- α -metielhistamien, 'n selektiewe H_3 -reseptoragonis, onderdruk ook die FHA gestimuleerde limfosiettransformasies tussen 10^{-2} en 10^{-7} M. By laer konsentrasies (10^{-8} en 10^{-9} M) stimuleer R- α -metielhistamien die limfosiettransformasies egter in 'n baie geringe mate. Wanneer tioperamied in kombinasie met R- α -metielhistamien toegedien word, word die reeds uitgesporke onderdrukking deur laer konsentrasie R- α -metielhistamien verder onderdruk. Hierdie verskynsel is moontlik verklaarbaar in die lig van vorige eksperimente.

4.4 BESPREKING

MN leukosiete bestaan uit limfosiete en monosiete. Die verhouding van limfosiete tot monosiete in hierdie groep selle, is egter $\pm 10:1$. Die reaksie van MN leukosiete op reagense, kan dus in 'n grootliks toegeskryf word aan die reaksie van die limfosiete (142).

Histamien beïnvloed die proliferasie van limfosiete (134). In hierdie eksperimente kan gesien word dat histamien die proliferasie van limfosiete stimuleer. Hierdie stimulatoriese effek was opgehef met tioperamied, 'n selektiewe H_3 -reseptorantagonis. In die teenwoordigheid van tioperamied veroorsaak histamien 'n uitgesproke inhibisie. Dit dui waarskynlik op 'n toniese effek van die H_3 -reseptor.

R- α -metielhistamien het by baie lae konsentrasies (10^{-8} tot $10^{-9}M$) die proliferasie gestimuleer. Hierdie stimulasie is ook opgehef deur tioperamied. Hoër konsentrasies R- α -metielhistamien het die proliferasie egter geïnhibeer terwyl 'n kombinasie van R- α -metielhistamien en tioperamied die proliferasie selfs verder gedemp het. Dit wil dus voorkom asof tioperamied 'n gedeeltelike agonis is wat 'n additiewe effek op R- α -metielhistamien geïnduseerde onderdrukking het, by die konsentrasies wat gebruik is. Hierdie verskynsel sal verder ondersoek moet word.

Die H_3 -reseptor in die neurone is gekoppel aan 'n negatiewe terugvoersisteem waar die stimulasie daarvan die vrystelling van neurotransmittore verminder (13, 33). In hierdie proewe het die stimulasie van die H_3 -reseptor (by hoër konsentrasies) 'n inhibisie veroorsaak wat ook dui op 'n negatiewe terugvoer sisteem. Dit bevestig dus die teenwoordigheid en die inhibitoriese effek van die H_3 -reseptor op limfosiete, en steun die ander eksperimente en die werk van ander outeurs (124).

HOOFSUK 5

BEPALING VAN SUURSTOF VRYRADIKALE DEUR MIDDEL VAN LUMINOL

5.1 INLEIDING

Die aktivering van neutrofiële, monosiete en makrofage het die vrystelling van ekstrasellulêre suurstofradikale soos hidroksielradikale, superoksiedradikale, waterstofperoksiedradikale en hipochloorsuur tot gevolg (143). Dit geskied deurdat die besetting van 'n membraanreseptor van byvoorbeeld neutrofiële deur fMLP (144) of simosan (145), lei tot 'n reseptor-G-proteïenkoppeling, die aktivering van fosfolipase C en die generasie van inositoltrifosfaat deur die hidrolise van fosfotidielinositol 4,5 bifosfaat. Die inositoltrifosfaat reageer met 'n Ca^{++} mobiliserende-reseptor, met die gevolg dat die kalsium vanuit die store vrygestel word. Die Ca^{++} is weer op sy beurt die sleutelaktiveerder vir verskillende latente sitolitiese ensieme wat sellulêre reaksies soos superoksiedgenerasie en degranulasie inisieer (144).

Ca^{++} is dus die tweede boodskapper. Die toename in Ca^{++} is 'n vinnige aksie wat superoksiedgenerasie vooraf gaan, terwyl die uitputting van ekstrasellulêre of intrasellulêre Ca^{++} , die aksies van fMLP inhibeer (146). Die inhibisie van die Ca^{++} konsentrasie is ook in korrelasie met die verandering in intrasellulêre sAMP (147). Tydens die respiratoriese piek word die primêre biochemiese aktiwiteit van die univalente reduksie van suurstof na superoksied, deur die ensiem NADPH-oksidasie veroorsaak (158).

'n Interaksie tussen die suurstofradikale en luminol het lig vrystelling tot gevolg en die vorming van die aktiewe suurstofradikale deur die leukosiete,

kan in die teenwoordigheid van luminol waargeneem word as chemiluminessensie (143). Luminol-afhanklike-chemiluminessensie (LuCl) bied dus 'n sensitiewe tegniek om die produksie van aktiewe suurstofradikale te bepaal.

In vorige proewe is dit bewys dat histamien superoksied vorming in menslike neutrofiële deur middel van die H₂-reseptor, inhibeer (146, 149). By MN leukosiete inhibeer histamien by hoër dosisse (10⁻⁵M), ook LuCl deur middel van die H₂-reseptor, terwyl dit by laer dosisse (10⁻⁸ to 10⁻¹⁰M), egter LuCl stimuleer. Die histamiengeïnduseerde inhibisie kan opgehef word deur simetidien (H₂-reseptorantagonis), maar nie deur mepiramien (H₁-reseptorantagonis) nie. Wanneer H₂-reseptoragoniste die inhibisie van LuCl by MN leukosiete egter induseer, word dit verhoog deur mepiramien. Die mepiramien alleen is egter onaktief, wat aandui dat die blokkade van die H₁-reseptor die relatiewe konsentrasie of aktiwiteit van die histamienerge middels by die H₂-reseptor verhoog. Merety se resultate suggereer dat, by lae konsentrasies, die histamien aan die H₁-reseptor op MN leukosiete bind, wat 'n verhoging veroorsaak (byvoorbeeld op kontraonderdrukkerselle), terwyl by hoër konsentrasies, die H₂-reseptor wat teenwoordig is op die onderdrukkerselle, die reaksie domineer. Merety kom tot die gevolgtrekking dat histamien 'n tweeledige modulerende funksie op menslike MN leukosiete het nl.: H₂-reseptorspesifieke binding en H₁-reseptor spesifieke indirekte fasilitasie (143).

Die H₃-reseptor op neurone is 'n outoreseptor wat die vrystelling van histamien (13) en ander neurotransmittore (33) verminder deur 'n negatiewe terugvoersisteem. Die effek wat H₃-reseptor spesifieke antagonist en agoniste op 'n spesifieke seltipe het, kan dus aandui of daardie seltipe H₃-reseptore besit.

Sou H₃-reseptorstimulasie 'n inhibisie van vryradiale produksie veroorsaak, en die inhibitoriese effek omkeerbaar is met die blokkade van die H₃-reseptor, sal dit op die teenwoordigheid van die H₃-reseptor dui.

5.2 Mononukleêre (MN) leukosiete

5.2.1 METODE

Voorbereiding van suiwer MN leukosiete:

Bloed is getrek in 3 of 4 heparienbuisies en daarna 1:1 verdun met FBS in 'n 50ml polipropileensentrifugeerbuis. Vyftien ml ficoll (Histopaque - 1077, Sigma) is in 'n tweede 50ml polipropileensentrifugeerbuis geplaas en die heelbloed mengsel is versigtig met behulp van 'n pipet, op die ficollmeniskus geplaas. Na sentrifugasie, was die bloedkomponente en ficoll in verskillende lae geskei. Sien figuur 3.1. Die buis is gesentrifugeer teen 2100opm (100g) vir 30 minute by 11°C. Die plasma bokant die MN leukosietband is afgetrek en gevries by -70°C vir toekomstige voorbereiding van ge-opsoneerde simosan. Die MN leukosietband is met behulp van 'n pipet afgehaal en in 'n ander 50ml sentrifugeerbuis geplaas.

Die buis met die MN leukosiete is volgemaak met FBS, gemeng en daarna gesentrifugeer vir 10 minute teen 1200opm (400g) by 11°C. Die supernatant is weggegooi en die sediment is met Hanks oplossing by kamertemperatuur gewas.

Standaardisering van die MN leukosietsuspensie:

Die MN leukosietsuspensie is gehersuspendeer tot 'n konsentrasie van 2×10^5 selle / ml, met behulp van witseltelvlakstof en 'n haemasitometer.

Luminol-afhanklike-chemiluminessensie (LuCl):

In elke kuvet is 100 μ l selle geplaas, waarna 200 μ l Hanks oplossing bygevoeg is. Hierna is 200 μ l luminol (5-amino-2, 3-dihidro-1,4,-phthalazinedioon, Sigma) in al die kuvette gevoeg. Die kuvette is vir 30 minute geïnkubeer. Die antagonist (tioperamied, setirisien, simetidien), is waar nodig, bygevoeg en daarna weer vir 30 minute geïnkubeer, voordat die agoniste (histamien of R- α -metielhistamien) bygevoeg is. Spontane chemiluminessensie is met intervalle van 2 minute in 'n luminometer (Bio Orbit Luminova Luminometry) bepaal, nadat die luminometer outomaties óf 60 μ l fMLP (F-met-leu-fe) óf 100 μ l ge-opsoneerde simosan in al die kuvette geplaas het. Die resultate is as relatiewe liggenehede (r.l.e.) uitgedruk.

Tydens elke sessie was daar ook 'n kontrole kuvet wat op dieselfde wyse as die proefkuvette behandel is, behalwe dat dit geen antagonist of agoniste ontvang het nie. Hierdie kuvet is as die basislyn gebruik.

5.2.2 RESULTATE

Die piek van die kurwes vir elke konsentrasie van die reagense is geneem en as 'n persentasie van die kontrole bereken. Die kontrole kuvet is dus geneem as 100. 'n Persentasie onder 100 verteenwoordig 'n inhibisie en bo 100 'n stimulasie. Die resultaat is uitgedruk as 'n gemiddelde met die standaardafwyking van 3 eksperimente. Die invloed van histamien (Ha), R- α -metielhistamien (Mh), simetidien (Sim), setirisien (Set) en tioperamied (Tio) op LuCl by MN leukosiete, word in tabel 5.1, 5.2 en 5.3, sowel as in figuur 5.1, 5.2 en 5.3 opgesom.

Tabel 5.1

Gemiddelde (\pm standaardafwyking) LuCl by MN leukosiete (gestimuleer met fMLP) onder die invloed van verskillende konsentrasies histamien en tioperamied.

Konsentrasie	Histamien alleen	Tioperamied (10^{-6} M) + Histamien
10^{-8} M	100.89 (4.8)	79.03 (30.14)
10^{-7} M	138.57 (50.0)	76.17 (12.34)
10^{-6} M	128.57 (0.00)	87.25 (2.85)
10^{-5} M	119.11 (43.18)	75.50 (0.95)
10^{-4} M	75.36 (2.02)	69.63 (9.25)
10^{-3} M	63.04 (1.26)	60.40 (0.00)
10^{-2} M	59.29 (0.51)	55.54 (4.98)

Tabel 5.2

Gemiddelde (\pm standaardafwyking) LuCl by MN leukosiete (gestimuleer met ge-opsoner simosan) onder die invloed van verskillende konsentrasies R- α -metielhistamien en tioperamied.

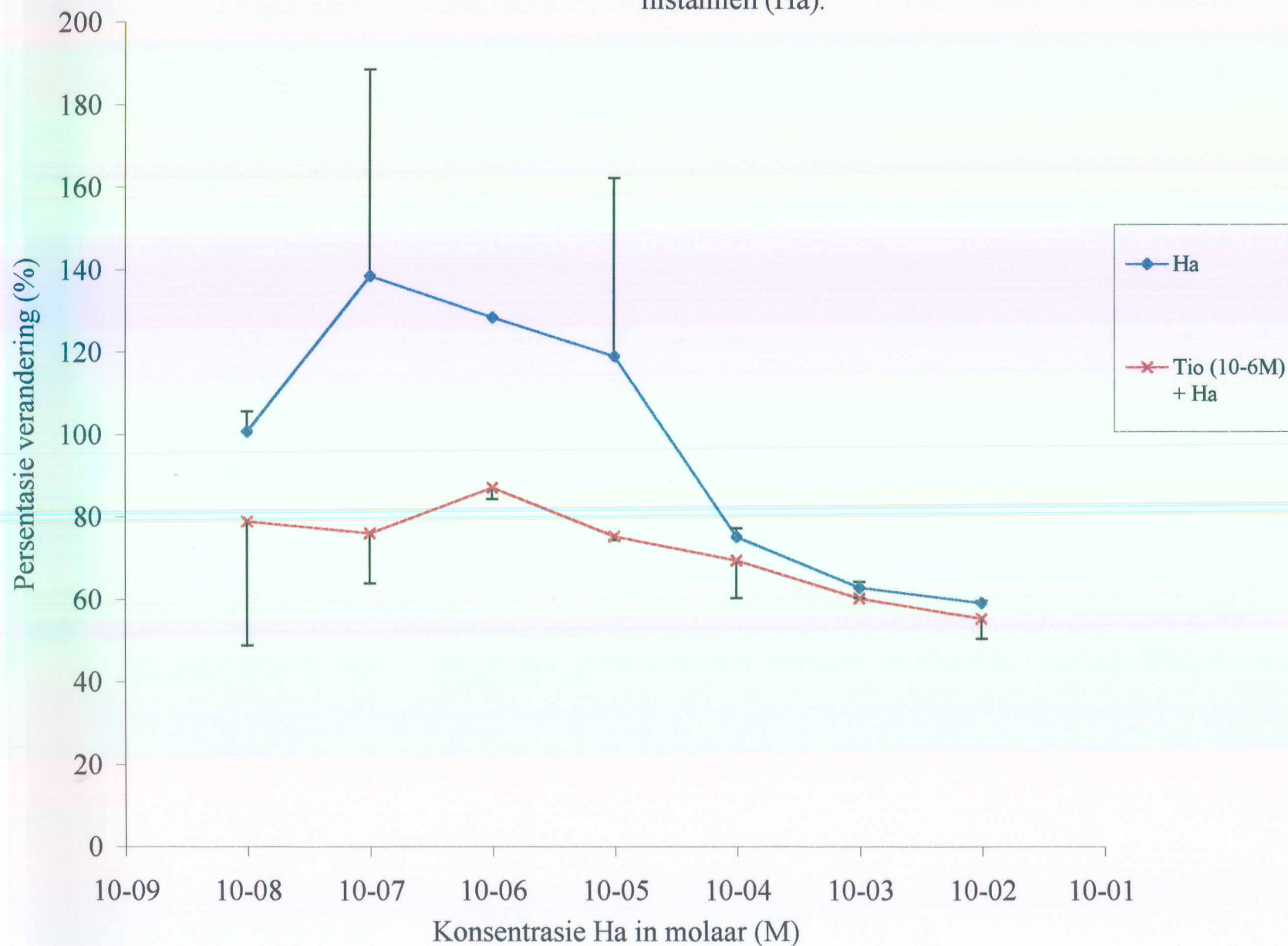
Konsentrasie	R- α -metielhistamien alleen	Tioperamied (10^{-6} M) + R- α -metielhistamien
10^{-9} M	58.94 (0.00)	69.55 (0.45)
10^{-8} M	61.66 (1.88)	66.67 (0.00)
10^{-7} M	54.64 (2.81)	64.78 (2.68)
10^{-6} M	47.48 (12.17)	64.26 (1.54)
10^{-5} M	49.97 (13.54)	55.00 (3.44)
10^{-4} M	50.30 (3.05)	53.72 (5.80)

Tabel 5.3

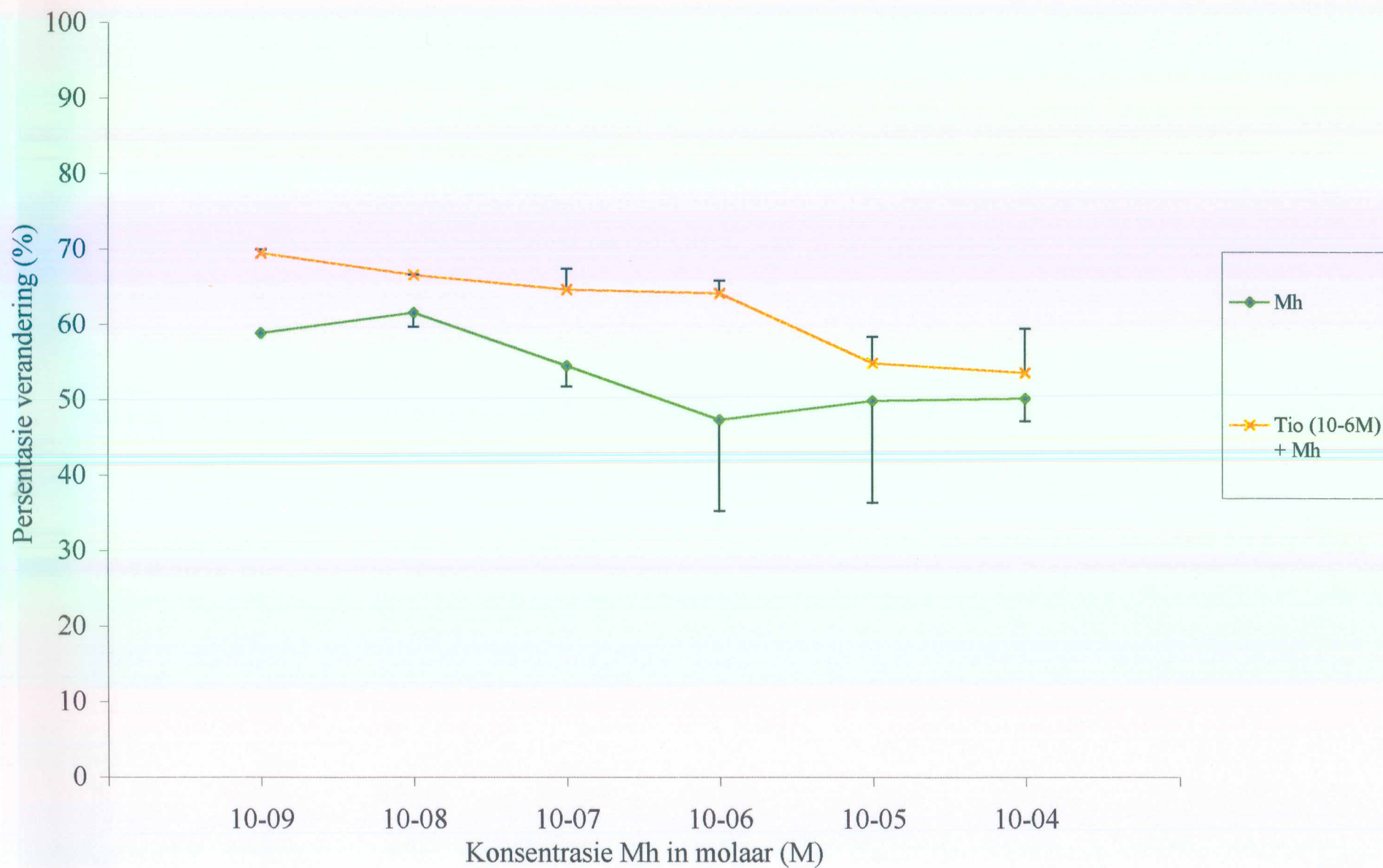
Gemiddelde (\pm standaardafwyking) LuCl by MN leukosiete (gestimuleer met ge-opsoneerde simosan) onder die invloed van verskillende konsentrasies setirisien (Set), simetidien (Sim), histamien en R- α -metielhistamien (Mh).

Konsentrasie	Set	Sim	Sim (10^{-7} M) + Set (10^{-4} M) + Histamien	Sim (10^{-7} M) + Set (10^{-4} M) + Mh
10^{-10} M		66.81 (6.67)		
10^{-9} M	96.67 (5.66)	99.05 (0.00)		48.08 (0.93)
10^{-8} M	89.00 (1.41)	110.00 (0.00)	57.97 (4.47)	41.32 (1.7)
10^{-7} M	90.67 (2.83)	121.90 (1.34)	58.72 (4.46)	41.95 (3.18)
10^{-6} M	82.67 (0.00)	118.57 (10.10)	58.76 (2.29)	40.12 (1.19)
10^{-5} M	85.00 (9.90)	108.79 (0.31)	57.18 (2.29)	39.91 (5.63)
10^{-4} M	77.33 (5.65)	104.76 (5.39)	56.17 (4.05)	40.21 (8.09)
10^{-3} M	59.03 (7.3)	89.10 (27.55)	59.06 (4.31)	
10^{-2} M	4.99 (0.03)		71.35 (1.59)	
10^{-1} M			69.55 (10.10)	

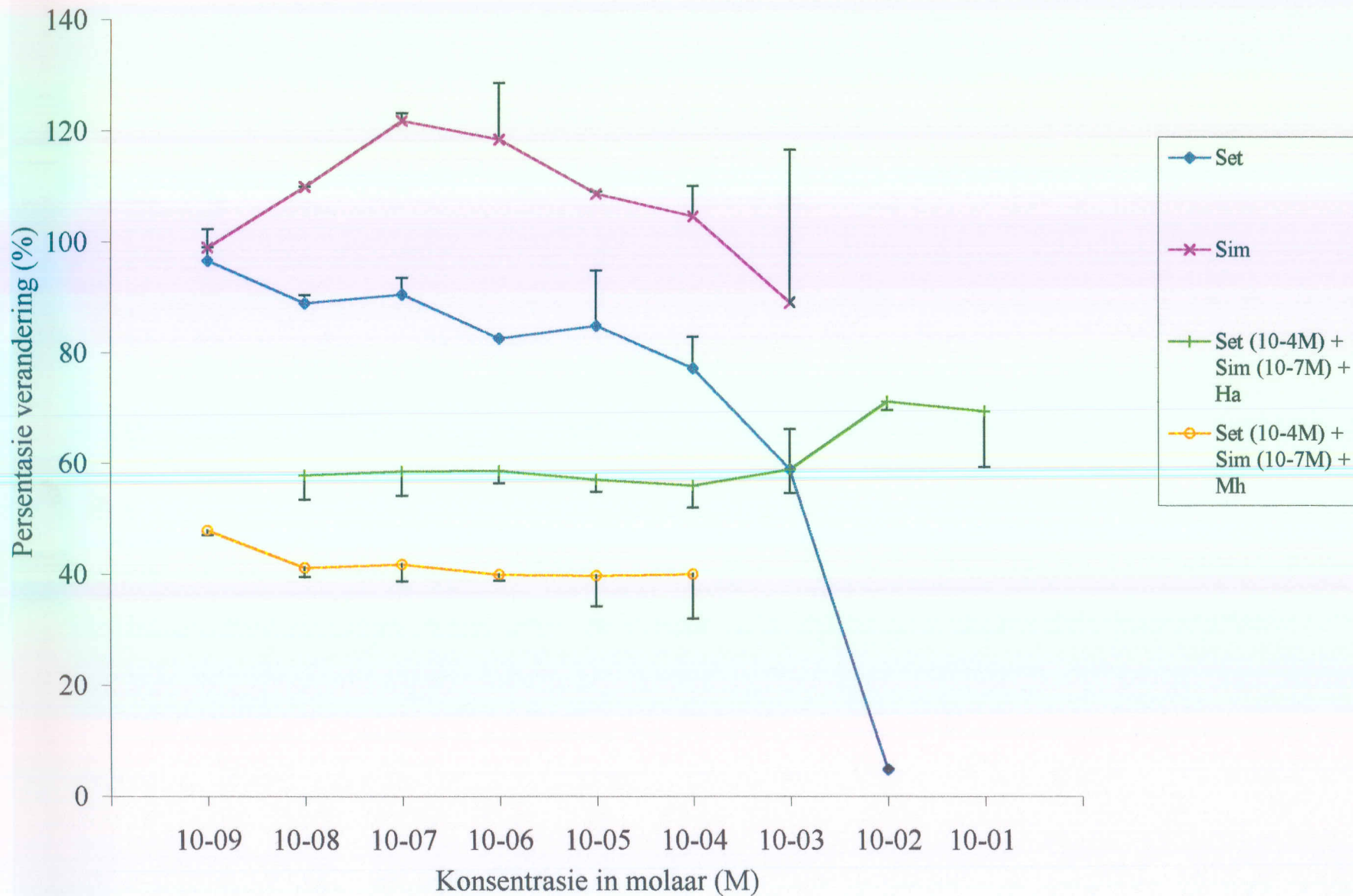
Figuur 5.1 Gemiddelde persentasie verandering (\pm sa) in LuCl vanaf kontrole, by fMLP gestimuleerde mononukleêre leukosiete, onder die invloed van tioperamied (Tio) en histamien (Ha).



Figuur 5.2 Gemiddelde persentasie verandering (\pm sa) in LuCl vanaf kontrole, in simosan gestimuleerde mononukleêre leukosiete, onder die invloed van tioperamied (Tio) en metielhistamien (Mh).



Figuur 5.3 Gemiddelde persentasie verandering (\pm sa) in LuCl vanaf kontrole, in simosan gestimuleerde mononukleêre leukosiete onder die invloed van setirisien (Set), simetidien (Sim), histamien (Ha) en R-metielhistamien (Mh).



Histamien by lae konsentrasies het LuCl gestimuleer, terwyl dit by hoër konsentrasies die LuCl geïnhibeer het. R- α -metielhistamien het op sy beurt 'n dosis afhanklike inhibisie van LuCl veroorsaak. Tioperamied het die dosis afhanklike kurwe na regs verskuif. Histamien het in die teenwoordigheid van simetidien (H₂-reseptorantagonis) plus setirisien (H₁-reseptorantagonis) die LuCl by al die konsentrasies geïnhibeer. Hierdie inhibisie was selfs meer uitgesproke wanneer die selektiewe H₃-reseptoragonis, R- α -metielhistamien na die H₁- en H₂-reseptorblokkers bygevoeg is.

5.2.3 BESPREKING

Mononukleêre (MN) leukosiete bestaan uit limfosiete en monosiete. Die verhouding van limfosiete tot monosiete is egter $\pm 10:1$. Die reaksie van MN leukosiete op reagense, kan dus in 'n groot mate toegeskryf word aan die reaksie van die limfosiete (142).

Tydens hierdie studie kan gesien word dat die H₃-reseptor die vrystelling van die vrysuurstof-radikale vanaf limfosiete beïnvloed. Dit is reeds bekend dat die H₃-reseptor op neurone gekoppel is aan 'n negatiewe terugvoersisteem, waar die stimulasie van die H₃-reseptor, die vrystelling van histamien (13) en ander neurotransmittore (33) verminder. In hierdie eksperiment het die H₃-reseptorstimulasie ook 'n inhibisie van MN leukosiet vrysuurstof-radikale produksie veroorsaak, waarskynlik deur 'n negatiewe terugvoersisteem. Hierdie inhibitoriese effek was omkeerbaar deur die H₃-reseptor blokkeerder, tioperamied.

Dit bevestig bevindinge deur ander outeurs wat ook die inhibitoriese effekte van die H₃-reseptor op leukosiete (124) gedemonstreer het, alhoewel dit nie selspesifiek was nie. H₂-reseptorblokkade deur lae konsentrasies simetidien het MN leukosiet stimulasie tot gevolg gehad, terwyl dit by hoër

konsentrasies 'n effense inhibisie tot gevolg gehad het. Die resultate is ook in ooreenstemming met vorige werk wat op H₂-reseptore op limfosiete gedoen is (15, 23, 134, 149). Verder het setirisien (H₁-reseptorantagonis) alleen, 'n inhibisie by baie hoë konsentrasies en 'n effense vermindering van MN leukosietaktiwiteit by al die ander konsentrasies veroorsaak. Die kombinasie van die H₁ en H₂-reseptor blokkade in die teenwoordigheid van histamien of R- α -metielhistamien, het 'n merkbare afname in die vrysuurstofradikaalproduksie veroorsaak, wat die feit ondersteun dat die H₃-reseptor gekoppel is aan 'n negatiewe terugvoersisteem.

Aangesien histamienreseptore nie lukraak versprei is op alle limfosietsubgroepe nie (15, 134) is dit nie moontlik om verder oor die presiese meganisme of Tsel-subtipes betrokke, uit te brei nie. Verder eksperimente word benodig om die tweede boodskappersisteem sowel as die verspreiding van die H₃-reseptore op limfosietsubgroepe te evalueer, asook die moontlike effekte of limfokiene te kwantifiseer.

Die gevolgtrekking is dus dat die stimulasie van die H₃-reseptore op limfosiete die vrystelling van die vrysuurstofradikale verminder en dat hierdie effek omkeerbaar is deur selektiewe H₃-reseptor antagoniste. Dit demonsteer die teenwoordigheid van die funksionele H₃-reseptore op limfosiete.

5.3 Polimorfonukleêre (PMN) leukosiete

5.3.1 METODE

Vorbereiding van suiwer PMN leukosiete:

Bloed is getrek in 3 of 4 heparienbuisies en daarna 1:1 verdun met FBS in 'n 50ml polipropileensentrifugeerbuis. Vyftien ml Ficoll (Histopaque - 1077, Sigma) is in 'n ander 50ml polipropileensentrifugeerbuis geplaas en die heelbloedmengsel is versigtig op die Ficoll geplaas sonder dat die twee lae

meng. Die buis is gesentrifugeer teen 2100opm (100g) vir 30 minute by 11°C. Na sentrifugasie, was die bloedkomponente en ficoll in verskillende lae geskei. Sien figuur 3.1. Die plasma bokant die limfosiete is afgetrek en gevries by -70°C vir toekomstige voorbereiding van ge-opsoneerde simosan. Die limfosiete is afgehaal met behulp van 'n pipet en weggegooi. Die granulosislagie net bokant die eritrosietlaag is afgehaal, tesame met ±3mm van die eritrosietlaag en in 'n derde 50ml buis geplaas. Die orige eritrosiete is weggegooi.

Die buis met die PMN leukosiete is as volg hanteer:

Die buis is gevul met liseer-oplossing en vir presies 5 minute op ys geplaas, sodat die eritrosiete kon liseer. Daarna is dit gesentrifugeer vir 10 minute teen 1000opm (224g) by 11°C. Die supernatant is weggegooi en die buis is weer met die liseer-oplossing opgevol. Dit is vir presies 2 minute op ys geplaas waarna dit vir 10 minute teen 1000opm (224g) by 11°C gesentrifugeer is.

Standaardisering van die PMN leukosietsuspensie:

Die selle is getel met behulp van witseltelvroeststof en 'n haemasitometer, en tot 'n konsentrasie van 2×10^5 selle / ml hersuspendeer.

Luminol-afhanklike-chemiluminessensie (LuCl):

Die MN leukosiet-mengsel sowel as die PMN leukosiet-mengsel is dieselfde hanteer. In al die kuvette is 100µl selle geplaas en 200µl Hanks oplossing is daarna by elke kuvet gevoeg. Hierna is 200µl luminol (5-amino-2, 3-dihidro-1,4,-phthalazinedioon, Sigma) in al die kuvette gegooi en vir 30 minute geïnkubeer. Die antagonist (tioperamied, setirisien, simetidien) is, waar nodig, bygevoeg en weer vir 30 minute geïnkubeer voordat die agoniste (histamien of R-α-metielhistamien) bygevoeg is. Spontane chemiluminessensie is met intervalle van 2 minute in 'n luminometer (Bio

Orbit Luminova Luminometry) bepaal, nadat daar outomaties óf 60µl fMLP (F-met-leu-fe) óf 100µl ge-opsoneerde simosan in al die kuvette geplaas is. Die resultate is as relatiewe liggenehede (r.l.e.) uitgedruk.

Tydens elke sessie was daar ook 'n kontrole kuvet wat dieselfde as die proefkuvette behandel behalwe dat dit nie antagonistiese of agonistiese ontvang het nie. Hierdie kuvet is as die basislyn gebruik.

5.3.2 RESULTATE

Die piek van die kurwes vir elke konsentrasie van die reagent, is as die persentasie van die kontrole bereken. Kontrole is dus geneem as 100 en 'n persentasie onder 100 verteenwoordig dus 'n inhibisie terwyl 'n persentasie bo 100 is dus 'n stimulasie verteenwoordig. Die resultaat is uitgedruk as 'n gemiddelde met die standaardafwyking van 3 eksperimente.

Die invloed van histamien (Ha), R- α -metielhistamien (Mh), simetidien (Sim), setirisien (Set) en tioperamied (Tio) op LuCl by PMN leukosiete, word in tabel 5.4, 5.5 en 5.6, sowel as in figuur 5.4, 5.5 en 5.6 opgesom.

Tabel 5.4

Gemiddelde (\pm standaardafwyking) LuCl by PMN leukosiete (gestimuleer met fMLP) onder die invloed van verskillende konsentrasies histamien en tioperamied.

Konsentrasie	Histamien alleen	Tioperamied (10^{-6} M) + Histamien
10^{-9} M	115.09 (9.04)	87.60 (4.98)
10^{-8} M	120.33 (16.10)	89.03 (8.12)
10^{-7} M	125.83 (10.13)	90.21 (1.29)
10^{-6} M	117.65 (14.11)	75.59 (9.42)
10^{-5} M	101.15 (1.99)	80.94 (0.37)
10^{-4} M	109.59 (2.71)	72.06 (1.48)
10^{-3} M	74.04 (2.35)	68.54 (1.29)
10^{-2} M	44.88 (6.69)	56.79 (4.25)

Tabel 5.5

Gemiddelde (\pm standaardafwyking) LuCl by PMN leukosiete (gestimuleer met fMLP) onder die invloed van verskillende konsentrasies R- α -metielhistamien en tioperamied.

Konsentrasie R- α -metielhistamien	R- α -metielhistamien alleen	Tioperamied (10^{-6} M) + R- α -metielhistamien
gebruik		
10^{-12} M	76.39 (6.16)	81.93 (2.56)
10^{-11} M	70.05 (0.19)	74.4 (2.13)
10^{-10} M	68.87 (0.37)	73.8 (0.43)
10^{-9} M	67.68 (6.16)	83.13 (2.56)
10^{-8} M	64.12 (3.73)	80.42 (3.83)
10^{-7} M	72.3 (8.21)	79.52 (1.70)
10^{-6} M	66.89 (2.80)	77.41 (4.69)
10^{-5} M	63.72 (4.29)	56.99 (0.09)

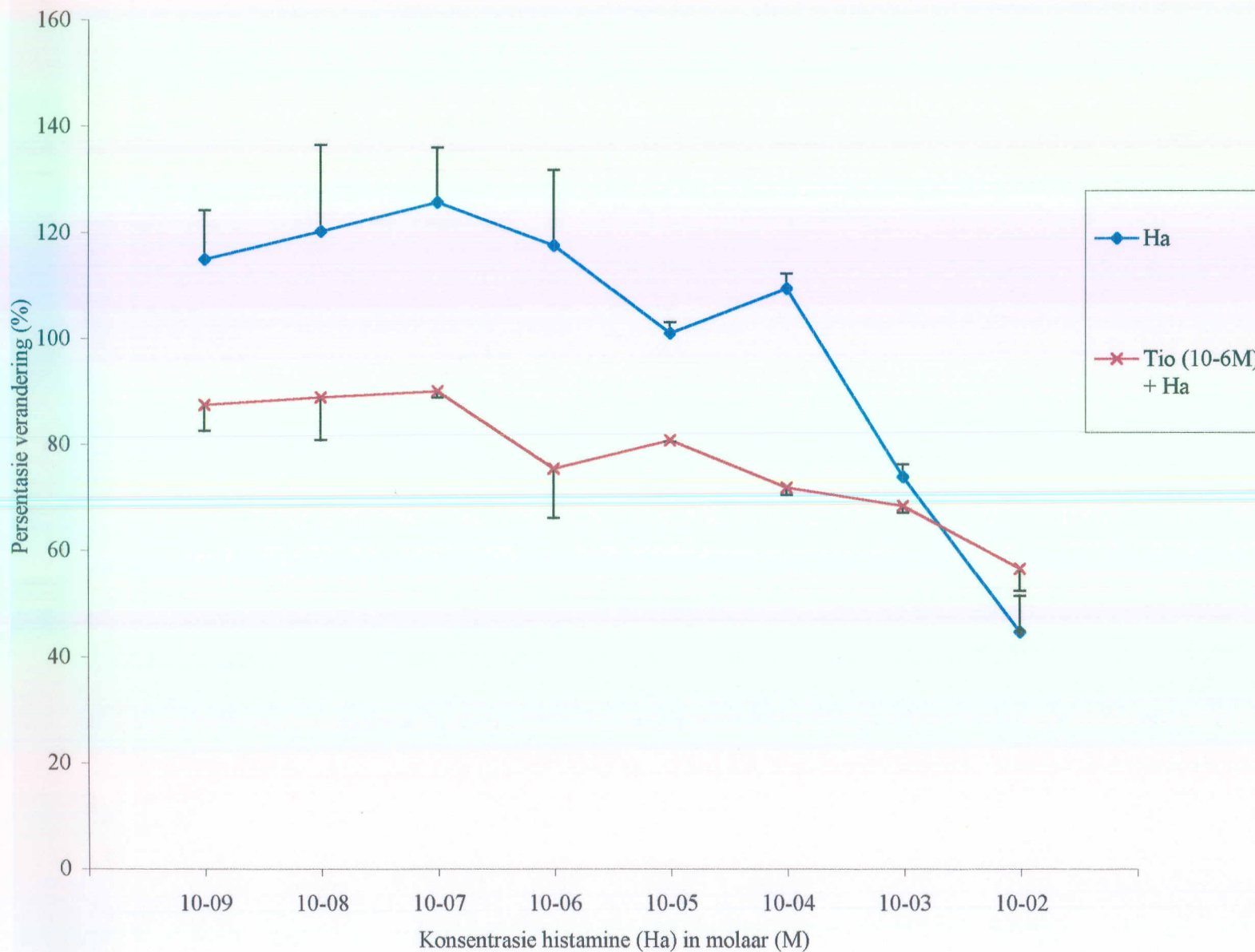
Tabel 5.6

Gemiddelde (\pm standaardafwyking) LuCl by PMN leukosiete (gestimuleer met ge-opsoneerde simosan) onder die invloed van verskillende konsentrasies setirisien (Set), simetidien (Sim), histamien en R- α -metielhistamien (Mh).

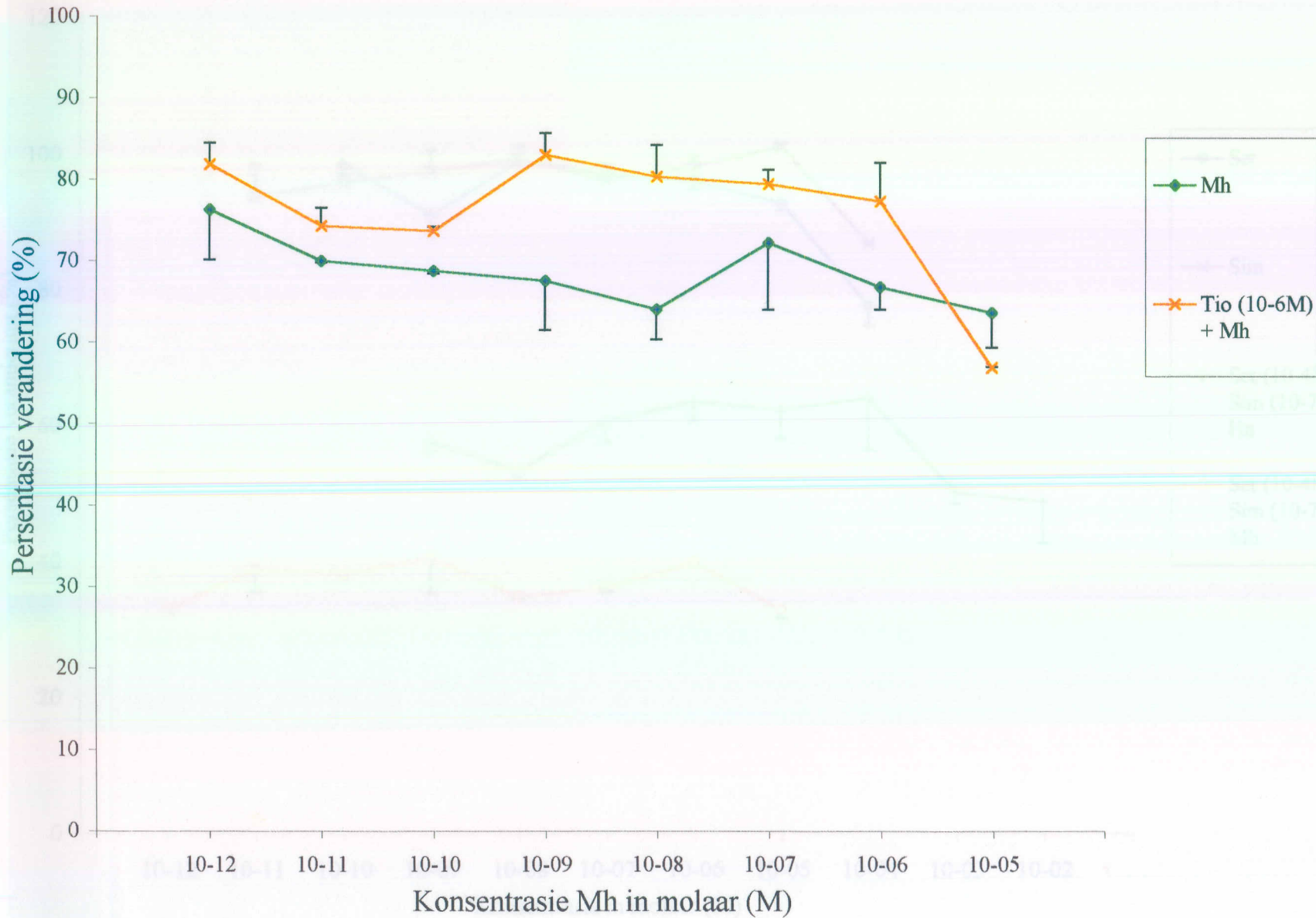
Konsentrasie	Set	Sim	Sim (10^{-7} M) + Set (10^{-4} M) + Histamien	Sim (10^{-7} M) + Set (10^{-4} M) + Mh
10^{-12} M				33.26 (0.66)
10^{-11} M		93.92 (4.45)		39.03 (3.380)
10^{-10} M	98.56 (2.04)	95.81 (0.89)		38.39 (0.50)
10^{-9} M	91.06 (3.26)	97.48 (2.96)	57.63 (1.35)	40.72 (5.28)
10^{-8} M	99.04 (0.0)	99.37 (1.78)	53.47 (1.06)	35.01 (0.50)
10^{-7} M	97.12 (0.0)	96.23 (2.37)	60.83 (3.18)	36.35 (0.74)
10^{-6} M	96.15 (1.36)	98.22 (1.33)	63.62 (2.89)	39.96 (0.25)
10^{-5} M	92.88 (1.09)	101.15 (0.44)	62.4 (4.24)	33.02 (1.32)
10^{-4} M	77.74 (3.06)	87.00 (0.0)	64.17 (7.71)	
10^{-3} M			50.27 (1.73)	
10^{-2} M			48.91 (6.17)	



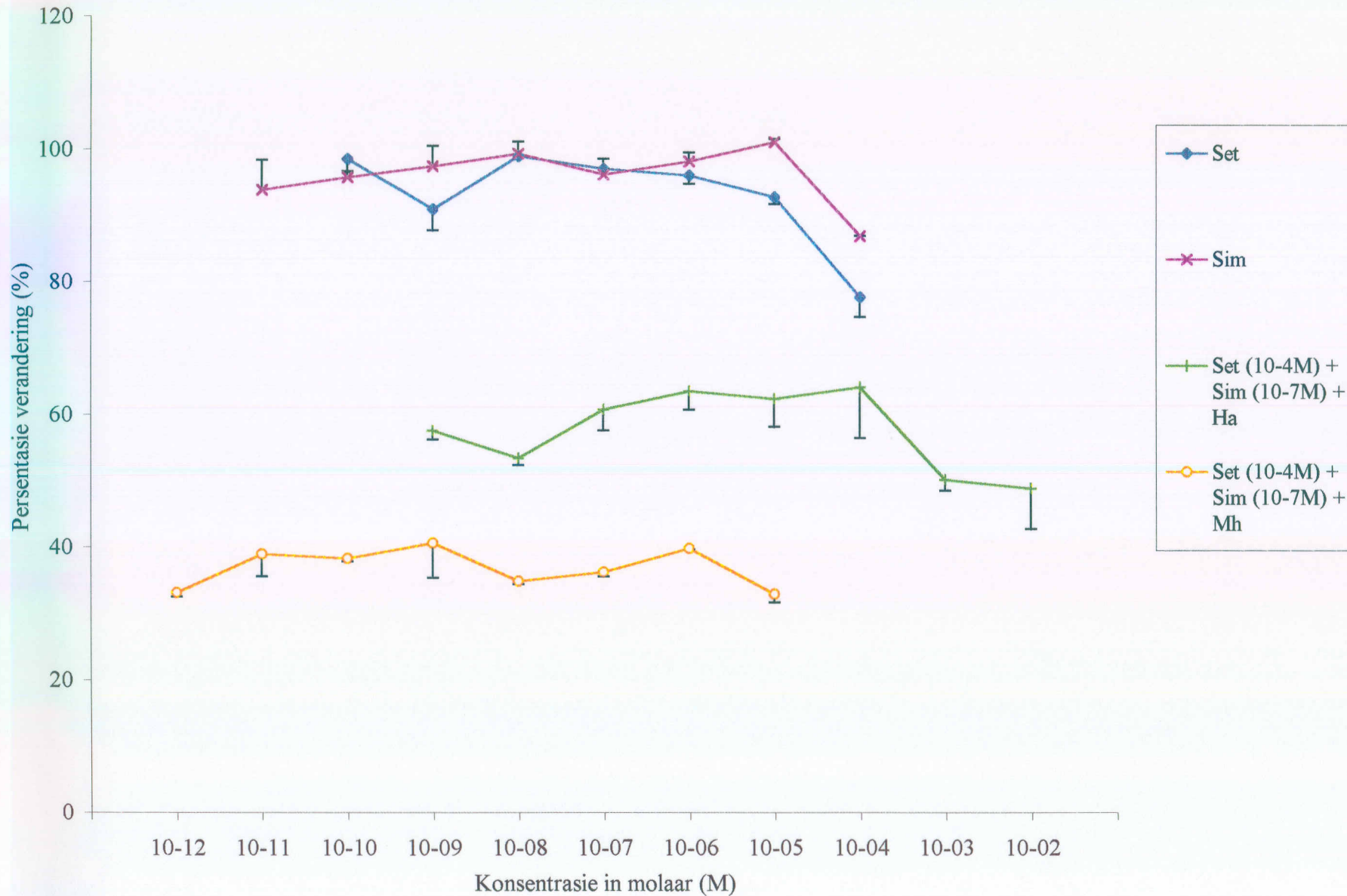
Figuur 5.4 Gemiddelde persentasie verandering (\pm sa) in LuCl vanaf kontrole, in fMLP gestimuleerde polimorfonukleêre leukosiete, onder die invloed van verskillende konsentrasies histamien (Ha) en tioperamied (Tio).



Figuur 5.5 Gemiddelde persentasie verandering (\pm sa) in LuCl vanaf kontrole, in fMLP gestimuleerde polimorfonukleêre leukosiete, onder die invloed van R-metielhistamien (Mh) en tioperamied (Tio).



Figuur 5.6 Gemiddelde persentasie verandering (\pm sa) in LuCl vanaf kontrole, in simosan gestimuleerde polimorfonukleêre leukosiete onder die invloed van simetidien (Sim), setirisien (Set), histamien (Ha) en R-metielhistamien (Mh).



Histamien het tussen die konsentrasie grense van 10^{-4} en 10^{-9} M, LuCl gestimuleer, terwyl dit by hoë konsentrasies (10^{-3} tot 10^{-2} M) LuCl geïnhibeer het. Die byvoeging van tioperamied voor dat die histamien bygevoeg is, veroorsaak nie net 'n opheffing van die stimulasie nie maar ook 'n verdere onderdrukking. R- α -metielhistamien het LuCl geïnhibeer en 'n byvoeging van tioperamied voordat die R- α -metielhistamien bygevoeg is, veroorsaak dat die kurwe na regs verskuif. Die tioperamied het dus die R- α -metielhistamien se onderdrukkende effek op.

Histamien het in die teenwoordigheid van simetidien plus setirisien LuCl geïnhibeer. Die inhibisie was selfs meer uitgespreek toe R- α -metielhistamien in die teenwoordigheid van simetidien en setirisien toegedien is.

5.3.3 BESPREKING

Polimorfonukleêre (PMN) leukosiete bestaan uit tussen 50-70% neutrofiel (142). Die reaksie van die PMN leukosiete op reagense kan dus in 'n groot mate aan die reaksie van die neutrofiel toegeskryf word.

In vorige proewe is dit bewys dat histamien superoksied vorming in menslike neutrofiel deur middel van die H_2 -reseptor, inhibeer (150). In hierdie eksperimente is die teoorgestelde egter gevind, naamlik dat histamien by die konsentrasies van 10^{-4} tot 10^{-9} M, LuCl stimuleer.

Bogenoemde resultate dui duidelik op die teenwoordigheid van die H_3 -reseptor op hierdie selle. By die eksperiment waar tioperamied net voor die histamien toegedien is, word die H_3 -reseptor geblok terwyl H_1 - en H_2 -reseptor stimulasie nog plaasvind. Die H_1 -reseptor effekte op neutrofiel is nog nie opgeklaar nie en verklaar waarskynlik die teenstrydige resultate.

Dit is reeds al bewys dat die H₃-reseptor gekoppel word aan 'n negatiewe terugvoersisteem, deurdat die vrystelling van neurotransmittore geïnhibeer word wanneer die H₃-reseptor gestimuleer word (33). In hierdie proewe het R- α -metielhistamien 'n inhibisie van LuCl veroorsaak, ook waarskynlik deur 'n negatiewe terugvoersisteem, en die inhibitoriese effek was omkeerbaar met tioperamied. Ook die kombinasie van simetidien en setirisien in die teenwoordigheid van histamien of R- α -metielhistamien, het 'n merkbare afname in die vrysuurstof-radikaal produksie veroorsaak.

Die gevolgtrekking is dus dat die stimulasie van die H₃-reseptor op neutrofiele die vrystelling van vrysuurstofradikale verminder en dus 'n inhibitoriese effek het op neutrofiele. Hierdie effek was omkeerbaar met die selektiewe H₃-reseptor antagonis, tioperamied en dit demonsteer die teenwoordigheid van die funksionele H₃ reseptor op neutrofiele.

HOOFSTUK 6

GEVOLGTREKKING

Tydens die agtergrondstudie het sekere aspekte van die H₃-reseptor na vore gekom. Een daarvan was dat die H₃-reseptor veranderinge in gemengde leukosietpopulasies veroorsaak (124). Dit is ook reeds bewys dat histamien reseptore nie lukraak op limfosiete (15, 134), sowel as limfosiet subgroepe voorkom nie (103). Dit is ook duidelik dat die H₃-reseptor nie lukraak by die meeste weefseltipes betrokke is nie. Hierdie feite en ook die feit dat die H₁- en H₂-reseptore nie verantwoordelik is vir al die effekte van histamien nie, het gelei tot sekere onbeantwoorde vrae. In 'n poging om hierdie vrae te beantwoord is onderskeie eksperimente onderneem.

Proewe wat met behulp van die MTT-metode gedoen is, het werk deur vorige outeurs bevestig, naamlik dat histamien reseptore betrokke is by die proliferasie van limfosiete. Omdat dit reeds voorheen bewys is dat die H₃-reseptor aan 'n negatiewe terugvoersistiem gekoppel is (13), is daar egter verwag dat die stimulasie van die H₃-reseptor 'n inhibisie van proliferasie kon veroorsaak. In sommige van die huidige eksperimente is daar soms die teenoorgestelde gevind afhangende van die konsentrasie R- α -metielhistamien en die kombinasie met H₁- en H₂-reseptor antagoniste. Oorwegend het H₃-reseptor stimulasie egter tot 'n inhibisie van selproliferasie en vrysuurstof-radikaal produksie gelei.

Die proewe wat gedoen is met behulp van die radioaktiewe timidien om limfosiettransformasies te bepaal, het weer eens bevestig dat histamien die proliferasie van limfosiete stimuleer. Die stimulasie wat deur histamien veroorsaak is, is nie net opgehef deur die H₃-reseptor antagonist tioperamied nie, maar tioperamied het selfs die limfosiettransformasies verder geïnhibeer.

Dit wys op 'n toniese effek wat histamien op die proliferasie van limfosiete het. Hierdie toniese effek van histamien is reeds voorheen deur ander outeurs bewys (7, 42).

Die H₃-reseptor agonis, R- α -metielhistamien het by baie lae konsentrasies die proliferasie van limfosiete gestimuleer, terwyl hoër konsentrasies die proliferasie geïnhibeer het. Tioperamied in die teenwoordigheid van R- α -metielhistamien by hierdie hoër konsentrasies, het 'n additiewe effek op die onderdrukking gehad. Bogenoemde het ons tot die gevolgtrekking laat kom dat tioperamied moontlik 'n gedeeltelike agonis is.

Die stimulasie van die H₃-reseptor het dus in hierdie geval, anders as by die MTT proewe, 'n volgehoue inhibisie veroorsaak wat dui op 'n inhibitoriese effek van die H₃-reseptor op limfosiete.

Luminol-afhanklike-chemiluminessensie (LuCl) is 'n sensitiewe tegniek om die vrystelling van suurstofradikale, en dus ook die mate van aktivering van selle, te bepaal (143). Eksperimente wat gedoen is met behulp van hierdie metode, het bewys dat die H₃-reseptor die vrystelling van vrysuurstof-radikale vanaf limfosiete beïnvloed. Daar is gevind dat die stimulasie van die H₃-reseptor inhibisie van limfosiet vrysuurstof-radikaal produksie veroorsaak, vermoedelik deur 'n negatiewe terugvoersisteem. Hierdie inhibitoriese effek was soms omkeerbaar deur die H₃-reseptor blokker tioperamied. Dit bevestig bevindinge deur ander outeurs wat ook die inhibitoriese effekte van die H₃-reseptor gedemonsteer het. Wanneer 'n kombinasie van H₁- en H₂- reseptor blokkers in die teenwoordigheid van histamien of R- α -metielhistamien gebruik is, is 'n merkbare afname in vrysuurstof-radikale waargeneem, wat weer eens die feit ondersteun dat die H₃-reseptor aan 'n negatiewe terugvoersisteem gekoppel is.

Met die gebruik van dieselfde metode, is by neutrofiele gevind dat histamien by konsentrasies van 10^{-4} tot 10^{-9} M superoksied vorming stimuleer. Dit was in teenstelling met vorige bevindinge deur ander outeurs (150). In hierdie proewe is gevind dat R- α -metielhistamien 'n inhibisie van die vrystelling van vrysuurstof-radikale veroorsaak en hierdie inhibitiese effek was omkeerbaar met tioperamied. Die gevolgtrekking kan gemaak word dat die H₃-reseptor wel voorkom op neutrofiele en dat die H₃-reseptor hier gekoppel is aan 'n negatiewe terugvoersisteem.

Volgens die verskillende eksperimente uitgevoer, is dit dus duidelik dat die H₃-reseptor dus op limfosiete sowel as neutrofiele voorkom. Of die H₃-reseptor op alle limfosiet subgroepe wel aan 'n negatiewe terugvoersisteem gekoppel is, is nog onduidelik. In 1987 het Melmon die gebrek aan eenstemmingheid aan die teenwoordigheid van heterogene populasies toegeskryf. Die populasies het waarskynlik ander selle as T-selle nl. B-selle en of monosiete met histamien reseptore bevat (15). Dit is dus nodig om die subgroepe van limfosiete, nl. perifere limfosiethelper- (Th), sitolitiese- (Tc) die onderdrukker- (Ts) selle van mekaar te skei en die eksperimente te herhaal om te sien presies op watter limfosietfraksie die H₃-reseptor voorkom en of dit gekoppel is aan 'n negatiewe terugvoersisteem.

HOOFSTUK 7

BIBLIOGRAFIE

- 1 Beaven M.A. Factors regulating availability of histamine at tissue receptors. In: Pharmacology of histamine receptors. Ganellin C.R., Parsons M.E. Eds. Bristol, England: Wright. 1982; pp103-145.
- 2 Graham H.T., Lowry O.H., Wheelwright F., Lenz M.A. Distribution of histamine among leukocytes and platelets. *Blood* 1955; 10: 467-481.
- 3 Saxena S.P., Brandes L.J., Becker A.B., Simons K.J., Labella F.S., Gerrard J.M. Histamine is an intracellular messenger mediating platelet aggregation. *Science* 1989; 243: 1596-1599.
- 4 Soll A.H., Lewin K.J., Beavan M.A. Isolation of histamine-containing cells from rat gastric mucosa: biochemical and morphological difference from the mast cell. *Gastroenterology* 1981; 80: 717-727.
- 5 Karnushina I.L., Palacois J.M., Barbin G., Dux E., Joo F., Schwartz J.C. Studies on capillary-rich fraction isolated from brain: histamine components and characterization of histamine receptors linked to adenylate cyclase. *J. Neurochem.* 1980; 34(5): 1201-1208.
- 6 Kahlson G., Rosengren E. New approaches to the physiology of histamine. *Physiol. Rev.* 1968; 48: 155-196

- 7 Hill S.J. Histamine receptors branch out. *Nature* 1987; 327: 104-105.
- 8 Ishikawa E., Toki A., Moriyama T., Matsuoka Y., Aikawa T., Suda M.J. A study on the induction of histidine decarboxylase in tumour-bearing rat. *J. Biochem.* 1970; 68: 347-358.
- 9 Watanabe T., Taguchi Y., Sasaki K., Tsuyama K., Kitamura Y. Increase in histidine decarboxylase activity in mouse skin after application of the tumor promoter tetradecanoylphorbol acetate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981; 100(1): 427-432.
- 10 Bartholeyns J., Fozars J.R. Role of histamine in tumor development. *Trends Pharmacol. Sci.* 1985; 6: 123-125.
- 11 Ash A.S.F., Schild H.O. Receptors mediating some actions of histamine. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 1966; 27: 427-439.
- 12 Black J.W., Duncan W.A.M., Durant C.J., Ganellin C.R., Parsons E.M. Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. *Nature* 1972; 236: 385-390.
- 13 Arrang J.M., Garbarg M., Schwartz J.C. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H₃) of histamine receptor. *Nature* 1983; 302: 832-837.
- 14 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: 588-590.

- 15 Melmon K.L., Khan M.M. Histamine and its lymphocyte-selective derivatives as immune modulators. *Trends Pharmacol. Sci.* 1987; 8: 437-441.
- 16 Florio C., Flezar M., Martin J.G., Heisler S. Identification of adenylyate cyclase-coupled histamine H₂ receptors in guinea pig tracheal smooth muscle cells in culture and the effect of dexamethasone. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1992; 7(6): 582-589.
- 17 Hill S.J. Distribution, properties and functional characteristics of three classes of histamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 1990; 42(1): 45-83.
- 18 Adeagbo A.S., Oriowo M.A. Histamine receptor subtypes mediating hyperpolarization in the isolated, perfused rat mesenteric pre-arteriolar bed. *Eur. J. Pharmacol.* 1998; 347: 237-244.
- 19 Beyak M., Vanner S. Histamine H₁ and H₃ vasodilator mechanisms in the guinea pig ileum. *Gastroenterology* 1995;108(3): 712-718.
- 20 Johnson C.L. Histamine receptors and cyclic nucleotides. In: *Pharmacology of histamine receptors.* Ganellin C.R., Parsons M.E. Eds. Bristol, England: Wright. 1982; pp146-216.
- 21 Soll A.H., Berglindh T. Physiology of the isolated gastric glands and the parietal cells: receptors and effectors regulating function. *Physiology of the Gastrointestinal Tract.* Johnson L,R. Ed. New York: Raven Press 1987; pp883-909.

- 22 Foreman J.C., Rising T.J., Webber S.E. A study of the histamine H₂-receptor mediating relaxation of the parenchymal lung strip preparation of the guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.* 1985; 86: 465-473.
- 23 Khan M.M., Melmon K.L. Histamine and its congener derivatives as immune modulators. *New Perspectives in Histamine research.* 1991; AAS 33: 365-379.
- 24 Clark R.A.F., Sandler J.A., Gallin J.I., Kaplan A.P. Histamine modulation of eosinophil migration. *J. Immunol.* 1977; 118: 137-145.
- 25 Fredholm B.B., Dunwiddie T.V. How does adenosine inhibit transmitter release? *Trends Pharmacol. Sci.* 1988; 9: 130-134.
- 26 Garbarg M., Trung Tong M.D., Gros C., Schwartz J.C. Effects of histamine H₃-receptor ligands on various biochemical indices of histaminergic neuron activity in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 1989; 164: 1-11.
- 27 Clark E.A., Hill S.J. Differential effect of sodium ions and guanine nucleotides on the binding of thioperamide and clobenpropit to histamine H₃-receptors in rat cerebral cortical membranes. *Br. J. Pharmacol.* 1995; 114(2): 357-362.

- 28 Zweig A., Siegel M.I., Egan R.W., Clark M.A., Shorr R.G., West R.E. Characterization of a digitonin-solubilized bovine brain H3 histamine receptor coupled to a guanine nucleotide-binding protein. *J. Neurochem.* 1992; 59(5): 1661-1666.
- 29 Endou M., Poli E., Levi R. Histamine H3-receptor signaling in the heart: possible involvement of Gi/Go proteins and N-type Ca⁺⁺ channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994; 269(1): 221-229.
- 30 Schwartz J.C., Arrang J.M., Garbarg M., Pollard H. Plenary lecture. A third histamine receptor subtype: characterization, localisation and functions of the H3-receptor. *Agents. Actions* 1990; 30(1-2): 13-23.
- 31 Hill S.J. Multiple histamine receptors: properties and functional characteristics. *Biochem. Soc. Trans.* 1992; 20(1): 122-125.
- 32 Ligneau X., Garbarg M., Vizuite M.L., Diaz J., Purand K., Stark H., Schunack W., Schwartz J.C. [125I]iodoproxyfan, a new antagonist to label and visualise cerebral histamine H3 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994; 271(1): 452-459.
- 33 Schlicker E., Malinowska B., Kathmann M., Gothert M. Modulation of neurotransmitter release via histamine H3 heteroreceptors. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1994b; 8(2): 128-37.
- 34 Clark M.A., Korte A., Egan R.W. Guanine nucleotides and pertussis toxin reduce the affinity of histamine H3 receptors on AtT-20 cells. *Agents. Actions* 1993; 40(3-4):129-134.

- 35 Luo X.X., Song L., Jiang Y.P., Tan Y.H. Inhibition of sympathetic neurotransmission via NEM-sensitive H3-receptors in the guinea pig vas deferens. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 1994b; 16(3): 185-189.
- 36 Cheriffi Y., Pigeon C., Le Romancer M., Bado A. Purification of a histamine H3 receptor negatively coupled to phosphoinositide turnover in the human gastric cell line HGT1. *J. Biol. Chem.* 1992; 267(35): 25315-25320.
- 37 Arrang J.M., Garbarg M., Schwartz J.C. Autoregulation of histamine release in brain by presynaptic H3-receptors. *Neuroscience* 1985b;15(2): 553-562.
- 38 Poli E., Todorov S., Pozzoli C., Bertaccini G. Presynaptic histamine H2 receptors modulate the sympathetic nerve transmission in the isolated rat vas deference; no role for H3 receptors. *Agents. Actions* 1994; 42(3-4); 95-100.
- 39 Sakai N., Sakurai A., Sakurai E., Yanai K., Maeyama K., Watanabe T. Effects of the histamine H3 receptor ligands thioperamide and (R)-alpha-methylhistmine on histidine decarboxylase activity of mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 185(1): 121-126.
- 40 Van der Werf J.F., Timmerman H. The histamine H3 receptor: a general presynaptic histaminergic regulatory system? *Trends Pharmacol. Sci.* 1989; 10(4): 159-162.

- 41 Arrang J.M., Garbarg M., Schwartz J.C. Auto-inhibition of histamine synthesis mediated by presynaptic H₃-receptors. *Neuroscience* 1987b; 23: 149-157.
- 42 Arrang J.M., Garbarg M., Lancelot J.C., Lecomte J.M., Pollard H., Robba M., Schunack W., Schwartz J.C. Highly potent and selective ligands for histamine H₃-receptors. *Nature* 1987a; 327(6118): 117-123.
- 43 Trzeciakowski J.P. Inhibition of guinea-pig ileum contractions mediated by a class of histamine receptor resembling the H₃ subtype. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1987; 243(3): 874-880.
- 44 Burgaud J.L., Javellaud J., Oudart N. Bronchodilator action of an agonist for histamine H₃ receptors in guinea pig perfused bronchioles and lung parenchymal strips. *Lung* 1992; 170(2): 95-108.
- 45 Ishikawa S., Sperelakis N. A Novel class (H₃) of histamine receptors on perivascular nerve terminals. *Nature* 1987; 327: 158-160.
- 46 Cumming P., Gjedde A., Vincent S. Histamine H₃ binding sites in rat brain: localization in the nucleus of the solitary tract. *Brain Research* 1994; 641(2): 198-202.
- 47 Hollande F., Bali J.P., Magous R. Autoregulation of histamine synthesis through H₃ receptors in isolated fundic mucosal cells. *Am. J. Physiol.* 1993; 265(6Pt1): G1039-1044.

- 48 Koss M.C., Hey J.A. Prejunctional inhibition of sympathetic evoked pupillary dilation in cats by activation of histamine H₃ receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1993; 348(2): 141-145.
- 49 Molderings G.J., Weissenborn G., Schlicker E., Likungu J., Gothert M. Inhibition of noradrenaline release from the sympathetic nerves of the human saphenous vein by presynaptic histamine H₃ receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1992; 346(1): 46-50.
- 50 Oike M., Kitamura K., Kuriyama H. Histamine H₃-receptor activation augments voltage-dependent Ca²⁺ current via GTP hydrolysis in rabbit saphenous artery. *J. Physiol.* 1992;448: 133-152.
- 51 Malinowska B., Godlewski G., Schlicker E. Histamine H₃ receptor—general characterization and their function in the cardiovascular system. *J. Physiol. Pharmacol.* 1998; 49(2): 191-211.
- 52 Schlicker E., Fink K., Detzner M., Gothert M. Histamine inhibits dopamine release in the mouse striatum via presynaptic H₃ receptors. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* 1993; 93: 1-10.
- 53 Schlicker E., Behling A., Lummen G., Gothert M. Histamine H_{3A} receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the mouse brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1992; 345(4): 489-493.

- 54 Smit J., Coppes R.P., Van Tintelen E.J., Roffel A.F., Zaagma J. Prejunctional histamine receptors inhibit electrically evoked endogenous noradrenaline overflow in the portal vein of freely moving rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1997; 355(2): 256-60.
- 55 Li X., Eschun G., Bose D., Jacobs H., Yang J.J., Light R.B., Mink S.N. Histamine H3 activation depresses cardiac function in experimental sepsis. *J. Appl. Physiol.* 1998; 85(5): 1693-1701.
- 56 Clapham J., Kilpatrick G.J. Histamine H3 receptors modulate the release of [3H]-acetylcholine from slices of rat entorhinal cortex: evidence for the possible existence of H3 receptors subtypes. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 107(4): 919-923.
- 57 Arrang J.M., Drutel G., Schwartz J.C. Characterization of histamine H3 receptors regulating acetylcholine release in rat entorhinal cortex. *Br. J. Pharmacol.* 1995; 114: 1518-22.
- 58 Navarro C.E., Otoyá R., Donoso A.O. Stimulation of H3-histamine receptors increases the release of prolactin in male rats. *Neuroendocrinology* 1993; 57(4): 654-657.
- 59 Clark M.A., Korte A., Myers J., Egan R.W. High affinity histamine H3 receptors regulate ACTH release by AtT-20 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 1992; 210(1): 31-35.

- 60 Soe-Jensen P., Knigge U., Garbarg M., Kjaer A., Rouleau A., Bach F.W., Schwartz J.C., Warbarg J. Responses of anterior pituitary hormones and hypothalamic histamine to blockade of histamine synthesis and to selective activation or inactivation of presynaptic histamine H3 receptors in stressed rats. *Neuroendocrinology* 1993; 57(3): 532-540.
- 61 Christiaan E.P., Weinreich D. Presynaptic histamine H1 and H3 receptors modulate sympathetic ganglionic synaptic transmission in the guinea-pig. *J. Physiol.* 1992; 457: 407-430.
- 62 Ohkubo T., Shibata M. ATP-sensitive K⁺ channels mediate regulation of substance P release via the prejunctional histamine H3 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 1995b; 277(1): 45-49.
- 63 Ea-Kim L., Oudart N. A highly potent and selective H3 agonist relaxes rabbit middle cerebral artery, *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.* 1988; 150: 393-396.
- 64 Ea-Kim L., Javellaud J., Oudart N. Endothelium-dependent relaxation of rabbit middle cerebral artery to a histamine H3-agonist is reduced by inhibitors of nitric oxide and prostacyclin synthesis. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 105(1): 103-106.
- 65 Kjaer A., Knigge U., Rouleau A., Garbarg M., Warberg J. Dehydration-induced release of vasopressin involves activation of hypothalamic histaminergic neurons. *Endocrinology* 1994; 135(2): 675-681.

- 66 McLeod R.L., Gertner S.B., Hey J.A. Production by R-alpha-methylhistamine of a histamine H3 receptor-mediated decrease in basal vascular resistance in guinea pigs. *Br. J. Pharmacol.* 1993; 110(2): 553-558.
- 67 McLeod R.L., Gertner S.B., Hey J.A. Hemodynamic profile of activation of histamine H3 receptors by R-alpha-methylhistamine in the guinea pig. *Gen. Pharmacol.* 1996; 27(6): 1001-1007.
- 68 Imamura M., Seyedi N., Lander H.M., Levi R. Functional identification of histamine H3-receptors in the human heart. *Circ. Res.* 1995; 77(1): 206-210.
- 69 Chrusch C., Sharma S., Unruh H., Bautista E., Duke K., Becker A., Kepron W., Mink S.N. Histamine H3 receptor blockade improves cardiac function in canine anaphylaxis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999; 160(4): 1142-1149.
- 70 Godlewski G. Malinowska B. Buczko W. Schlicker E. Inhibitory H3 receptors on sympathetic nerves of the pithed rat: activation by endogenous histamine and operation in spontaneously hypertensive rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol* 1997; 355(2): 261-266.
- 71 Cardell L.O., Edvinsson L. Characterization of the histamine receptors in the guinea-pig lung: evidence for relaxant histamine H3 receptors in the trachea. *Br. J. Pharmacol.* 1994; 111(2): 445-454.

- 72 Ichinose M., Stretton C.D., Schwartz J.C., Barnes P.J. Histamine H₃-receptors inhibit cholinergic neurotransmission in guinea-pig airways. *Br. J. Pharmacol.* 1989b; 97: 13-15.
- 73 Burgaud J.L., Oudart N. Effect of an histaminergic H₃ agonist on the non-adrenergic non-cholinergic contraction in guinea pig perfused bronchioles. *J. Pharm. Pharmacol.* 1993b; 45 (11): 955-958.
- 74 Burgaud J.L., Oudart N. NG-nitro-L-arginine methyl ester inhibits the effect of an H₃- histaminergic receptor agonist on NANC contraction in guinea-pig perfused bronchioles. *J. Pharm. Pharmacol.* 1994; 46(2): 153-155.
- 75 Burgaud J.L., Oudart N. Bronchodilatation of guinea-pig perfused bronchioles induced by the H₃-receptor for histamine: role of epithelium. *Br. J. Pharmacol.* 1993a; 109(4): 960-966.
- 76 Danko G., Hey J.A., Egan R.W., Kreutner W., Chapman R.W., Histamine H₃ receptors inhibit sympathetic modulation of airway microvascular leakage in allergic guinea pigs. *Eur. J. Pharmacol.* 1994; 254(3): 283-286.
- 77 Frieling T., Cooke H.J., Wood J.D. Histamine receptors on submucous neurons in guinea pig colon. *Am. J. Physiol.* 1993; 264(1Pt1): G74-80.
- 78 Tamura K., Palmer J.M., Wood J.D. Presynaptic inhibition produced by histamine at nicotinic synapses in enteric ganglia. *Neuroscience* 1988; 25: 171-179.

- 79 Luo X.X., Tan Y.H. Presynaptic histamine H1- and H2-receptors modulate sympathetic neurotransmission in isolated guinea pig vas deferens. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao* 1994a; 15(1): 60-64.
- 80 Coruzzi G., Bertaccini G., Schwartz J.C. Evidence that histamine H3-receptors are involved in the control of gastric acid secretion in the conscious cat. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 1991; 343: 225-227.
- 81 Corrozzini G., Adami M., Bertaccini G. Histamine H3 receptors are not involved in the regulation of rat gastric secretion. *Pharmacology* 1992; 44(4): 190-195.
- 82 Soldani G., Mengozzi G., Intorre L., De Giorgi G., Coruzzi G., Bertaccini G. Histamine H3 receptor-mediated inhibition of gastric acid secretion in conscious dogs. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1993; 347(1): 61-65.
- 83 Barnes P.J., Ichinose M. H3 receptors in airways. *Trends Pharmacol. Sci.* 1989; 10(7): 264.
- 84 Ichinose M., Barnes P.J. Inhibitory histamine receptors on cholinergic nerves in human airways. *Eur. J. Pharmacol.* 1989a; 163: 383-386.
- 85 Taylor S.J., Kilpatrick G.J. Characterization of histamine H3-receptor controlling non-adrenergic non-cholinergic contractions of the guinea-pig isolated ileum. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 105(3): 667-674.

- 86 Schworer H., Katsoulis S., Racke K. Histamine inhibits 5-hydroxytryptamine release from the porcine small intestine: involvement of H3 receptors. *Gastroenterology* 1992; 102(6): 1906-1912.
- 87 West R.E., Zweig A., Shih N.Y., Siegel M.I., Egan R.W., Clark M.A. Identification of two H3-receptor subtypes. *Mol. Pharmacol.* 1990; 38: 610-613.
- 88 Snyman J.R., Sommers De K., Van Wyk M., Gregorowski M.D. The influence of betahistine on the dynamics of cutaneous hypersensitivity reaction in patients with grass pollen allergy. *Immunopharmacology* 1995; 30: 71-78.
- 89 Rocklin R.E., Sheffer A.L., Greineder D.K., Melmon K.L. Generation of antigen-specific suppressor cells during allergy desensitization. *N. Eng. J. Med.* 1980; 302: 1213-1219.
- 90 Roberts L.J., Marney S.R., Oates J.A. Blockade of the flush associated with metastatic gastric carcinoid by combined histamine H1- and H2 receptor antagonists. Evidence for an important role of H2 receptors in human vasculature. *N. Eng. J. Med.* 1979; 300: 236-238.
- 91 Busse W.W., Sosman J. Histamine inhibition of neutrophil lysosomal enzyme release: An H2 histamine receptor response. *Science* 1976; 194: 737-738.

- 92 Broshoff J., Pack S., Lydyard P.M. Histamine suppression of lymphocyte activation. *Clin. Exp. Immunol.* 1980; 39: 739-745.
- 93 Rocklin R.E. Modulation of cellular-immune responses *in vivo* and *in vitro* by histamine receptor-bearing lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 1976; 57: 1051-1058.
- 94 Henney C.S., Bourne H.R., Lichtenstein L.M. The role of cAMP in the specific cytolytic activity of the lymphocytes. *J. Immunol.* 1972; 108(6): 1526-1534.
- 95 Mandhavan P., Nair N., Schwartz S.A. Effect of histamine and histamine antagonists on natural and antibody-dependent cellular cytotoxicity of human lymphocytes *in vitro*. *Cell. Immunol.* 1983; 13: 361-366.
- 96 Plaut M., Lichtenstein L.M., Henney C.S. Properties of a subpopulation of T cells bearing histamine receptors. *J. Clin. Invest.* 1975; 55: 856-874.
- 97 Lima M., Rocklin R.E. Histamine modulates *in vitro* IgG production by pokeweed mitogen-stimulated human mononuclear cells. *Cell. Immunol.* 1981; 64: 324-336.
- 98 Khan M.M., Melmon K.L., Fathman C.G., Hertel-Wulff B., Strober S. The effects of autacoids on cloned murine lymphoid cells: Modulation of IL 2 secretion and the activity of natural suppressor cells. *J. Immunol.* 1985b; 134(6): 4100-4106.

- 99 Cameron W., Doyle K., Rocklin R.E. Histamine type 1 (H1) receptor radioligand binding studies on normal T cell subsets, B cells and monocytes. *J. Immunol.* 1986; 136: 2116-2120.
- 100 Roberts A.I., Leone V.M., Ebert E.C. Intestinal mucosal lymphocytes have H1 receptors: H1 antagonists reduce their proliferation and cytotoxicity. *Cell. Immunol.* 1994; 156(1): 212-219.
- 101 Osband M.E., Cohen E.B., Miller B.R., Shen Y., Cohen L., Flescher L., Brown A.E., McCaffrey R.P. Biochemical analysis of specific histamine H1 and H2 receptors on lymphocytes. *Blood* 1981; 58: 87-90.
- 102 Bury T.B., Corhay J.L., Radermecker M.F. Histamine-induced inhibition of neutrophil chemotaxis and T- lymphocyte proliferation in man. *Allergy* 1992; 47(6): 624-629.
- 103 Khan M.M., Sansoni P., Engelman E.G., Melmon K.L. Pharmacologic effects of autacoid on subsets of T Cells. Regulation of expression/function of histamine-2 receptors by a subset of suppressor cells. *J. Clin. Invest.* 1985a; 75: 1578-1583.
- 104 Rocklin R.E., Habarek-Davidson A. Pharmacologic modulation *in vitro* of human histamine-induced suppressor cell activity. *Int. J. Immunopharmacol.* 1984; 6(3): 179-186.

- 105 Theuson D.O., Speck L.S., Lett-Brown M.A., Grant J.A. histamine releasing activity (HRA). Production by mitogen-or antigen-stimulated human mononuclear cells. *J. Immunol.* 1979; 123: 626-632.
- 106 Sansoni P., Silverman E.D., Khan M.M., Melmon K.L., Engleman E.G. Immunoregulatory T cells in man: Histamine-induced suppressor T cells are derived from a Leu 2⁺ (T8⁺) subpopulation distinct from that which gives rise to cytotoxic T cells. *J. Clin. Invest.* 1985; 75: 650-656.
- 107 Plaut M., Lichtenstein L.M., Histamine and immuneresponses. In: *Pharmacology of histamine receptors.* Ganellin C.R., Parsons M.E. Eds. Bristol, England: Wright 1982: 392-435.
- 108 Beaulieu L., Beaudoin J., Jobin M., Hebert J. Effects of H1 and H2 receptor agonists on nonspecific proliferative response of human peripheral blood lymphocytes. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1986; 79: 249-252.
- 109 Snyman J.R., Sommers De K. *In vivo* effect of cimetidine and roxatidine on the allogeneic graft-versus-host reaction. *Drug Invest.* 1991; 3(2): 130-133.
- 110 Royer H.D., Reinherz E.L. T-lymphocytes: ontogeny, function, relevance to clinical disorders. *N. Eng. J. Med.* 1987; 317(18): 1136-1142.

- 111 Bansal S.K., Jha A., Jaiswal A.S., Chabra S.K. Increased levels of Protein kinase C in lymphocytes in asthma: possible mechanism of regulation. *Eur. Respir. J.* 1997; 10: 308-313.
- 112 Anwar A.R.E., Kay A.B. Enhancement of human eosinophil complement receptors by pharmacologic mediators. *J. Immunol.* 1978; 121: 1245-1250.
- 113 Anderson R., Glover A.M., Rabson A.R. The *in vitro* effects of histamine and metiamide on neutrophil motility and their relationship to intracellular cyclic nucleotide levels. *J. Immunol.* 1977; 118: 1690-1699.
- 114 Clark R.A.F., Gallin J.I., Kaplan A.P.J. The selective eosinophil chemotactic activity of histamine. *J. Exp. Med.* 1975; 142: 1462-1476.
- 115 Anwar A.R., Kay A.B. H1-receptor dependence of histamine-induced enhancement of human eosinophil C3b rosettes. *Clin. Exp. Immunol.* 1980; 42(1): 196-199.
- 116 Kay A.B. The role of eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1979; 64(2): 90-104.
- 117 Foster A.P., Cunningham F.M. Histamine-induced adherence and migration of equine eosinophils. *Am. J. Vet. Res.* 1998; 59(9): 1153-1159.
- 118 Beer D.J., Matloff S.M., Rocklin R.E. The influence of histamine on immune and inflammatory responses. *Adv. Immunol.* 1984; 35: 209-268.

- 119 Hill H.R., Estensen R.D., Quie P.G., Hogan N.A., Goldberg N.D. Modulation of human neutrophil chemotactic responses by cyclic 3'-5'-GMP and cyclic 3'-5'-AMP. *Metabolism: Clinical Experimental*. 1975; 24: 447-56.
- 120 Schaefer U., Schneider A., Rixen D., Neugebauer E. Neutrophil adhesion to histamine stimulated cultured endothelial cells is primarily mediated via activation of phospholipase C and nitric oxide synthase isozymes. *Inflamm. Res*. 1998; 47: 256-264.
- 121 Lichtenstein L.M., Gillespie E. The effects of the H1- and H2-antihistamines on "allergic" histamine release and its inhibition by histamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 1975; 192: 441-450.
- 122 Bourne H.R., Lichtenstein L.M., Melmon K.L., Henney C.S., Weinstein Y., Shearer G.M. Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP. *Science* 1974; 184: 19-28.
- 123 Bull H.A., Courtney P.F., Bunker C.B., Rustin M.H., Pearce F.L., Dowd P.M. Basophil mediator release in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol*. 1993; 100(3): 305-309.
- 124 Kleine-Tebbe J., Schramm J., Bolz M., Lipp R., Schunack W., Kunkel G. Influence of histamine H3-antagonists on human leucocytes. *Agents. Actions* 1990; 30: 137-139.

- 125 Khan M.M., Strober S., Melmon K.L. Regulatory effects of mast cells on lymphoid cells: The role of histamine type 1 receptors in the interaction between mast cells, helper T cells and natural suppressor cells. *Cell Immunol.* 1986a; 103: 41-53.
- 126 Bent S., Fehling U., Braam U., Schunack W., Schmutzler W. The influence of H1-, H2- and H3-receptors on the spontaneous and ConA induced histamine release from human adenoidal mast cells. *Agents. Actions* 1991; 33(1-2): 67-70.
- 127 Ohkubo T., Shibata M., Inoue M., Kaya H., Takahashi H. Autoregulation of histamine release via the histamine H3 receptor on mast cells in the rat skin. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1994; 328(3): 307-314.
- 128 Kohno S., Nakao S., Ogawa K., Yamamura H., Nabe T., Ohata K. Possible participation of histamine H3-receptors in the regulation of anaphylactic release from isolated rat peritoneal mast cells. *Jap. J. Pharmacol.* 1994; 66(2): 173-180.
- 129 Dmitriadou V., Rouleau A., Dam Trung Tuong M., Newlands GJ., Miller HR., Luffau G., Schwartz JC., Garbarg M. Functional relationship between mast cells and C-sensitive nerve fibres evidenced by histamine H3-receptor modulation in rat lung and spleen. *Clin. Sci.* 1994; 87(2): 151-63.

- 130 Lau H.Y.A., Pearce F.L., Effects of antihistamines on isolated human lung mast cells, basophil leukocytes and erythrocytes. *Agents. Actions.* 1989; 27: 83-85.
- 131 Lappin D., Whaley K. Effects of histamine on monocyte complement production. *Clin. Exp. Immunol.* 1980; 41: 497-504.
- 132 Lett-Brown M.A., Leonard E.J. Histamine-induced inhibition of normal human basophil chemotaxis to C5a. *J. Immunol.* 1977; 118: 815-818.
- 133 Remold-O'Connell E., Remold H.G. The enhancement of macrophage adenylate cyclase by products of activated lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 1974; 249: 3622-3627.
- 134 Rocklin R.E., Kiselis I., Beer D.J., Rossi P., Maggi F., Bellanti J.A. Augmentation of prostaglandin and tromboxane production *in vitro* by monocytes exposed to histamine-induced suppressor factor (HSF). *Cell. Immunol.* 1983; 77(1): 92-98.
- 135 Ganellin C.R. Chemistry and structure-activity relationships of drugs acting at histamine receptors. In: *Pharmacology of histamine receptors.* Ganellin C.R., Parsons M.E. Eds. Bristol, England: Wright. 1982: 10-102.
- 136 Detzner M., Kathmann M., Schlicker E. Time course of the effects of histamine, thioperamide and EEDQ on H3 receptors in the mouse brain. *Agents. Actions.* 1994; 41 Spec No: C66-67.

- 137 Okada C., Eda R., Miyagawa H., Sugiyama H., Hopp R.J., Bewtra A.K., Townley R.G. Effect of cetirizine on human eosinophil superoxide generation, eosinophil chemotaxis peroxidase *in vitro*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1994; 103(4): 384-90.
- 138 Jinquan T., Reimert C.M., Deleuran B., Zachariae C., Simonsen C., Thestrup-Pedersen K. Cetirizine inhibits the *in vitro* and *ex vivo* chemotactic response of T-lymphocytes and monocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995; 95(Pt 1): 979-986.
- 138 Bertaccini G., Coruzzi G., Adami M., Pozzoli C., Gambarelli E. Histamine H3-receptors: an overview. *Ital. J. Gastroenterol.* 1991; 23(6): 378-385.
- 140 Hedge S.S., Chan P., Eglen R.M. Cardiovascular effects of R-alpha-methylhistamine, a selective histamine H3 receptor agonist, in rats: lack of involvement of histamine H3 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 1994; 251(1): 43-51.
- 141 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 1983; 65: 55-63.
- 142 Ganong W.F. *Review of medical history*. 13th rev. ed. Connecticut: Lange Medical publications. 1987: 429-448.

- 143 Meretey K., Fekete M.I.K., Bolm U., Falus A. Effect of H1 and H2 agonists on the chemiluminescence of human blood mononuclear cells induced by phytohaemagglutinin. *Immunopharmacology* 1985;9: 175-180.
- 144 Anderson R., Goolam Mohamed A. Calcium efflux and influx in f-met-leu-phe (fMLP)- activated human neutrophils are chronologically distinct events. *Clin. Exp. Immunol.* 1997; 110: 132-138.
- 145 Shult P.A., Graziano F.M., Wallow I.H., Busse W.W. Comparison of superoxide generation and luminol-dependent chemiluminescence with eosinophils and neutrophils from normal individuals. *J. Lab. Clin. Med.* 1985; 106(6): 638-644.
- 146 Qiu R., Melmon K.L., Khan M.M. A histamine derivative increases intracellular calcium mobilisation and oxidative metabolism in HL-60 cells. *Immunopharmacology* 1993; 26: 213-224.
- 147 Furui H., Suzuki K., Takagi K., Satake T. Effect of colforsin on human neutrophil superoxide production and intracellular calcium mobilization. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1989; 16: 199-209.
- 148 Babior B.M. Oxidants from phagocytes: agents of defence and destruction. *Blood* 1984; 64: 959-966.
- 149 Beer D.J., Rocklin E.R. Histamine modulation of lymphocyte biology. *CRC Crit. Rev. Immunol.* 1987; 7: 55-91.

- 150 Burde R., Seifert R., Buschauer A., Schultz G. Histamine inhibits activation of human neutrophils and HL-60 leukemic cells via H₂ receptors. *Naunyn Schmiedelbergs Arch. Pharmacol.* 1989; 340:671-678.