ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΙΤΑΡΑΣ

ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ ΕΠΙ ΑΓΓΕΙΩΝ ΥΠΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ: ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

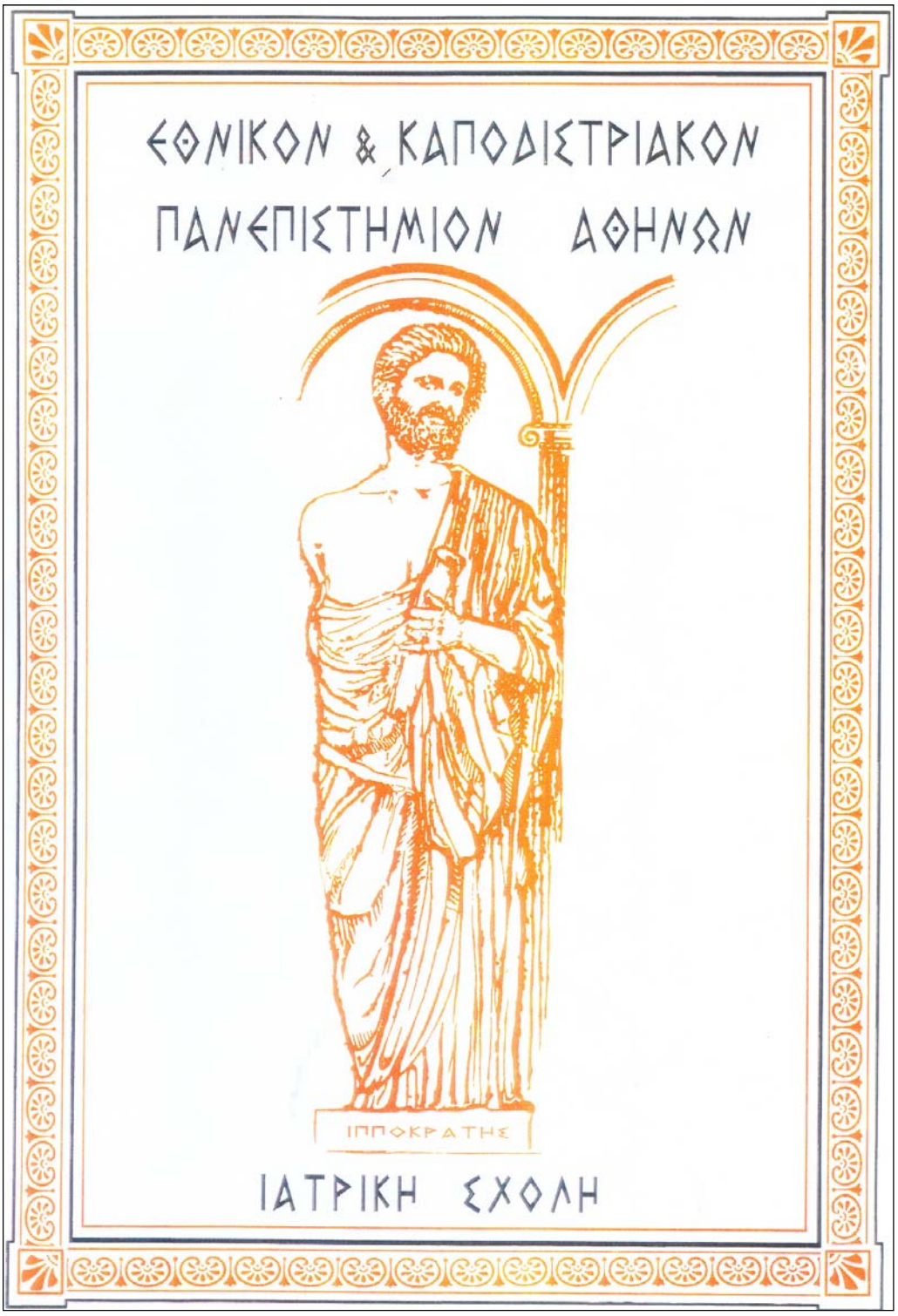
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΚΥΡΙΑΚΙΔΗΣ

ΙΑΤΡΟΣ

Διδακτορική Διατριβή

Αθήνα 2012

Η διατριβή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του έργου
EU FP7 COST Action BM0806


ΕΘΝΙΚΟΝ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΙΠΠΟΚΡΑΤΙΚΟΣ ΟΡΚΟΣ
ΚΕΙΜΕΝΟ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΙΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΕΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΙΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΞΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣ ΤΕ ΚΑΙ ΩΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ ΔΙΔΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΗ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ· ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΝΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΙΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΙΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ· ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

Ημερομηνία αιτήσεως: 30.11.2006

Ημερομηνία ορισμού 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 12.01.2007

Μέλη της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΙΤΑΡΑΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΤΥΛΙΓΑΔΑ (*Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ*)	ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΠΑΝΤΟΣ	ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 22.05.2007

Ημερομηνία καταθέσεως της διδακτορικής διατριβής: 26.11.2012

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΕΛΕΤΙΟΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ

Μέλη της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΙΤΑΡΑΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ ΗΛΙΟΔΡΟΜΙΤΗΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΤΥΛΙΓΑΔΑ (*Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ*)	ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΠΑΝΤΟΣ	ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΤΗΝΙΑΚΟΥ	ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΣΩΤΗΡΙΟΣ ΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΣ	ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΙΩΑΝΝΗΣ ΚΑΡΑΒΟΚΥΡΟΣ	ΛΕΚΤΟΡΑΣ

Βαθμός διδακτορικής διατριβής ΑΡΙΣΤΑ

Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει ότι αποδέχεται τις γνώμες του συγγραφέα (Νόμος 5343/1932, άρθρο 202, Παράγραφος 2)

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ονοματεπώνυμο:	Κωνσταντίνος Κυριακίδης
Ημερομηνία γέννησης:	25 Απριλίου 1980
Τόπος γέννησης:	Θεσσαλονίκη
Διεύθυνση εργασίας:	Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ, Μ. Ασίας 75, 115 27 Αθήνα
Τηλέφωνο/Fax:	2107462575, 2107462554
e-mail:	kkyriak@med.uoa.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ-ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

6-7.2012	*Clinical Fellow Trainning*, University of Zurich, Switzerland
2010-2011	ΜΔΕ *Ενδαγγειακές Τεχνικές*, ΕΚΠΑ & Πανεπιστήμιο Milan-Bicocca
2011	*ECDL* Δίπλωμα δεξιοτήτων
2010	*ATLS* (Advanced Trauma Life Support)
2007-σήμερα	*Υποψήφιος διδάκτορας*, Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ
2005	*Πτυχίο Ιατρικής*, Σχολή Επιστημών Υγείας, ΑΠΘ
1998	*Απολυτήριο Λυκείου*, Εκπαιδευτήρια Κοραής, Θεσσαλονίκη
Γνώσεις Η/Υ	
Ξένες Γλώσσες	Αγγλικά (άριστα), Γερμανικά (καλώς)

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

2011-σήμερα	Ειδικευόμενος ιατρός στην Αγγειοχειρουργική, Γενικό Νοσοκομείο "Κωνσταντοπούλειο", Αθήνα
2010	Καρδιοχειρουργικό Ινστιτούτο, Νοσοκομείο "Αγιος Λουκάς", Θεσσαλονίκη
2007-2010	Ειδικευόμενος ιατρός στη Γενική Χειρουργική, Θεαγένειο Αντικαρκινικό Νοσοκομείο, Θεσσαλονίκη
2006-2007	Υπηρεσία Υπαίθρου, Π.Ι. Παρανεστίου, Κ.Υ. Παρανεστίου, Γενικό Νομαρχιακό Νοσοκομείο Δράμας

ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ

2011-σήμερα	Hellenic Endovascular Vascular Society
2010-σήμερα	EU FP7 COST Action BM0806, WG4 member
2007-σήμερα	European Histamine Research Society (EHRS)

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ-ΒΡΑΒΕΙΑ

2011	1° Βραβείο, *International Vascular and Endovascular Course*, 10. 2011, Milan, Italy
2011	*ESK Assem Bursary*, EHRS, 5.2011, Sochi, Russia
2010	*GB West Memorial Trust Bursary*, EHRS, 6.2010, Durham, UK
2009	*Pfizer Bursary*, EHRS, 5.2009, Fulda, Germany
2009	Special commendation, *Arthur A. Hancock Young Investigator Award*, EHRS, 5.2009, Fulda, Germany

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

2007-σήμερα	Διερεύνηση του ρόλου της ισταμίνης και των υποδοχέων της σε περιφερειακά αγγεία αρουραίων
2007-2010	Διερεύνηση του ρόλου της ισταμίνης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού
2004-2005	Συμμετοχή στο πρόγραμμα *Enhanced, intelligent processing of food and related wastes using thermophile populations*, EU FP V Quality of life and Management of Living Resources

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

2012 16th *European Vascular Course*, 3.2012, Maastricht, Netherlands

2012 *Point prevalence survey of healthcare - Associated infections and antimicrobial use in european acute care hospitals*

2012 *Endovascular management of challenging lesions by advanced tools and techniques*, Park- Krankenhaus Leipzig-Sudost GmbH, Germany

ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΟ ΕΡΓΟ

Δημοσιεύσεις σε Διεθνή Επιστημονικά Περιοδικά (με κριτές)

- Rancic Z, Pecoraro F, Pfammatter T, Banzic I, Klein H, Kyriakidis K, Mayer D, Lachat M (2012) The use of Endurant stent graft for abdominal aortic aneurysm. (The story about extension of Instruction for Use with persistent good results of stent graft latest generation). J Cardiovasc Surg *(accepted*)
- Antoniadis PN, Kyriakidis KD, Paraskevas KI (2012) A simple booklet for patient follow- up after endovascular abdominal aortic aneurysm repair procedures. Angiology63:634-7
- Tiligada E, Kyriakidis K, Chazot PL, Passani MB (2011) Histamine pharmacology and new CNS drug targets. CNS Neurosci Ther 17:620-8
- Kyriakidis K, Zampeli E, Tiligada E (2009) Histamine levels in whole peripheral blood from women with ductal breast cancer: A pilot study. Inflamm Res 58(S)1: 73-4
- Kyriakidis DA, Theodorou MC, Filippou PS, Kyriakidis KD, Tiligada E (2008) Effect of histamine on the signal transduction of the AtoS-AtoC two component system and involvement in poly-(R)-3-hydroxybutyrate biosynthesis in *Escherichia coli*. Amino Acids 35:45-52

Περιλήψεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά

- Zampeli E, Kakavas S, Kyriakidis K, Tiligada E (2007) Histamine levels in the conjunctiva, costosternal cartilage and brain of normal and cromolyn-treated rats. Amino Acids 33:XLV
- Liakopoulou M, Psomas SK, *Kyriakidis KD* (2004) Characterization of Xanthan gum produced by Xanthomonas campestris in synthetic and chemically defined media. CHISA 5:2087

Περιλήψεις σε διεθνή Συνέδρια

- Kyriakidis K, Antoniadis P, Papi R (2012) Determination of the levels of enzymes, reactive oxygen species and metabolic products in carotid plaque and correlation with the types of carotid plaque classification. *Proceedings of the ISVS Congress*, 9-11.3.2012, Miami, USA
- Antoniadis PN, Kyriakidis KD (2011) Guide to long term management of endovascular interventions. *Proceedings of the 5th annual Veiths Symposium, ISVS*, poster session, 11.2011, New York, USA
- Kyriakidis K, Antoniadis P, Kardoulas D, Staramos D, Argitis V, Tambakis C, Dervisis K (2011) Long-term follow up with Colour Doppler ultrasonography and Power Doppler after EVAR in a single- center experience. *Proceedings of the IVEC/ ISVS Congress* 27-29.10.2011, Milan, Italy
- Argitis V, Kyriakidis K, Tabakis H, Dervisis K (2011) Popliteal artery percutaneous tranluminal angioplasty for chronic critical limb ischemia and diabetes mellitus lesions. Analysis of a single-center experience. *Proceedings of the 1st Annual joint conference of the HASDF and MEET*, Porto Heli, Greece
- Kyriakidis K, Zampeli E, Tiligada E (2011) H_3 and H_4 receptor-mediated effects in peripheral blood vessels in adjuvant arthritis. *Proceedings of the 2nd Annual Meeting of the Balkan Venous forum*, Athens, Greece
- Kyriakidis K, Tiligada E (2011) Contribution of the vascular endothelium in

the Histamine H_3 and H_4 receptor- mediated effects in blood vessels in adjuvant arthritis. *Proceedings of the 40th Annual Meeting of the EHRS*, Sochi, Russia, 61:O22

- Kyriakidis K, Zampeli E, Papamichael K, Tiligada E. (2010) Effects of the H_3R Receptor Inverse Agonist GSK334429 on the Histamine levels of Cartilage, Oesophagus and Peripheral blood vessels in rats with adjuvant arthritis. *Proceedings of the 39th Annual Meeting of the EHRS*, Durham, UK, 61:O22
- Zampeli E, Kyriakidis K, Tiligada E (2009) Differential effects of H_1 and H_4 receptor antagonists on the cartilage histamine content in rats with adjuvant arthritis. *Proceedings of the 38th Annual Meeting of the EHRS*, Fulda, Germany, 87:P25
- Kyriakidis K, Zampeli E, Tiligada E. (2009) Effect of the H_4R antagonist JNJ7777120 on histamine levels of peripheral blood vessels in rats with adjuvant arthritis. *Proceedings of the 38th Annual Meeting of the EHRS*, Fulda, Germany, 52:O28
- Kyriakidis K, Zampeli E, Tiligada E (2008) A pilot study on peripheral blood histamine levels in women with ductal breast cancer**.** *Proceedings of the 37th Annual Meeting of the EHRS*, Stockholm, Sweden, 93:P32
- Kyriakidis DA, Theodorou MC, Filippou PS, Panagiotidis CA, Kyriakidis KD, Zampeli E, Tiligada E (2007) Modulation of *E. coli* AtoS-AtoC two component system by biogenic amines. *International Congress on Biogenic Amines: Biological and Clinical Perspectives*, Catania, Italy, 213-214:p32
- Kyriakidis KD, Theodorou MC, Filippou PS, Tiligada E, Kyriakidis DA (2007) Histamine effect on the expression of AtoS-AtoC two component system in Escherichia coli. *Proceedings of the XXXVI Annual Meeting of the EHRS*, Florence, Italy, 92:P23

Δημοσιεύσεις σε Ελληνικά Επιστημονικά Περιοδικά (με κριτές)

- Κυριακίδης ΚΔ, Τυλιγάδα Α (2009) Ενδοθηλίνη - Αγγειακό ενδοθήλιο: Ανοσοφαρμακολογική προσέγγιση. *Πρακτικά 10ου Συμποσίου Αλκυονίδες Ημέρες Νεφρολογίας* (ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗ ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ)
- Κυριακίδης Κ, Ζαμπέλη Ε, Τυλιγάδα Α (2007) Αγγειακό ενδοθήλιο: Ανοσοφαρμακολογική προσέγγιση. *Ιατρική* 92:447-459

ΟΜΙΛΙΕΣ ΚΑΤΟΠΙΝ ΠΡΟΣΚΛΗΣΕΩΣ

- *Το Logbook του ειδικευόμενου στην Αγγειοχειρουργική*, Πανελλήνιο Συνέδριο Εταιρείας Αγγειακής και Ενδαγγειακής Χειρουργικής, (HEVS) 2012
- *Παθήσεις Αγγείων*, Λαϊκόν Πανεπιστήμιο "Εταιρεία των Φίλων του Λαού", Αθήνα, 2010

Αθήνα, Νοέμβριος 2012

Στην οικογένειά μου

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η ισταμίνη μελετάται για περισσότερο από 100 χρόνια και οι υποδοχείς της αποτελούν σημαντικούς στόχους για φάρμακα. Οι ερευνητές, χρησιμοποιώντας γνωστούς αγωνιστές και ανταγωνιστές των υποδοχέων της ισταμίνης, προσπαθούν να κατανοήσουν και, παράλληλα, να διευρύνουν τις θεραπευτικές προοπτικές της. Η ισταμίνη εμπλέκεται τόσο σε αλλεργικές καταστάσεις όσο και σε αυτοάνοσα νοσήματα, αλλά ο ακριβής ρόλος των υποδοχέων της στην ανοσορρύθμιση δεν έχει, μέχρι σήμερα, πλήρως διευκρινιστεί. Δεδομένου ότι η ρευματοειδής αρθρίτιδα αφορά, κυρίως, ανοσολογικές διαταραχές των κυττάρων, η μελέτη της φλεγμονώδους απάντησης σε πειραματική χειρουργική παρέμβαση επί αγγείων υπό φυσιολογικό και τροποποιημένο υπόστρωμα, καθώς και η φαρμακολογική προσέγγιση αποτελεί το αντικείμενο της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα της διατριβής μου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αικατερίνη Τυλιγάδα που δέχθηκε να εκπονήσω τη διατριβή μου υπό την επίβλεψή της, για την ανάθεση του εν λόγω θέματος, για τις συμβουλές της και τη συνεχή παρακολούθηση της πορείας της διατριβής μου. Η συνεργασία μαζί της μου δίδαξε πολλά και η συμπαράστασή της όλα αυτά τα χρόνια ήταν ανεκτίμητη και την ευχαριστώ ιδιαίτερα.

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή Νικόλαο Σιταρά για τις επιστημονικές παρατηρήσεις και τις συμβουλές του, καθώς και για την ηθική συμπαράσταση σε όλες τις δύσκολες στιγμές που προκύπτουν στη διάρκεια εκπόνησης μιας διατριβής. Ευχαριστώ

θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Κωνσταντίνο Πάντο για τη στήριξή του, για τις παρεμβάσεις και τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις του στο περιεχόμενο της διατριβής μου.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τους Διευθυντές του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, την Καθηγήτρια Ζωή Παπαδοπούλου-Νταϊφώτη και τον Καθηγητή Νικόλαο Σιταρά, που μου επέτρεψαν να εκπονήσω τη διατριβή αυτή στο Εργαστήριο, καθώς και όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου που με χαρά και αγάπη με φιλοξένησαν στους χώρους του όλα αυτά τα χρόνια.

Τις θερμές μου ευχαριστίες εκφράζω στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιστολογίας-Εμβρυολογίας Κωνσταντίνα Τηνιακού για την πολύτιμη συμβολή της στην ιστολογική μελέτη των ιστών που πραγματεύεται η διατριβή.

Ωφείλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη διδάκτορα Ευαγγελία Ζαμπέλη, που με βοήθησε και με επέβλεψε όποτε χρειάστηκε στα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο καθώς επίσης και τον διδάκτορα του εργαστηρίου Κωνσταντίνο Παπαμιχαήλ για τη συνεργασία του και τις συμβουλές του.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τους γονείς μου και όλους όσοι συνέβαλαν με τον τρόπο τους στην ολοκλήρωση της διατριβής, με την ηθική συμπαράσταση και το κουράγιο που μου έδωσαν, όταν αυτά μου ήταν απαραίτητα.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AA	κοιλιακή αορτή (Abdominal Aorta)
AC	αδενυλική κυκλάση
Ag	αντιγόνο
ALDH	αλδεϋδική δευδρογονάση
cAMP	κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
cDNA	συμπληρωματικό DNA
CFA	ανοσοενισχυτικός παράγων του Freund (Complete Freund's Adjuvant)
CREB	πρωτεΐνη απόκρισης στο cAMP
CYP	κυτόχρωμα P_{450}
DAO	διαμινοξειδάση (EC 1.4.3.6)
EC_{50}	μέση δραστική συγκέντρωση
ERK	κινάση ρυθμιζόμενη από εξωκυττάριο σήμα
ET	ενδοθηλίνη
FcεRI	υποδοχέας της IgE
Ga_i	ανασταλτική υπομονάδα α της πρωτεΐνης G
GF	αυξητικός παράγοντας
GM-CSF	παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων
GPCR	υποδοχέας που συνδέεται με πρωτεΐνες G (G Protein Coupled Receptor)
GSK334429	1-(1-methylethyl)-4-({1-[6-(trifluoromethyl)-3-pyridinyl]-4-piperidinyl} carbonyl) hexahydro-1*H*-1,4-diazepine
H_1, H_2, H_3, H_4	υποδοχείς ισταμίνης
HDC	αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης (EC 4.1.1.22)
HNMT	N-μεθυλοτρανσφεράση της ισταμίνης (EC 2.1.1.8)
i.d.	ενδοδερμική χορήγηση
i.p.	ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση
ICAM	διακυττάριο μόριο προσκόλλησης (InterCellular Adhesion Molecule) ICAM-1 ≡ Cluster of Differentiation 54, CD54 & ICAM-2 ≡ Cluster of Differentiation 102, CD102
IgE	ανοσοσφαιρίνη E
InsP3	τριφωσφορική 1,4,5 ινοσιτόλη
IVC	κάτω κοίλη φλέβα (Inferior Vena Cava)
JNJ7777120	5-chloro-2-[(4-methyl piperazin-1-yl) carbonyl]-1*H*-indole
ΚΝΣ	κεντρικό νευρικό σύστημα
LFA	αντιγόνο σχετιζόμενο με τη λειτουργία των λεμφοκυττάρων (Lymphocyte Function-associated Antigen)
LGIC	δίαυλοι ιόντων που ενεργοποιούνται από το πρόσδεμα
LT	λευκοτριένιο

MAC	σύμπλοκο προσβολής των μεμβρανών (Membrane Attack Complex)
Mac-1	ιντεγγρίνη ειδική για τα λευκοκύτταρα
MAO B	μονοαμινοξειδάση Β
MCP	χημειοτακτική πρωτεΐνη μονοκυττάρων (CCL2)
MMP	μεταλλοπρωτεάση
NHR	πυρηνικοί ορμονικοί υποδοχείς
NO	μονοξείδιο του αζώτου
NOS	συνθετάση του NO
ΠΑ	πειραματική αρθρίτιδα
PAF	παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
PAR	υποδοχέας ενεργοποιούμενος από προτεάσες (Protease-Activated Receptors)
p-ERK	φωσφορυλιωμένη ERK
PG	προσταγλανδίνη
PI3K	φωσφο-ινοσιτιδο-κινάση-3
PIP	φωσφοκινάση
PLC	φωσφολιπάση C
PSGL	γλυκοπρωτεΐνη πρόσδεμα της P-σελεκτίνης (P-Selectin Glycoprotein Ligand)
PK	πρωτεϊνική κινάση
PA	ρευματοειδής αρθρίτιδα
ROS	ενεργές ρίζες οξυγόνου
SRC	τυροσινοκινάση
STAT	μεταδότης σήματος και ενεργοποιητής μεταγραφής (Signal Transducer and Activator of Transcription)
TF	μεταγραφικός παράγοντας
TLR	υποδοχέας Toll-like
TM	διαμεμβρανική περιοχή
TNF	ογκονεκρωτικός παράγοντας
TX	θρομβοξάνη
VCAM	πρωτεΐνη προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων (Vascular Cell Adhesion Protein) VCAM-1 ≡ Cluster of Differentiation 106, CD106
VEGF	αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
VGIC	δίαυλοι ιόντων που ενεργοποιούνται από το δυναμικό
Φ.Ο.	φυσιολογικός ορός

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ ..... **V**

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ ..... **IX**

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ..... **XI**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ..... **XIII**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ ..... **XV**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ ..... **XVII**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ..... **XVII**

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **1**

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ **2**

1.1. Ισταμίνη *5*
1.1.1. Μεταβολισμός της ισταμίνης *6*
1.1.2. Πηγές, κατανομή και δράσεις της ισταμίνης *7*
1.2. Υποδοχείς ισταμίνης *10*
1.2.1. Υποδοχείς που συνδέονται με πρωτεΐνες G (GPCRs) *10*
1.2.2. Ο H_1 υποδοχέας της ισταμίνης *14*
1.2.3. Ο H_2 υποδοχέας της ισταμίνης *18*
1.2.4. Ο H_3 υποδοχέας της ισταμίνης *19*
1.2.5. Ο H_4 υποδοχέας της ισταμίνης *31*
1.3. Η Ισταμίνη στη Φλεγμονή *38*
1.3.1. Χαρακτηριστικά της Φλεγμονής *41*
1.3.2. Ο Ρόλος των Αγγείων στη Φλεγμονή *43*
1.3.3. Φλεγμονώδεις Διαταραχές – Ρευματικές Παθήσεις *47*
1.3.4. Ο Ρόλος των Αγγείων στις Φλεγμονώδεις Ρευματικές Παθήσεις *49*
1.3.5. Η Ισταμίνη στην Αρθρίτιδα *52*
1.4. Αγγεία και Ισταμίνη *53*
1.4.1. Αγγειακό Ενδοθήλιο *54*
1.4.2. Αγγειακό Ενδοθήλιο και Ισταμίνη *59*

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **61**

Σκοπός - Ερωτήματα *62*
Σχεδιασμός της μελέτης *63*

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ **65**

2.1. ΥΛΙΚΑ *65*
2.1.1. Πειραματόζωα *65*
2.1.2. Χημικά αντιδραστήρια και φαρμακολογικά δραστικές ουσίες *65*
2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ *67*

2.2.1. Χορήγηση ουσιών *67*
2.2.2. Πειραματική αρθρίτιδα *69*
2.2.3. Απομόνωση των σπλαχνικών αγγείων *71*
2.2.4. Αφαίρεση και απομόνωση ενδοθηλίου στο παρασκεύασμα κοιλιακής αορτής *72*
2.2.5. Απομόνωση και προσδιορισμός ισταμίνης στους ιστούς *73*
2.2.6. Καμπύλη αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ισταμίνης *76*
2.3. Ανάλυση & στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων *77*

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 79

3.1. Ερώτημα 1^{ο}: Προκαλεί φλεγμονώδεις εκδηλώσεις στα αγγεία η εγκατάσταση ΠΑ σε επίμυες; Επηρεάζονται τα επίπεδα ισταμίνης στα σπλαχνικά αγγεία στην ΠΑ; *79*
3.1.1. Κλινική αξιολόγηση των σημείων της αρθρίτιδας *79*
3.1.2. Επίπεδα ισταμίνης στα αγγεία φυσιολογικών επίμυων και επίμυων με πειραματική αρθρίτιδα *80*
3.2. Ερώτημα 2^{ο}: Παρατηρείται αυτορυθμιστική δράση της ισταμίνης στα σπλαχνικά αγγεία; Συμμετέχουν οι υποδοχείς της ισταμίνης στις μεταβολές στα αγγεία επίμυων με ΠΑ; Ποια η επίδραση της συστηματικής χορήγησης ανταγωνιστών των H_1, H_3 και H_4 υποδοχέων στα επίπεδα ισταμίνης στα αγγεία φυσιολογικών επίμυων και πειραματοζώων με ΠΑ; *85*
3.2.1. Επίδραση των ανταγωνιστών των H_1 υποδοχέων στα επίπεδα ισταμίνης στα σπλαχνικά αγγεία *85*
3.2.2. Επίδραση των ανταγωνιστών των H_3 υποδοχέων στα επίπεδα ισταμίνης στα σπλαχνικά αγγεία *90*
3.2.3. Επίδραση των ανταγωνιστών των H_4 υποδοχέων στα επίπεδα ισταμίνης στα σπλαχνικά αγγεία *95*
3.3. Ερώτημα 3^{ο}: Συμβάλλει το αγγειακό ενδοθήλιο στην αυτορυθμιστική δράση της ισταμίνης στα αγγεία στη συστηματική φλεγμονή; *102*

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 106

5. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 112

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 114

SUMMARY 115

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 116

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι: Στατιστική Επεξεργασία των Αποτελεσμάτων *139*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1. Χημική (α) και τρισδιάστατη (β) δομή της ισταμίνης..... 5
Εικόνα 1.2. Ταυτομερείς μορφές της ισταμίνης 5
Εικόνα 1.3. Μεταβολισμός της ισταμίνης 6
Εικόνα 1.4. Αποκοκκίωση μαστοκυττάρων 8
Εικόνα 1.5. Δράσεις ισταμίνης 9
Εικόνα 1.6. Υποδοχείς που συνδέονται με πρωτεΐνες G (GPCR) 11
Εικόνα 1.7. Μεταβίβαση του σήματος μέσω του H_4 υποδοχέα..... 12
Εικόνα 1.8. Οικογένειες υποδοχέων που συνδέονται με πρωτεΐνες G 14
Εικόνα 1.9. Ο H_1 υποδοχέας της ισταμίνης σε σύμπλοκο με τη δοξεπίνη 15
Εικόνα 1.10. Χημική δομή ανταγωνιστών των H_1 υποδοχέων..... 16
Εικόνα 1.11. Χημική δομή της διμεθινδένης..... 18
Εικόνα 1.12. Χημική δομή ανταγωνιστών των H_2 υποδοχέων..... 19
Εικόνα 1.13. Οι H_3 υποδοχείς της ισταμίνης..... 20
Εικόνα 1.14. Διαμεμβρανικές περιοχές του H_3 υποδοχέα 22
Εικόνα 1.15. Πρότυποι αγωνιστές και ανταγωνιστές των H_3 υποδοχέων 24
Εικόνα 1.16. Παράγωγα που φέρουν ιμιδαζολικό δακτύλιο 26
Εικόνα 1.17. H_3 ανταγωνιστές που δεν φέρουν ιμιδαζολικό δακτύλιο 27
Εικόνα 1.18. Δομή του GSK334429..... 30
Εικόνα 1.19. Ανταγωνιστές των H_3 υποδοχέων 31
Εικόνα 1.20. Δομή του H_4 υποδοχέα 32
Εικόνα 1.21. Αγωνιστές του H_4 υποδοχέα..... 35
Εικόνα 1.22. Ανταγωνιστές του H_4 υποδοχέα 36
Εικόνα 1.23. Θέση πρόσδεσης στον H_4 υποδοχέα..... 36
Εικόνα 1.24. Δομή του JNJ7777120..... 37
Εικόνα 1.25. Η φλεγμονώδης απάντηση 38
Εικόνα 1.26. Η φλεγμονή ως προσαρμοστική απόκριση του οργανισμού..... 40
Εικόνα 1.27. Η εξαγγείωση στη φλεγμονή..... 44
Εικόνα 1.28. Αγγειακές μεταβολές στη φλεγμονή 46
Εικόνα 1.29. Φλεγμονώδεις διαταραχές..... 47
Εικόνα 1.30. Μεταβολές στις αρθρώσεις στη ρευματοειδή αρθρίτιδα..... 49
Εικόνα 1.31. Τα αγγεία στην παθογένεια της αρθρίτιδας..... 50
Εικόνα 1.32. Σημεία φλεγμονής στις ρευματικές παθήσεις 51
Εικόνα 1.33. Σχηματική απεικόνιση της δομής αρτηριών και φλεβών..... 55
Εικόνα 1.34. Σχηματική απεικόνιση αρτηρίας όπου διακρίνεται το ενδοθήλιο 55
Εικόνα 2.1. Κλινικά σημεία αρθρίτιδας..... 70
Εικόνα 2.2. Ιστολογική εικόνα δακτύλων αρουραίου μετά τη χορήγηση CFA 70
Εικόνα 2.3. Σχηματική απεικόνιση του πειραματικού πρωτοκόλλου 71
Εικόνα 2.4. Σχηματική απεικόνιση των σπλαχνικών αγγείων..... 72
Εικόνα 2.5. Καμπύλη αναφοράς της ισταμίνης..... 77

Εικόνα 3.1. Κλινική εικόνα των άκρων επίμυων 80
Εικόνα 3.2. Επίπεδα ισταμίνης σε φυσιολογικά αγγεία 81
Εικόνα 3.3. Συσχέτιση μάζας ιστού και επιπέδων ισταμίνης 81
Εικόνα 3.4. Επίπεδα ισταμίνης σε πειραματική αρθρίτιδα 82
Εικόνα 3.5. Επίπεδα ισταμίνης στα αγγεία 83
Εικόνα 3.6. Σχέση δόσης-αποτελέσματος της επίδρασης διμεθινδένης στα επίπεδα ισταμίνης φυσιολογικών επίμυων 86
Εικόνα 3.7. Σχέση δόσης-αποτελέσματος της επίδρασης διμεθινδένης στα επίπεδα ισταμίνης επίμυων με πειραματική αρθρίτιδα 87
Εικόνα 3.8. Επίπεδα ισταμίνης στα αγγεία μετά τη χορήγηση διμεθινδένης .. 89
Εικόνα 3.9. Κλινική εικόνα άκρων μετά τη χορήγηση GSK334429 90
Εικόνα 3.10. Σχέση δόσης-αποτελέσματος της επίδρασης GSK334429 στα επίπεδα ισταμίνης φυσιολογικών επίμυων 92
Εικόνα 3.11. Σχέση δόσης-αποτελέσματος της επίδρασης GSK334429 στα επίπεδα ισταμίνης σε πειραματική αρθρίτιδα 93
Εικόνα 3.12. Επίπεδα ισταμίνης μετά τη χορήγηση GSK334429 (GSK) 94
Εικόνα 3.13. Κλινική εικόνα άκρων μετά τη χορήγηση JNJ7777120 95
Εικόνα 3.14. Σχέση δόσης-αποτελέσματος της επίδρασης JNJ7777120 στα επίπεδα ισταμίνης φυσιολογικών επίμυων 97
Εικόνα 3.15. Σχέση δόσης-αποτελέσματος της επίδρασης JNJ7777120 στα επίπεδα ισταμίνης σε πειραματική αρθρίτιδα 98
Εικόνα 3.16. Επίπεδα ισταμίνης μετά τη χορήγηση JNJ7777120 (JNJ) 99
Εικόνα 3.17. Εγκάρσια τομή αορτής αρουραίου απουσία ενδοθηλίου 102
Εικόνα 3.18. Επίπεδα ισταμίνης απουσία ενδοθηλίου μετά από χορήγηση GSK334429 (GSK) 103
Εικόνα 3.19. Επίπεδα ισταμίνης απουσία ενδοθηλίου μετά από χορήγηση JNJ7777120 (JNJ) 104
Εικόνα 4.1. Σταθμοί στην ιστορία της ισταμίνης 106

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1. Πηγές ισταμίνης και κύριες βιολογικές δράσεις 9
Πίνακας 1.2. Συγγένεια (pK_i) αγωνιστών του H_4 υποδοχέα 34
Πίνακας 1.3. Ορισμός της φλεγμονής 39
Πίνακας 1.4. Μεσολαβητές και κύρια συμπτώματα της φλεγμονής 42
Πίνακας 1.5. Φλεγμονώδεις μεσολαβητές προερχόμενοι από το πλάσμα 46
Πίνακας 1.6. Επιπολασμός των ρευματικών παθήσεων στην Κεντρική Ελλάδα 48
Πίνακας 2.1. Φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος 66
Πίνακας 2.2. Ομάδες επίμυων 68
Πίνακας 2.3. Ημιποσοτική κλίμακα αξιολόγησης σημείων αρθρίτιδας 69
Πίνακας 3.1. Μεταβολές στα επίπεδα ισταμίνης στα αγγεία 100

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 2.1. Σχηματική περιγραφή της απομόνωσης της ισταμίνης από τους ιστούς 73
Διάγραμμα 2.2. Σχηματική περιγραφή του ποσοτικού προσδιορισμού της ισταμίνης 75

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ισταμίνη [2-(4-ιμιδαζολυλ)-αιθυλαμίνη] είναι μία ενδογενής υδρόφιλη αγγειοδραστική αμίνη με ποικίλες δράσεις σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις που επιτελούνται μέσω των τεσσάρων υποτύπων υποδοχέων ισταμίνης H_1, H_2, H_3 και H_4. Το 1966, οι Ash και Schild ανακάλυψαν την παρουσία των H_1 και H_2 υποδοχέων της ισταμίνης, βασισμένοι στα φαρμακολογικά αποτελέσματα γνωστών ισταμινεργικών υποστρωμάτων, των λείων αγγειακών μυών, της αναπνευστικής οδού, της μήτρας, του στομάχου και άλλων οργάνων (Ash and Schild 1966). Αργότερα, ο Sir James Black και οι συνεργάτες του (Black *et al*. 1972) οδηγήθηκαν στην ανάπτυξη των πρώτων εκλεκτικών H_2 ανταγωνιστών μετιαμίδη (metiamide) και βουτιμαμίδη (burimamide). Επιπλέον, η αναγνώριση ότι οι διάφορες δράσεις της ισταμίνης μπορούν να ανασταλούν αποτελεσματικά από εκλεκτικούς ανταγωνιστές των υποδοχέων της οδήγησε στη μεγάλη ανάπτυξη των H_1 and H_2 ανταγωνιστών.

Το 1983 αναγνωρίζεται και ταυτοποιείται στον εγκέφαλο επίμυων ένας τρίτος υποδοχέας της ισταμίνης, ο H_3, με βάση κλασικές φαρμακολογικές προσεγγίσεις (Arrang *et al.* 1983). Για πολύ καιρό δεν παρατηρείται περαιτέρω πρόοδος κυρίως λόγω έλλειψης μοριακών δεδομένων. Ακολουθεί η κλωνοποίηση του H_1 (Yamashita *et al*. 1991) και του H_2 την ίδια χρονιά (Gantz *et al.* 1991).

Το 1999, η ομάδα των ερευνητών της εταιρείας Johnson & Johnson με επικεφαλής τον Lovenberg κλωνοποίησαν το συμπληρωματικό DNA (cDNA) μιας α_2 αδρενεργικής EST αλληλουχίας, που μετά τον χαρακτηρισμό της διαπιστώθηκε ότι επρόκειτο για τον H_3 υποδοχέα της ισταμίνης του ανθρώπου

(Lovenberg *et al*. 1999). Η κλωνοποίηση του H_3 υποδοχέα συνετέλεσε στη γρήγορη αύξηση της γνώσης για τη μοριακή φαρμακολογία και βιοχημεία των υποδοχέων της ισταμίνης, συμπεριλαμβανομένων της έκφρασης, της μετάδοσης σήματος, των ισομορφών των υποδοχέων (Lovenberg *et al.* 1999, Drutel *et al.* 2001, Hancock 2006, Bongers *et al.* 2007). Αυτό, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη των συστημάτων ανασυνδυασμένων κυττάρων, οδήγησε στην ανάπτυξη από τη φαρμακευτική βιομηχανία πολλών εκλεκτικών υποστρωμάτων, που στοχεύουν τον H_3 υποδοχέα (Celanire *et al.* 2005, Wijtmans *et al.* 2007). Σήμερα, ο H_3 υποδοχέας θεωρείται κύριος στόχος για την αντιμετώπιση ασθενειών του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπως οι διαταραχές της μνήμης λόγω ελλειμματικής προσοχής, η νόσος Alzheimer και η ναρκοληψία (Leurs *et al.* 1995, Esbenshade *et al.* 2008, Gemkow *et al.* 2009, Tiligada *et al*. 2009).

Μετά την κλωνοποίηση του γονιδίου του H_3 υποδοχέα της ισταμίνης, διαπιστώθηκε ότι και ο τέταρτος υποδοχέας της ισταμίνης, ο H_4, ανήκει στην ίδια οικογένεια των συνδεόμενων με G πρωτεΐνες υποδοχέων (G protein-coupled receptors, GPCR). Με βάση τη γνώση της αλληλουχίας DNA του H_3 υποδοχέα, διάφορες ερευνητικές ομάδες, εργαζόμενες ανεξάρτητα, ταυτοποίησαν τον H_4 υποδοχέα με πολύ διακριτές φαρμακολογικές δράσεις, κυρίως, στο ανοσοποιητικό σύστημα (Nakamura *et al.* 2000; Oda *et al.* 2000; Liu *et al.* 2001; Morse *et al.* 2001; Nguyen *et al.* 2001; Zhu *et al.* 2001), στις φλεγμονές και στην κνίδωση (De Esch *et al.* 2005; Thurmond *et al.* 2008, Tiligada 2012). Με την κλωνοποίηση και του H_4 υποδοχέα το 1999-2000, η έρευνα σχετικά με το ρόλο της ισταμίνης αυξάνει σημαντικά και ένας μεγάλος αριθμός εκλεκτικών ανταγωνιστών και αγωνιστών του H_4 υποδοχέα της

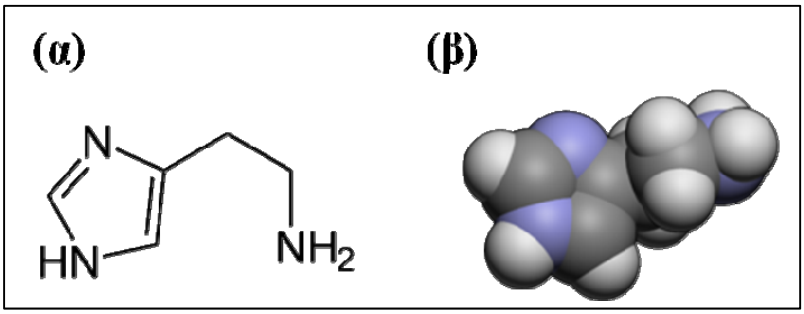
ισταμίνης συντίθενται από διάφορα ακαδημαϊκά εργαστήρια και τη φαρμακευτική βιομηχανία, με δράση τόσο στην περιφέρεια όσο και στον εγκέφαλο (Tiligada *et al*. 2009).

Ως κύρια πηγή της ισταμίνης αναφέρονται τα σιτευτικά κύτταρα ή μαστοκύτταρα (Kakavas *et al*. 2006), ενώ σημαντικές πηγές ισταμίνης αποτελούν ποικίλα άλλα κύτταρα, όπως τα γαστρικά εντεροχρωμαφινοειδή κύτταρα (Prinz *et al*. 2003), διάφορα είδη λευκοκυττάρων (Falcone *et al*. 2006), νευρώνες (Arrang *et al*. 1983, Panula *et al*. 1983), χονδροκύτταρα (Tetlow and Woolley 2005) και τα νεοπλασματικά κύτταρα (Francis *et al*. 2012). Αν και η πρόοδος στη διευκρίνιση του ρόλου της ισταμίνης στη φυσιολογία και την παθοφυσιολογία των θηλαστικών είναι σημαντική, κυρίως τα τελευταία χρόνια, η συμμετοχή της στην ανοσολογική και φλεγμονώδη απάντηση χρειάζεται επαναπροσδιορισμό (Zampeli and Tiligada 2009, O'Mahony *et al*. 2011). Δεδομένα που ενισχύουν την άποψη αυτή είναι η διαφορική έκφραση των υποδοχέων της ισταμίνης σε διάφορα είδη πειραματοζώων, αλλά και πειραματικών πρωτοκόλλων (Chazot and Tiligada 2008, Coruzzi *et al*. 2012), καθώς και το γεγονός ότι πολλές φαρμακευτικές ουσίες, που δρουν στους υποδοχείς της ισταμίνης, παρουσιάζουν διπλή και πολλές φορές αντίθετη ή/και συμπληρωματική δράση (Rosethorne and Charlton 2011, Seifert *et al*. 2012). Από τα παραπάνω στοιχεία, διαπιστώνεται ότι χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για την πλήρη κατανόηση των λειτουργιών των τεσσάρων υποδοχέων, αλλά και του ρόλου της ισταμίνης στις διάφορες παθοφυσιολογικές απαντήσεις.

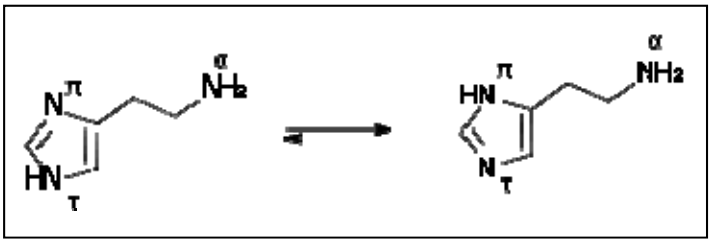
1.1. Ισταμίνη

Η ισταμίνη (Εικόνα 1.1) είναι μια ενδογενής οργανική βασική ένωση, που συμμετέχει στην ανοσολογική απάντηση (Dy and Schneider 2004, Akdis and Simons 2006, Zampeli and Tiligada 2009, O'Mahony *et al*. 2011), ενώ, παράλληλα, ρυθμίζει φυσιολογικές λειτουργίες του εντέρου, δρώντας ως νευροδιαβιβαστής (Tiligada *et al*. 2009) και μεσολαβητής φλεγμονής (Zampeli and Tiligada 2009).

Η ισταμίνη σχηματίζει άχρωμους υγροσκοπικούς κρυστάλλους με σημείο τήξης 84°C, διαλύεται εύκολα στο νερό και την αιθανόλη. Σε υδατικά συστήματα, η ισταμίνη απαντά σε δύο ταυτομερείς μορφές (Εικόνα 1.2).



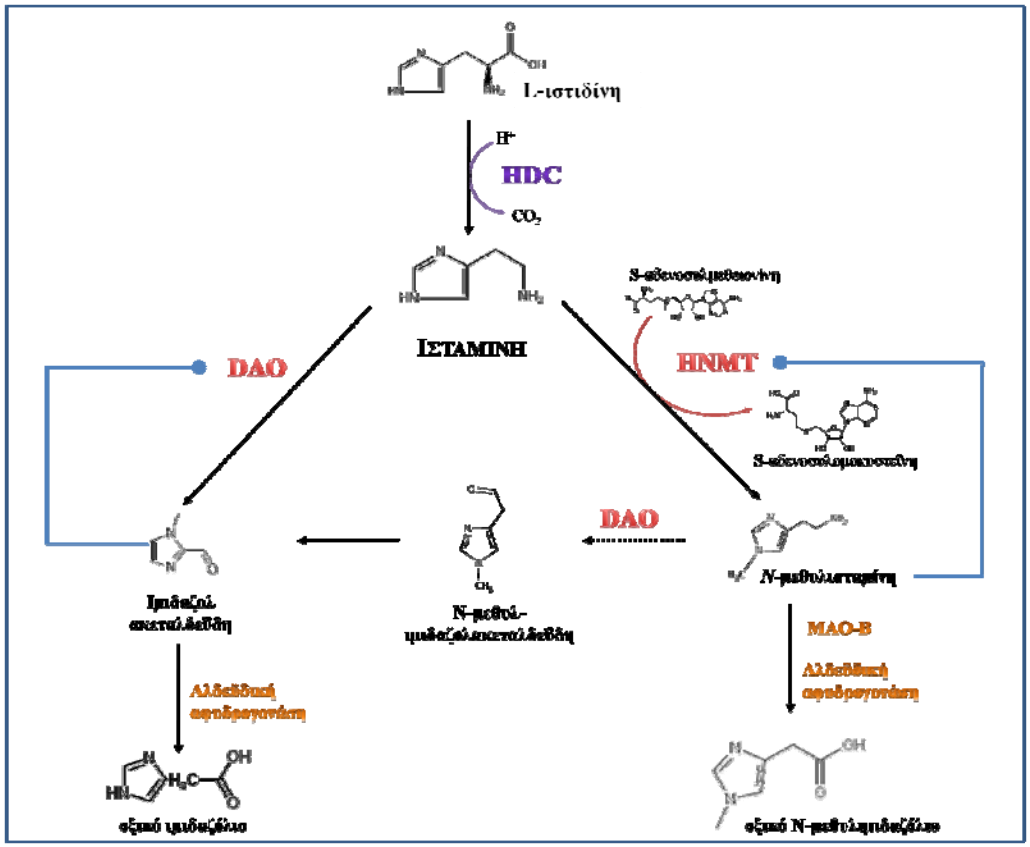
Εικόνα 1.1. Χημική (α) και τρισδιάστατη (β) δομή της ισταμίνης



Εικόνα 1.2. Ταυτομερείς μορφές της ισταμίνης

1.1.1. Μεταβολισμός της ισταμίνης

Η ισταμίνη συντίθεται από το αμινοξύ L-ιστιδίνη μέσω αποκαρβοξυλίωσης που καταλύεται από το ένζυμο αποκαρβοξυλάση της L-ιστιδίνης (HDC, EC 4.1.1.22) (Εικόνα 1.3, Ichikawa *et al.* 2010, Moya-Garcia *et al.* 2005, Ohtsu 2010).



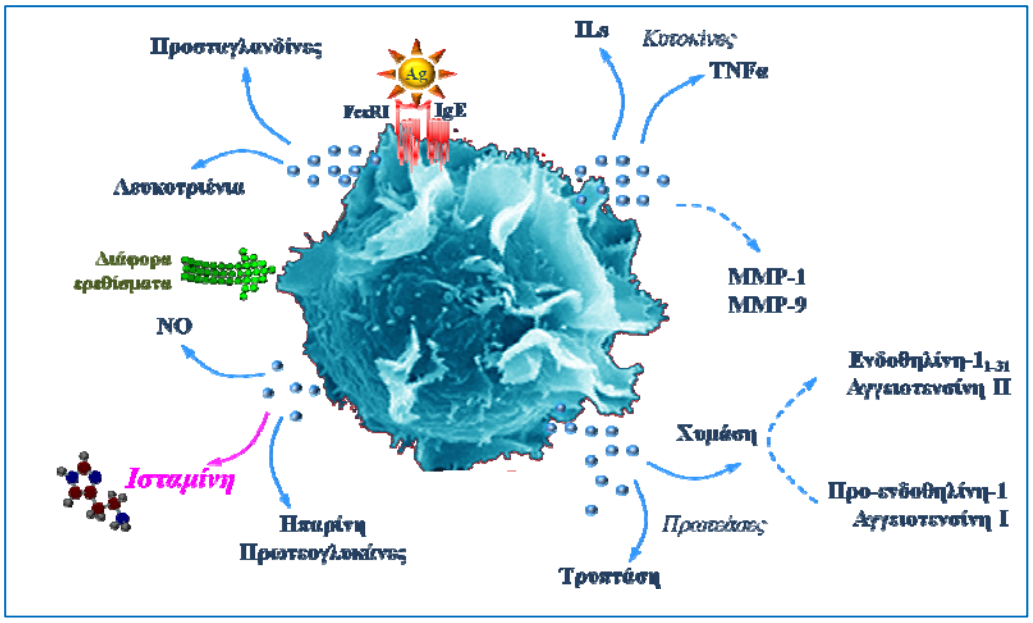
Εικόνα 1.3. Μεταβολισμός της ισταμίνης
DAO: διαμινοξειδάση, HDC: αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης, HNMT: N-μεθυλοτρανσφεράση της ισταμίνης MAO B: μονοαμινοξειδάση B

Μετά τη σύνθεσή της, η ισταμίνη αποθηκεύεται ή/και εκλύεται από την επίδραση διαφόρων ερεθισμάτων. Αποικοδομείται εξωκυτταρίως με οξειδωτική απαμίνωση της πρωτοταγούς αμινομάδας μέσω της διαμινοξειδάσης (DAO, EC 1.4.3.6) ή ενδοκυτταρίως με μεθυλίωση του ιμιδαζολικού δακτυλίου μέσω της *N*-μεθυλοτρανσφεράσης της ισταμίνης (HNMT, EC 2.1.1.8). Αμφότερα τα ένζυμα μπορεί να ανασταλούν από τα αντίστοιχα προϊόντα της αντίδρασης με αρνητική ανατροφοδότηση (Εικόνα 1.3, Maintz and Novak 2007). Στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), η ισταμίνη που παράγεται στις συνάψεις διασπάται, κυρίως, από τη HNMT, ενώ σε άλλους ιστούς και τα δύο ένζυμα συμμετέχουν στον καταβολισμό της (βλέπε Haas *et al.* 2008). Πολλά άλλα ένζυμα, όπως η μονοαμινοξειδάση Β και η αλδεϋδική αφυδρογονάση 2, τροποποιούν περαιτέρω τους ενδιάμεσους μεταβολίτες της ιστιδίνης για απέκκριση ή ανακύκλωση (Εικόνα 1.3, Maintz and Novak 2007). Τα βακτήρια παράγουν επίσης ισταμίνη, χρησιμοποιώντας δικά τους ένζυμα αποκαρβοξυλίωσης της ιστιδίνης, τα οποία είναι διαφορετικά από εκείνα των ζώων και του ανθρώπου (Landete *et al.* 2008).

1.1.2. Πηγές, κατανομή και δράσεις της ισταμίνης

Στον άνθρωπο, αλλά και σε άλλους ζωικούς οργανισμούς, η ισταμίνη και οι υποδοχείς της βρίσκονται σε σχεδόν όλους τους ιστούς του σώματος. Η ισταμίνη αποθηκεύεται, κυρίως, στα κοκκία των μαστοκυττάρων και των βασεοφίλων κυττάρων (Εικόνα 1.4). Όταν απελευθερωθεί, ασκεί πολλές και ποικίλες δράσεις (Εικόνα 1.5) μέσω των τεσσάρων τύπων των υποδοχέων της, H_1, H_2, H_3, H_4 (Hills *et al.* 1997), όπως σύσπαση των λείων μυϊκών ιστών στους πνεύμονες, τη μήτρα και το στομάχι, αγγειοδιαστολή, αύξηση της

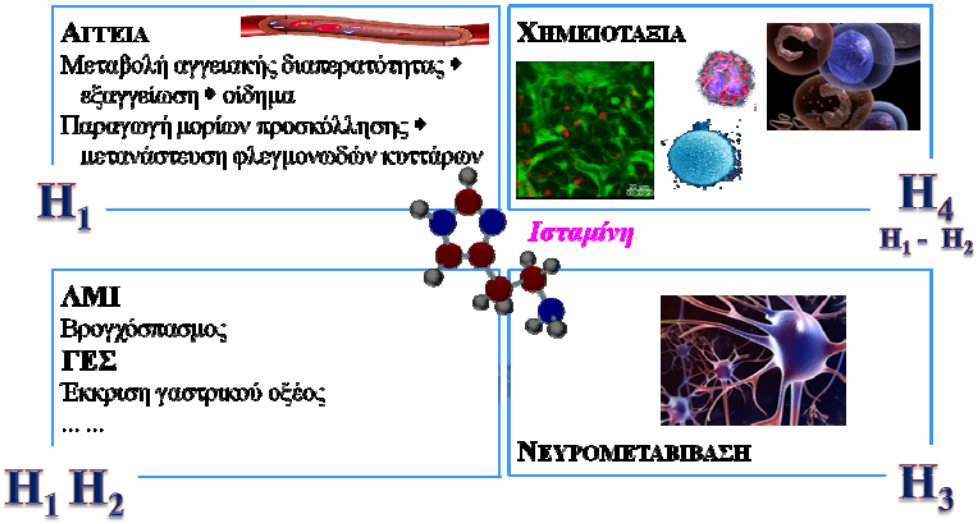
διαπερατότητας των αγγείων και μείωση της αρτηριακής πίεσης, διέγερση της έκκρισης του γαστρικού οξέος και αύξηση του καρδιακού ρυθμού (Πίνακας 1.1).



Εικόνα 1.4. Αποκοκκίωση μαστοκυττάρων
Τα μαστοκύτταρα απελευθερώνουν ισταμίνη και πλήθος άλλων μεσολαβητών όταν ενεργοποιηθούν από αντιγόνα (Ag) μέσω γεφύρωσης των υποδοχέων FcεRI της ανοσοσφαιρίνης Ε (IgE) κατά την αλλεργική αντίδραση ή από διάφορα άλλα ερεθίσματα (βέλος). IL: ιντερλευκίνη, MMP: μεταλλοπρωτεάση, NO: μονοξείδιο του αζώτου, TNF: παράγοντας νέκρωσης όγκων

Η επίδραση της ισταμίνης επί των αιμοφόρων αγγείων είναι σημαντικός παράγοντας της απάντησης των ιστών σε βλάβη που προκαλείται από φυσικά ερεθίσματα, μόλυνση ή αλλεργική αντίδραση. Ως μέρος της τοπικής ανοσοαπάντησης στα ξένα προς τον οργανισμό παθογόνα αίτια, η ισταμίνη παράγεται και εκλύεται από τα βασεόφιλα και τα μαστοκύτταρα, που βρίσκονται στον παρακείμενο ιστό (Kakavas *et al*. 2006), και αυξάνει τη

διαπερατότητα των τριχοειδών στα λευκά αιμοσφαίρια και στις πρωτεΐνες του πλάσματος με αποτέλεσμα τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων στα σημεία της βλάβης του ιστού ή της λοίμωξης (Di *et al*. 2003).



Εικόνα 1.5. Δράσεις ισταμίνης
Η ενδογενής ισταμίνη ασκεί πλήθος δράσεων στον οργανισμό μέσω πρόσδεσης σε 4 τύπους υποδοχέων (H_1-H_4)

Πίνακας 1.1. Πηγές ισταμίνης και κύριες βιολογικές δράσεις

ΠΗΓΗ	ΚΥΡΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ
Λείοι μυς, ενδοθηλιακά κύτταρα	Οξεία αλλεργική απάντηση	H_1
Κύτταρα του γαστρεντερικού συστήματος	Έκκριση γαστρικού υγρού	H_2
Κεντρικό νευρικό σύστημα	Ρύθμιση νευροδιαβίβασης	H_3
Μαστοκύτταρα, ηωσινόφιλα, Τ κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα	Ρύθμιση ανοσοαπάντησης	H_4

1.2. Υποδοχείς ισταμίνης

Η ισταμίνη ασκεί τη δράση της μέσω τεσσάρων τύπων υποδοχέων, H_1, H_2, H_3, H_4, οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων με 7 διαμεμβρανικές περιοχές που συνδέονται με πρωτεΐνες G (GPCRs) (Hill *et al.* 1997).

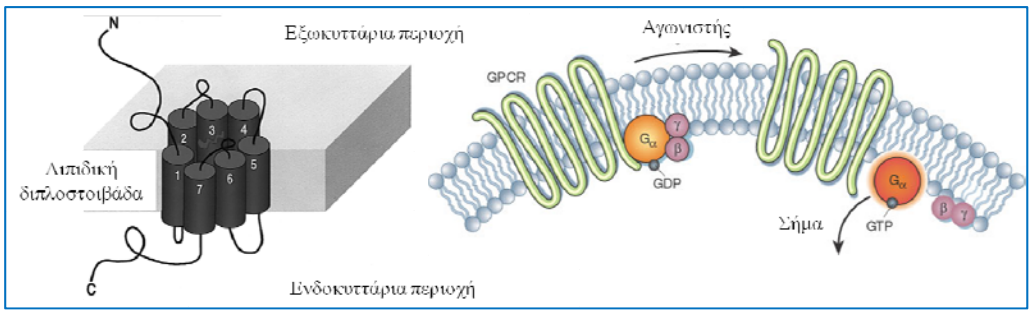
1.2.1. Υποδοχείς που συνδέονται με πρωτεΐνες G (GPCRs)

Μεγάλος αριθμός ορμονών, νευροδιαβιβαστών, χημειοκινών και άλλων χημικών μεσολαβητών προσδένονται σε διαμεμβρανικούς GPCRs, οι οποίοι αποτελούν σημαντικά συστήματα μεταβίβασης σήματος στα ευκαρυωτικά κύτταρα και επομένως κύριους στόχους για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων (Millar and Newton 2010, Katritch *et al*. 2012, Wang and Lewis RJ 2012).

Οι GPCRs αντιπροσωπεύουν μια μεγάλη οικογένεια μεμβρανικών πρωτεϊνών στο ανθρώπινο γονιδίωμα και την πιο πλούσια πηγή στόχων για τη φαρμακοθεραπεία (Kobilka 2007). Οι GPCRs αποτελούνται από μία μόνο πεπτιδική αλυσίδα, η οποία διασχίζει τη λιπιδική διπλοστοιβάδα επτά φορές, με εναλλασσόμενες εξωκυττάριες και ενδοκυττάριες αλληλουχίες (Εικόνα 1.6).

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί μερικές εκατοντάδες διαφορετικοί τύποι GPCR και ο κάθε τύπος εξ αυτών συνδέεται με διαφορετικά προσδέματα. Οι χημικοί μεσολαβητές που λειτουργούν ως ενδογενή προσδέματα συνδέονται με τους υποδοχείς στην εξωκυττάρια περιοχή τους. Πρέπει να σημειωθεί ότι έχει γίνει μεγάλη πρόοδος στον τομέα της βιολογίας των GPCRs τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Σε αυτήν περιλαμβάνεται η κλωνοποίηση των γονιδίων των πρώτων GPCRs, αναδεικνύοντας το πλήθος

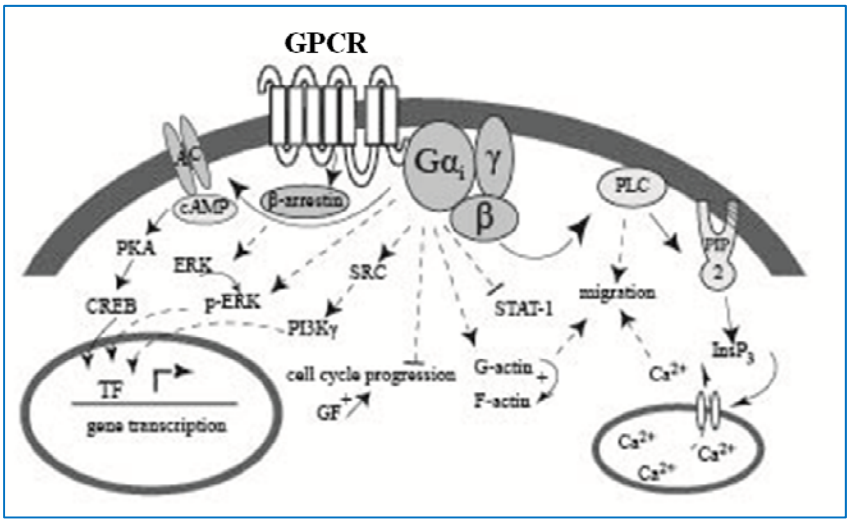
των μελών αυτής της οικογένειας, καθώς και τον αριθμό των ορφανών GPCRs, ενώ σημαντικό επίτευγμα συνιστά ο πολύ πρόσφατος προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής του H_1 υποδοχέα (Shimamura *et al*. 2011). Επιπλέον, αρχίζει να διαφαίνεται ότι η ρύθμιση και η μεταβίβαση του σήματος μέσω των GPCRs γίνονται με πιο πολύπλοκους μηχανισμούς από ότι αρχικά είχε θεωρηθεί (Rosethorne and Charlton 2011, Nijmeijer *et al*. 2012a, b).



Εικόνα 1.6. Υποδοχείς που συνδέονται με πρωτεΐνες G (GPCR)
Σχηματική απεικόνιση των GPCR με τις επτά διαμεμβρανικές έλικες (παριστάνονται με κυλίνδρους 1-7) που συνδέονται εναλλάξ με κυτταροπλασματικές και εξωκυττάριες υδρόφιλες περιοχές. Οι επτά έλικες σχηματίζουν ένα κεντρικό πόρο στην εξωκυττάρια επιφάνεια (Elrodi and Chou 2002). β: υπομονάδα β της πρωτεΐνης G, γ: υπομονάδα γ της πρωτεΐνης G, C: ενδοκυττάριο καρβοξυ-τελικό άκρο, GDP: διφωσφορική γουανοσίνη, GTP: τριφωσφορική γουανοσίνη, N: εξωκυττάριο αμινο-τελικό άκρο

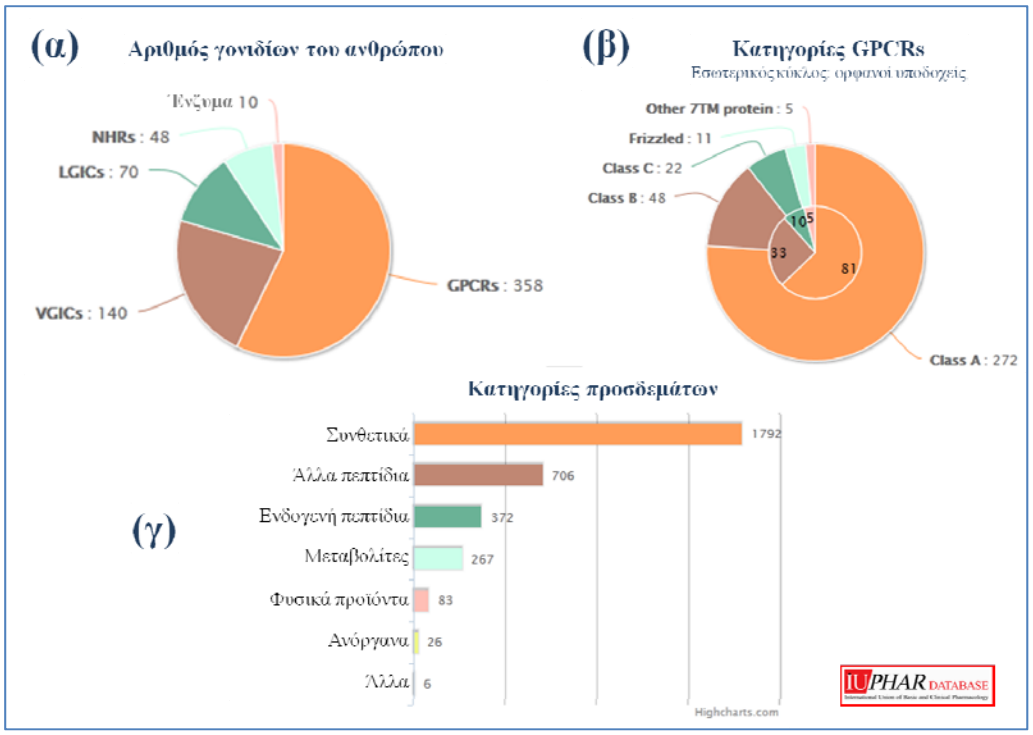
Οι GPCRs απαντούν στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, αντιδρούν με εξωκυττάριες ουσίες, από μικρά μόρια μέχρι πεπτίδια και πρωτεΐνες, και ενεργοποιούνται με αποτέλεσμα τη μετάδοση του σήματος ενδοκυτταρίως και την κυτταρική απόκριση (Εικόνα 1.7). Οι GPCRs εμπλέκονται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις και αποτελούν στόχο για το 40% περίπου των φαρμάκων (Kobilka 2007). Τα κύρια μονοπάτια μετάδοσης σήματος μέσω

GPCRs είναι δύο: αυτό του κυκλικού AMP και της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (Fredriksson *et al*. 2003), ενώ πρόσφατα περιγράφηκε και η συμμετοχή της β-αρρεστίνης (Rosethorne and Charlton 2011, Nijmeijer *et al*. 2012a, b), ανεξάρτητα από την συμμετοχή των πρωτεϊνών G (Εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7. Μεταβίβαση του σήματος μέσω του H_4 υποδοχέα
Σχηματική απεικόνιση της μεταβίβασης του σήματος μέσω του H_4 υποδοχέα που ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων που συνδέονται με πρωτεΐνες G (GPCR). Η ενεργοποίηση του υποδοχέα ξεκινά ενδοκυττάριους καταρράκτες μεταγωγής του σήματος που περιλαμβάνουν διάφορα μοριακά μονοπάτια (Nijmeijer *et al*. 2012a). β: υπομονάδα β, γ: υπομονάδα γ, AC: αδενυλική κυκλάση, Ca^{2+}: ενδοκυττάριο ασβέστιο, cAMP: κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, CREB: πρωτεΐνη απόκρισης στο cAMP, ERK: κινάση ρυθμιζόμενη από εξωκυττάριο σήμα, Ga_i: ανασταλτική υπομονάδα α, GF: αυξητικός παράγοντας, $InsP_3$: τριφωσφορική 1,4,5 ινοσιτόλη, PI3K: φωσφο-ινοσιτιδο-κινάση-3, PIP: φωσφοκινάση, SRC: τυροσινοκινάση, STAT: μεταδότης σήματος και ενεργοποιητής μεταγραφής (signal transducer and activator of transcription), p-ERK: φωσφορυλιωμένη ERK, PKA: πρωτεϊνική κινάση A, PLC: φωσφολιπάση C, TF: μεταγραφικός παράγοντας

Οι GPCRs, αν και είναι η πιο ετερογενής ομάδα διαμεμβρανικών υποδοχέων των ευκαρυωτικών οργανισμών, ταξινομούνται σε πέντε κατηγορίες (Εικόνα 1.8) με βάση τις ομόλογες αλληλουχίες των διαμεμβρανικών περιοχών και τις ομοιότητες στη λειτουργία τους (Kroeze *et al*. 2003, Foord *et al*. 2005, Sharman *et al*. 2011). Ο φυσιολογικός ρόλος πολλών εξ αυτών δεν είναι γνωστός και εξαιτίας αυτού μερικοί υποδοχείς αναφέρονται ως *ορφανοί* (Sharman *et al*. 2011). Βέβαια η έρευνα για τη διευκρίνιση της λειτουργίας αυτών των υποδοχέων συνεχίζεται, με αποτέλεσμα ο αριθμός των ορφανών υποδοχέων να μειώνεται (Wettschureck and Offermanns 2005). Όλοι οι υποδοχείς από πλευράς δομής φέρουν τις χαρακτηριστικές υδρόφοβες διαμεμβρανικές περιοχές (TM), το εξωκυττάριο αμινο-τελικό και το ενδοκυττάριο καρβοξυ-τελικό τμήμα της πεπτιδικής αλυσίδας (Εικόνα 1.6). Οι GPCRs εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ομολογία μέσα στη διαμεμβρανική περιοχή. Αντίθετα, διαφοροποιήσεις εμφανίζονται στο καρβοξυ-τελικό άκρο και στις TM5 και TM6, καθώς και στο αμινο-τελικό τμήμα. Στο τελευταίο, μάλιστα, διαπιστώνονται οι μεγαλύτερες διαφορές. Αυτό το τμήμα αποτελείται από 10-50 αμινοξέα στην περίπτωση των υποδοχέων των μονοαμινών και των πεπτιδίων και από 350-600 αμινοξέα στην περίπτωση των γλυκοπρωτεϊνικών ορμονικών υποδοχέων και των υποδοχέων του γλουταμικού οξέος. Οι πιο μεγάλες αμινο-τελικές αλληλουχίες παρατηρούνται στους υποδοχείς των μορίων συγκόλλησης. Οι υποδοχείς της ισταμίνης ανήκουν στην κατηγορία Α της ροδοψίνης (Hill *et al*. 2012).



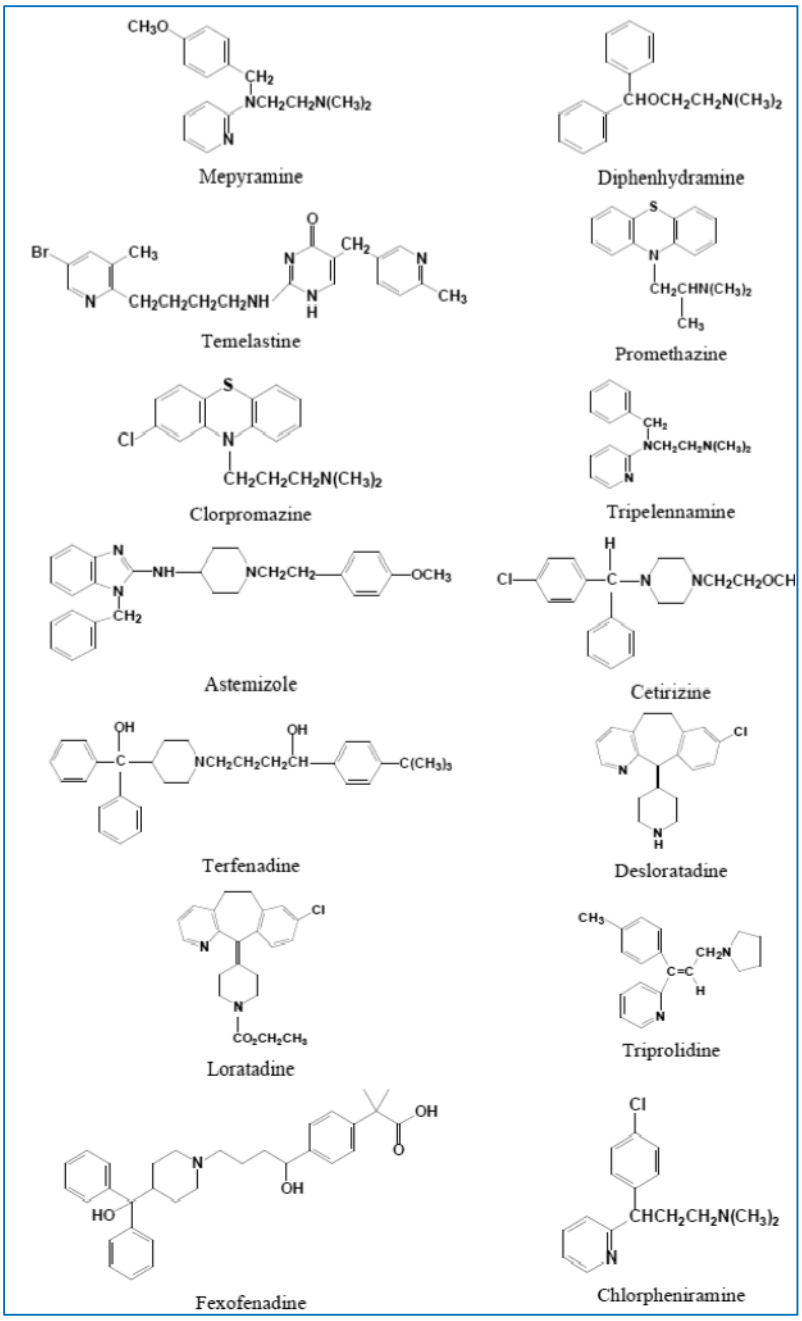
Εικόνα 1.8. Οικογένειες υποδοχέων που συνδέονται με πρωτεΐνες G (GPCR) Οι GPCR είναι η πολυπληθέστερη οικογένεια υποδοχέων στο ανθρώπινο γονιδίωμα (α) και ταξινομούνται σε 5 κατηγορίες (β), ενώ η πλειονότητα των προσδεμάτων τους έχει προέλθει από ορθολογικό σχεδιασμό (γ). LGIC: δίαυλοι ιόντων που ενεργοποιούνται από το πρόσδεμα, NHR: πυρηνικοί ορμονικοί υποδοχείς, VGIC: δίαυλοι ιόντων που ενεργοποιούνται από το δυναμικό (Sharman *et al*. 2011)

1.2.2. Ο H_1 υποδοχέας της ισταμίνης

Ο H_1 υποδοχέας της ισταμίνης εκφράζεται στα κύτταρα της αναπνευστικής οδού, στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα, στα κύτταρα του ήπατος, στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στους νευρώνες, στα χονδροκύτταρα και στα Β και Τ λεμφοκύτταρα (Leurs *et al.* 1995, Smit *et al.* 1999, Togias 2003). Στην Εικόνα 1.9 αποτυπώνεται το σύμπλοκο του H_1 υποδοχέα με την δοξεπίνη, που προέκυψε από τις πρόσφατες μελέτες της κρυσταλλικής δομής του (Shimamura *et al.* 2011).

Εικόνα 1.9. Ο H_1 υποδοχέας της ισταμίνης σε σύμπλοκο με τη δοξεπίνη (Shimamura *et al.* 2011)

Οι H_1 υποδοχείς παίζουν σημαντικό ρόλο σε αλλεργικές αντιδράσεις, όπως η αλλεργική ρινίτιδα, η επιπεφυκίτιδα, η κνίδωση, η ατοπική δερματίτιδα, το άσθμα και η αναφυλαξία (Εικόνα 1.5). Πολλοί εκλεκτικοί ανταγωνιστές του H_1 υποδοχέα (Εικόνα 1.10) χρησιμοποιούνται στη θεραπεία των αλλεργικών νοσημάτων και θεωρούνται από τα παλαιότερα αντισταμινικά φάρμακα (Emanuel 1999, Sharma and Hamelin 2003, Simons and Simons 2011). Επισημάνεται, ωστόσο, ότι λόγω των παρενεργειών τους στο ΚΝΣ (Maurer and Volz 2001) πολλά από αυτά τα αντισταμινικά έχουν αντικατασταθεί από νεότερα μη κατασταλτικά αντισταμινικά φάρμακα, όπως η σετιριζίνη και λορατιδίνη (Εικόνα 1.10). Πρόσφατες μελέτες σε επίμυες έδειξαν ότι οι H_1 υποδοχείς στον πυρήνα του πνευμονογαστρικού και του γλωσσοφαρυγγικού νεύρου (*tractus solitarii*) ρυθμίζουν την αρτηριακή πίεση και τον καρδιακό ρυθμό (Bhuiyan *et al.* 2011).



Εικόνα 1.10. Χημική δομή ανταγωνιστών των H_1 υποδοχέων (αντισταμινικά φάρμακα)

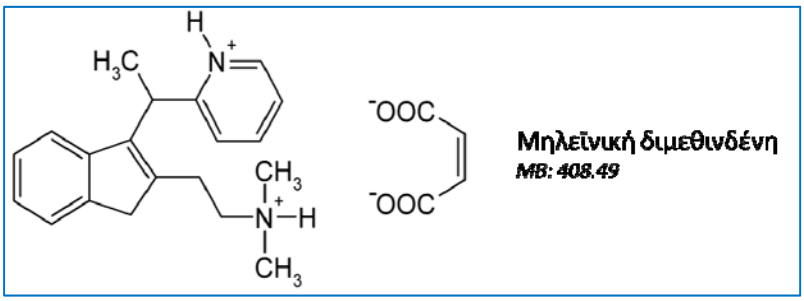
ΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΤΩΝ H_1 ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

Σήμερα είναι γνωστοί πολλοί αγωνιστές και ανταγωνιστές των H_1 υποδοχέων (Εικόνα 1.10), οι οποίοι κατατάσσονται σε τρείς κατηγορίες: 1) μικρού μοριακού βάρους παράγωγα της ισταμίνης, 2) παράγωγα της ισταμίνης με μεγαλύτερους υποκαταστάτες, π.χ. με αρωματική υποκατάσταση στη θέση 2 του ιμιδαζολικού δακτυλίου και 3) τα ισταπροντιφένια (Leschke *et al.* 1995, Zingel *et al.* 1995, Hill *et al.* 1997, Elz *et al.* 2000).

Τα αντισταμινικά φάρμακα περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό χημικών ενώσεων με διαφορετικές φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες. Φαρμακολογικά, οι H_1 ανταγωνιστές (αντισταμινικά φάρμακα) κατατάσσονται σε $1^{ης}$ και $2^{ης}$ γενιάς και έχουν βρει ιδιαίτερη εφαρμογή για πολλά χρόνια στη θεραπευτική αντιμετώπιση των αλλεργικών νοσημάτων (Hill *et al.* 1997). Οι $1^{ης}$ γενιάς ανταγωνιστές, όπως η χλωροφενιραμίνη, διφαινυλδραμίνη, υδροξυζίνη και προμεθαζίνη χρησιμοποιούνται για περισσότερο από πενήντα χρόνια. Τα $1^{ης}$ γενιάς αντισταμινικά φάρμακα, μεταξύ των οποίων και η διμεθινδένη, προσδένονται επίσης τους υποδοχείς σεροτονίνης και τους α-αδρενεργικούς υποδοχείς (Bohme *et al.* 2003) και προκαλούν αντιστρεπτή καταστολή στο ΚΝΣ. Από τους ανταγωνιστές της $2^{ης}$ γενιάς, οι ουσίες τερφεναδίνη, αστεμιζόλη, σετιριζίνη, λοραταδίνη, λεβοκαβαστίνη, αζελαστίνη, εβαστίνη και το κετοτιφαίνιο είναι ισχυροί εκλεκτικοί ανταγωνιστές των H_1 υποδοχέων της ισταμίνης. Η σύνδεση των ανταγωνιστών δεύτερης γενιάς είναι αντιστρεπτή, με εξαίρεση ορισμένους, όπως η αστεμιζόλη, οι οποίοι δεσμεύονται μη αντιστρεπτά (Simons and Simons 1994; Marone 1997).

Διμεθινδένη (dimethindene)

Η διμεθινδένη (Εικόνα 1.11) είναι εκλεκτικός H_1 ανταγωνιστής $1^{ης}$ γενιάς. Χρησιμοποιείται για περισσότερο από 40 χρόνια για την αντιμετώπιση αλλεργικών καταστάσεων, όπως η ρινίτιδα. Πρόσφατες μελέτες κατέδειξαν ότι η διμεθινδένη, σε συνδυασμό με ικοδεξτρίνη, είναι αποτελεσματική στον περιορισμό της περιτοναϊκής συγκόλλησης, μετά από σοβαρή χειρουργική επέμβαση στην κοιλιακή περιοχή (Tepetes *et al.* 2009).

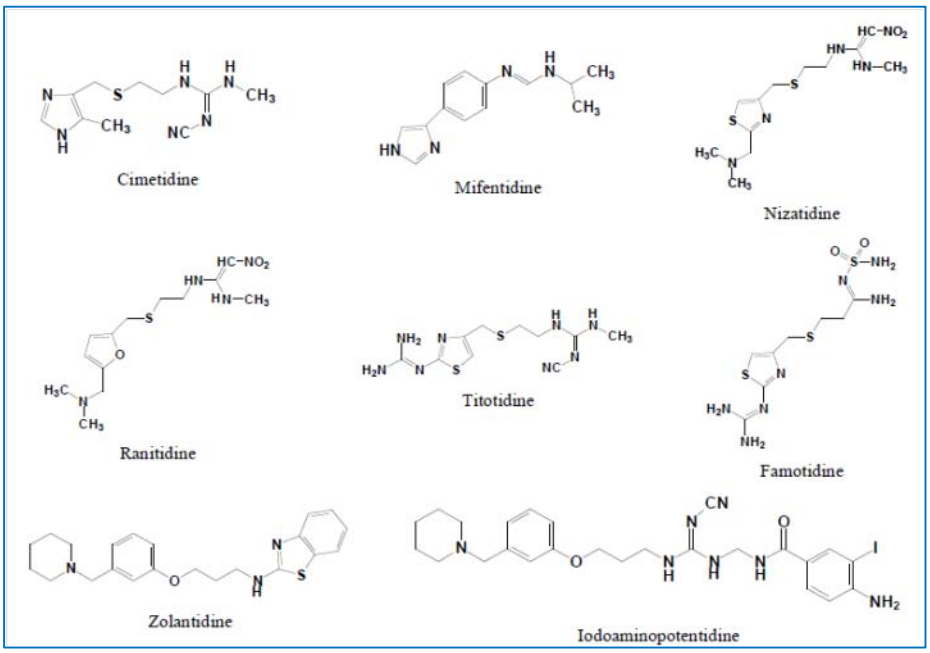


Εικόνα 1.11. Χημική δομή της διμεθινδένης (N,N-Dimethyl-2-{3-[1-(2-pyridinyl)ethyl]-1H-inden-2-yl}ethanamine) μηλεϊνικού άλατος (maleate)

1.2.3. Ο H_2 υποδοχέας της ισταμίνης

Ο H_2 υποδοχέας της ισταμίνης εκφράζεται σε διάφορους τύπους κυττάρων. Η ρύθμιση της έκκρισης του γαστρικού οξέος είναι μια από τις κυριότερες λειτουργίες της ισταμίνης μέσω των H_2 υποδοχέων της (Dy and Schneider 2004). Η ύπαρξη των H_2 υποδοχέων διαπιστώθηκε με τη σύνθεση εκλεκτικών ουσιών από τον Sir James Black (Black *et al.* 1972), ο οποίος τιμήθηκε με το βραβείο Nobel στη Φυσιολογία και Ιατρική το 1988 για τη σύνθεση των β_2 και H_2 εκλεκτικών ανταγωνιστών, προπανολόλης και

σιμετιδίνης αντίστοιχα. Στην Εικόνα 1.9, που ακολουθεί, δίδονται οι χημικές δομές των κυριότερων H_2 ανταγωνιστών.

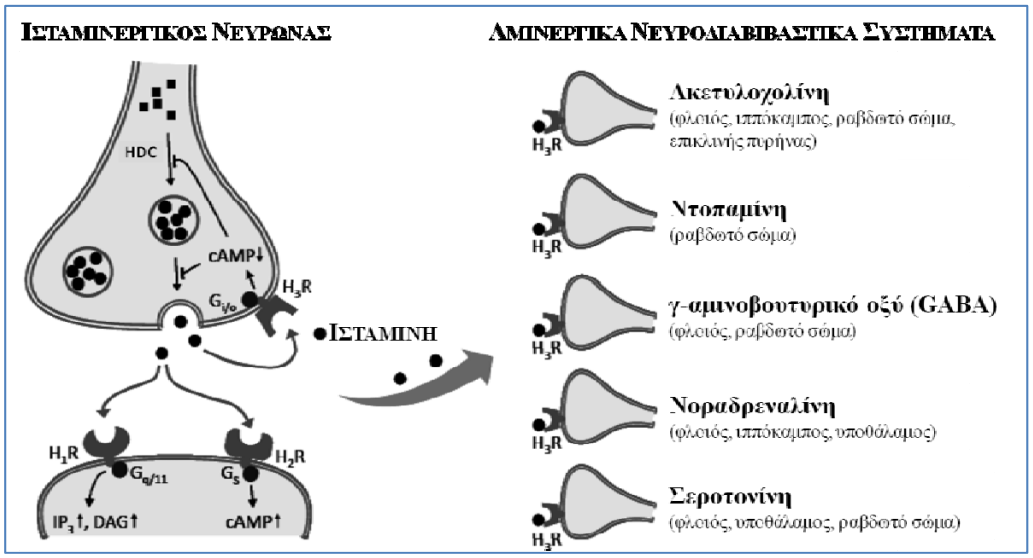


Εικόνα 1.12. Χημική δομή ανταγωνιστών των H_2 υποδοχέων

1.2.4. Ο H_3 υποδοχέας της ισταμίνης

Ο H_3 υποδοχέας της ισταμίνης περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1983 ως προσυναπτικός αυτο-υποδοχέας, που ρυθμίζει τη σύνθεση της ισταμίνης, αλλά και την αναστολή της έκκρισής της από τους ισταμινεργικούς νευρώνες σε λεπτά τμήματα του εγκεφαλικού φλοιού επίμυων (Arrang *et al.* 1983). Ο H_3 υποδοχέας έχει ταυτοποιηθεί και ως ετερο-υποδοχέας σε μη ισταμινεργικούς νευρώνες, όπου ρυθμίζει την απελευθέρωση πολλών σημαντικών νευροδιαβιβαστών, όπως της ακετυλοχολίνης, της νορεπινεφρίνης, της ντοπαμίνης και της σεροτονίνης (Εικόνα 1.13). Η συμμετοχή του H_3 υποδοχέα αναγνωρίζεται σήμερα σε ασθένειες του ΚΝΣ, όπως γνωστική δυσλειτουργία,

σχιζοφρένια, διαταραχές του ύπνου, επιληψία, ναρκοληψία και νευροπαθητικός πόνος (Alguacil *et al.* 2003), ενώ ένας μικρός αριθμός εκλεκτικών ανταγωνιστών των H_3 υποδοχέων έχουν περάσει τη δεύτερη φάση των κλινικών δοκιμών για νοσήματα του ΚΝΣ (Sander *et al.* 2008, Tiligada *et al.* 2009).



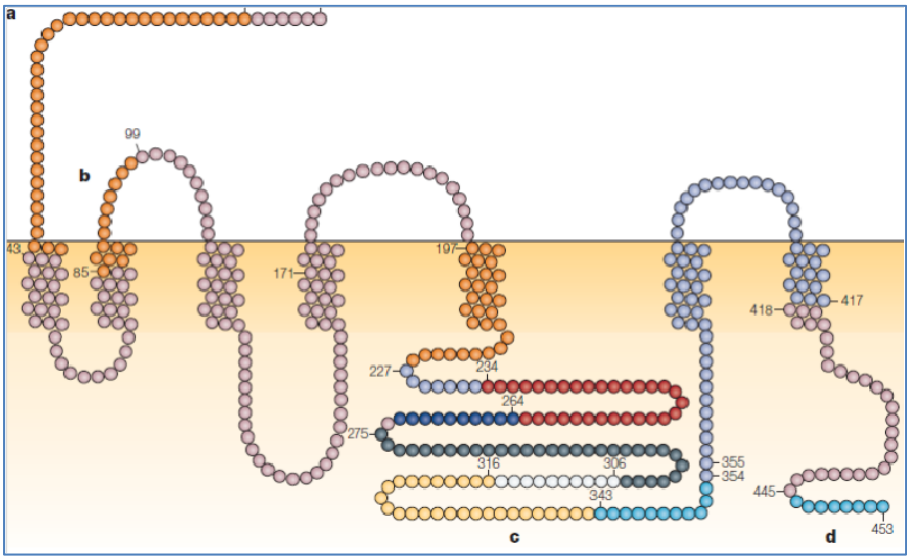
Εικόνα 1.13. Οι H_3 υποδοχείς της ισταμίνης
Οι αυτο- και ετερο-υποδοχείς της ισταμίνης (H_3R) ρυθμίζουν την απελευθέρωση της ισταμίνης από τους ισταμινεργικούς νευρώνες και αλληλεπιδρούν με διάφορα νευροδιαβιβαστικά συστήματα στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Sander *et al.* 2008). cAMP: κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, DAG: διακυλ-γλυκερόλη, G: πρωτεΐνη G, HDC: αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης, IP_3: τριφωσφορική ινοσιτόλη

Ο H_3 υποδοχέας εκφράζεται κυρίως στο ΚΝΣ με την υψηλότερη έκφραση στον εγκεφαλικό φλοιό, στον ιππόκαμπο, στα βασικά γάγγλια και στον υποθάλαμο (Watanabe *et al.* 1984, Drutel *et al.* 2001, Haas *et al.* 2008). Επιπλέον, ο H_3 υποδοχέας εκφράζεται και στο περιφερικό νευρικό σύστημα, στη γαστρεντερική οδό, στους αεραγωγούς και στο καρδιαγγειακό σύστημα

(Bertaccini *et al.* 1991), ενώ τα μαστοκύτταρα του δέρματος στον άνθρωπο εκφράζουν κυρίως H_2 και H_4 υποδοχείς και σχεδόν καθόλου H_3 (Lippert *et al.* 2004).

Η μοριακή αρχιτεκτονική του H_3 υποδοχέα έγινε γνωστή από τον Lovenberg (Lovenberg *et al.* 1999), ο οποίος διαπίστωσε ότι ο H_3 υποδοχέας, όπως και οι άλλοι δύο υποδοχείς της ισταμίνης ανήκουν στην οικογένεια των GPCR (βλέπε §1.2.1). Είναι γνωστό ότι υπάρχουν πολλές ισομορφές υποδοχέων H_3 με διαφορετικές ενδεχομένως φαρμακολογικές δράσεις (Εικόνα 1.14). Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί περισσότερο από είκοσι ισομορφές, με εκείνη του Lovenberg, που ταυτοποιήθηκε πρώτη, να θεωρείται η καλύτερα χαρακτηρισμένη ισομορφή. Μετά την κλωνοποίηση του H_3 υποδοχέα στον άνθρωπο (Lovenberg *et al.* 1999), ο H_3 υποδοχέας κλωνοποιήθηκε με βάση την ομοιότητα στην αλληλουχία σε διάφορους άλλους οργανισμούς, όπως επίμυες, ινδικά χοιρίδια και πιθήκους (Bakker 2004, Leurs *et al.* 2004, Bakker *et al.* 2006).

Ο ανθρώπινος H_3 υποδοχέας είναι μια πρωτεΐνη με 445 αμινοξέα (Εικόνα 1.14) στον οποίον η ενδογενής ισταμίνη δρα ως αγωνιστής. Από την άλλη πλευρά επισημαίνεται ότι, ενώ η συγγένεια της ισταμίνης για τους H_1 (p*K*i = 4.2) και H_2 (p*K*i = 4.3) υποδοχείς είναι χαμηλή, στην περίπτωση των H_3 (p*K*i = 8.0) και H_4 (p*K*i = 7.8) υποδοχέων είναι ιδιαίτερα υψηλή (Lim *et al.* 2005). Σε επίπεδο πρωτεΐνης, ο H_3 υποδοχέας δείχνει ομολογία 22% και 20% με τους H_1 και H_2 υποδοχείς αντίστοιχα (Lovenberg *et al.* 1999). Ο H_3 υποδοχέας στον άνθρωπο εμφανίζει μεγαλύτερη ομοιότητα με τον H_4, με ομολογία μεταξύ 38% και 58% στις διαμεμβρανικές περιοχές (Liu *et al.* 2001, Morse *et al.* 2001, Zhu *et al.* 2001).



Εικόνα 1.14. Διαμεμβρανικές περιοχές του H_3 υποδοχέα

Σε αντίθεση με τα γονίδια των H_1 και H_2 υποδοχέων, το γονίδιο του H_3 υποδοχέα περιέχει τρία εξόνια και δύο ιντρόνια ή τέσσερα εξόνια και τρία ιντρόνια, με την παρουσία του επιπλέον εξονίου να αντιστοιχεί σε οκτώ πρόσθετα καρβοξυ-τελικά αμινοξέα της πεπτιδικής αλυσίδας μερικών H_3 υποδοχέων. Διάφορες H_3 ισομορφές έχουν ταυτοποιηθεί, στις οποίες το μάτισμα (splicing) οδηγεί σε υποδοχείς με λιγότερα αμινοξέα στην περιοχή της αμινο-τελικής περιοχής παραλείποντας τα αμινοξέα 7-42. Στην περιοχή **b** το μάτισμα έχει ως αποτέλεσμα τη μερική διαγραφή της δεύτερης διαμεμβρανικής περιοχής και του πρώτου εξωκυττάριου βρόχου (loop) και παράλειψη των αμινοξέων 85-98. Αντίστοιχα, το μάτισμα στην περιοχή **c**, καταλήγει στην ισομορφή όπου ο τρίτος ενδοκυτταρικός βρόχος έχει διάφορα μήκη και οι διαμεμβρανικές περιοχές 5, 6 ή και 7 δεν υπάρχουν. Επίσης, μέσα στην περιοχή **c** μπορεί να δημιουργηθεί μια μεγάλη ποικιλία ισομορφών. Το μάτισμα στην περιοχή **d** δίδει H_3 υποδοχείς με επιπλέον οκτώ καρβοξυ-τελικά αμινοξέα (446-453) (Leurs et al. 2004)

Συγκριτικές φαρμακολογικές μελέτες των H_3 και H_4 υποδοχέων καταδεικνύουν σημαντική διαφοροποίηση στη σχέση δομής-δραστικότητας των υποστρωμάτων που περιέχουν ιμιδαζολικό δακτύλιο όσον αφορά τη συγγένεια και την αποτελεσματικότητα. Πρόσφατες μελέτες, με νέους ανάστροφους αγωνιστές των H_3 υποδοχέων, δείχνουν ότι θα μπορούσαν να

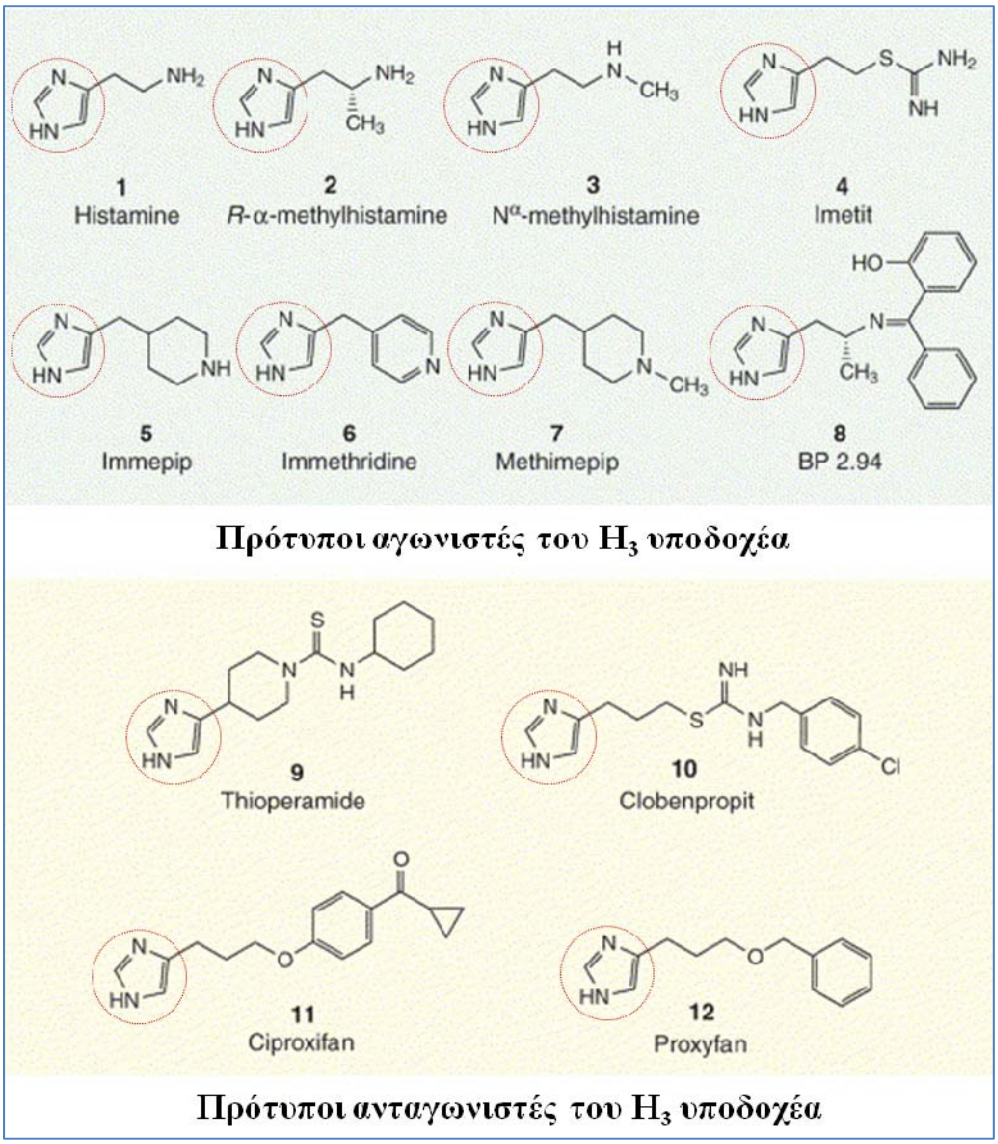
χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα στον νευροπαθητικό πόνο (Gemkow *et al.* 2009; Tiligada *et al.* 2009, Hough and Rice 2011).

Η κλωνοποίηση των διαφόρων μορφών του H_3 υποδοχέα σε επίμυες, ποντίκια, ινδικά χοιρίδια, πιθήκους κι άλλα είδη, κατέδειξε ότι οι φαρμακολογικές ιδιότητες των H_3 υποδοχέων εξαρτώνται από το είδος (Lovenberg *et al*. 2000, Hancock *et al*. 2003). Η απροσδόκητη ετερογένεια των H_3 υποδοχέων μεταξύ των ειδών επεξηγεί, εν μέρει, τα διαφορετικά, και πολλές φορές αντικρουόμενα, δεδομένα που προέκυψαν κατά τη μελέτη διαφόρων προσδεμάτων σε πειραματικά συστήματα. Παράλληλα, οδήγησε στην ανάγκη ανάπτυξης αποτελεσματικότερων μορίων.

ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΤΩΝ H_3 ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

Ιμιδαζολικά παράγωγα

Στην αρχή της ανάπτυξης ουσιών που στοχεύουν τον H_3 υποδοχέα, θεωρήθηκε απαραίτητος ο ιμιδαζολικός δακτύλιος, αφού οι πρώτοι ανταγωνιστές έφεραν αυτόν τον δακτύλιο στο μόριό τους (Εικόνα 1.15). Στην πράξη, ενώσεις όπως η θειοπεραμίδη, η κιπροφιξάνη και η κλοβενπροπίτη χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπες ενώσεις (Celanire *et al*. 2005).

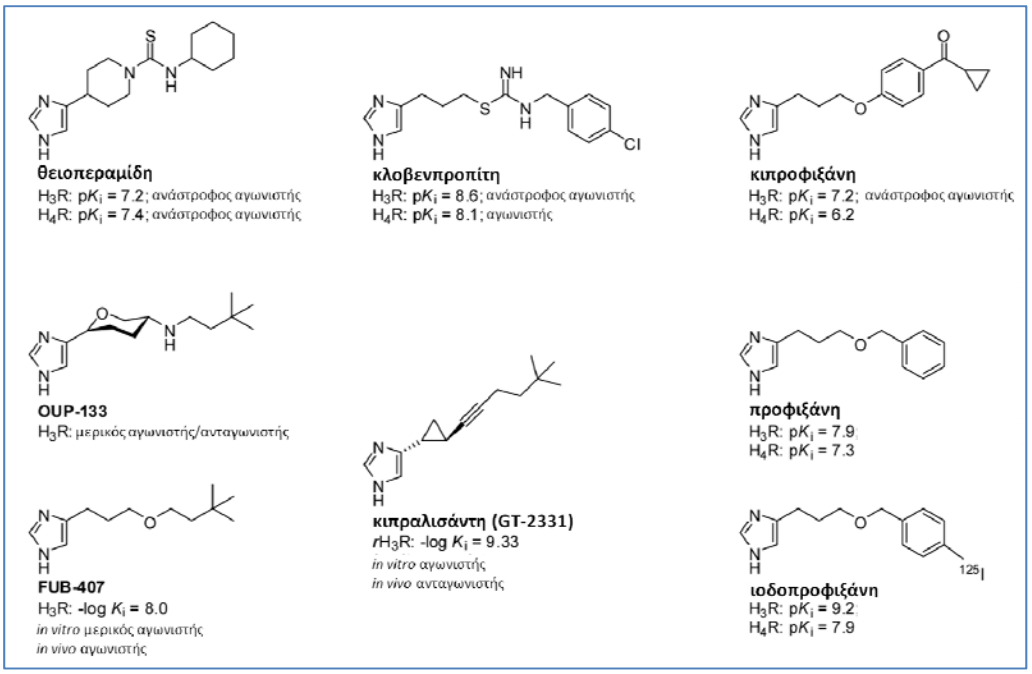


Εικόνα 1.15. Πρότυποι αγωνιστές και ανταγωνιστές των H_3 υποδοχέων που φέρουν ιμιδαζολικό δακτύλιο (σε κύκλο) (Celanire *et al*. 2005)

Όμως, έχει βρεθεί ότι το ιμιδαζόλιο δεσμεύεται ισχυρά από το σίδηρο της αίμης στο κυτόχρωμα P_{450} (CYP) (Stephanos 1996). Συνεπώς, όταν ουσίες που περιέχουν ιμιδαζολικό δακτύλιο συγχορηγούνται με άλλα φάρμακα δύναται να αλληλεπιδράσουν με αποτέλεσμα τη μεταβολή της αποτελεσματικότητας και/ή την εμφάνιση ανεπιθυμήτων ενεργειών (Zhang *et al.* 2006, Dávila-Borja *et al.* 2007, Lynch and Price 2007). Από την άλλη, το γεγονός ότι το ιμιδαζόλιο είναι ισχυρός δότης και δέκτης υδρογόνου ελαττώνει

τη δυνατότητα χορήγησης των ουσιών από το στόμα και την είσοδό τους στο ΚΝΣ (Chadha *et al.* 1994).

Μετά την ανακάλυψη και του H_4 υποδοχέα, η εκλεκτικότητα πολλών ουσιών για τον H_3 υποδοχέα άρχισε να επανεξετάζεται (Εικόνα 1.16). Για παράδειγμα, η θειοπεραμίδη (Εικόνα 1.16), που οριζόταν ως εκλεκτικός H_3 ανταγωνιστής ($pK_i = 7.2$), εμφάνισε συγκρίσιμη συγγένεια με τον H_4 υποδοχέα ($pK_i = 7.4$) και πλέον κατατάσσεται στους H_3/H_4 ανταγωνιστές (Arrang *et al.* 1987, Liu *et al.* 2001, Morse *et al.* 2001, Zhu *et al.* 2001, Gbahou *et al.* 2006). Επιπροσθέτως, η κλοβενπροπίτη (Εικόνα 1.16) αποδείχθηκε ισχυρός H_3 ανάστροφος αγωνιστής αλλά και H_4 αγωνιστής (Lim *et al.* 2005, 2009). Αν και η κιπροφιξάνη (Εικόνα 1.15) εμφανίζει κάποιες διαφορές, όσον αφορά τη συγγένειά της με τους υποδοχείς ισταμίνης στους επίμυες και στον άνθρωπο, χρησιμοποιείται ακόμη ως ουσία αναφοράς, αφού είναι ισχυρότερος H_3 παρά H_4 αγωνιστής (συντελεστής προτίμησης $k_iH_3/k_iH_4 = 13$) (Lim *et al.* 2005). Η προφιξάνη (Εικόνα 1.16) έχει το ίδιο προφίλ προτίμησης ($k_iH_3/k_iH_4 = 13$), αν και αρχικά είχε περιγραφεί ως ουδέτερος H_3 ανταγωνιστής (Ligneau *et al.* 2000). Πλέον, ταξινομείται ως πρωτεϊνικό υπόστρωμα με *in vivo* και *in vitro* μεγάλου εύρους δραστικότητα, από αγωνιστής μέχρι και αντιστρεπτός αγωνιστής, ανάλογα με το σύστημα μελέτης, το είδος του οργανισμού (επίμυες, άνθρωπος κλπ) και το βαθμό δραστικότητας (Gbahou *et al.* 2003). Το παράγωγο της προφιξάνης, FUB 407 (Εικόνα 1.16), δρα ως μερικός αγωνιστής (pki = 8.0, EC_{50} = 45nM) και είναι πλήρης αγωνιστής σε επίμυες *in vivo* (Sasse *et al.* 1999, Nickel *et al.* 2001).

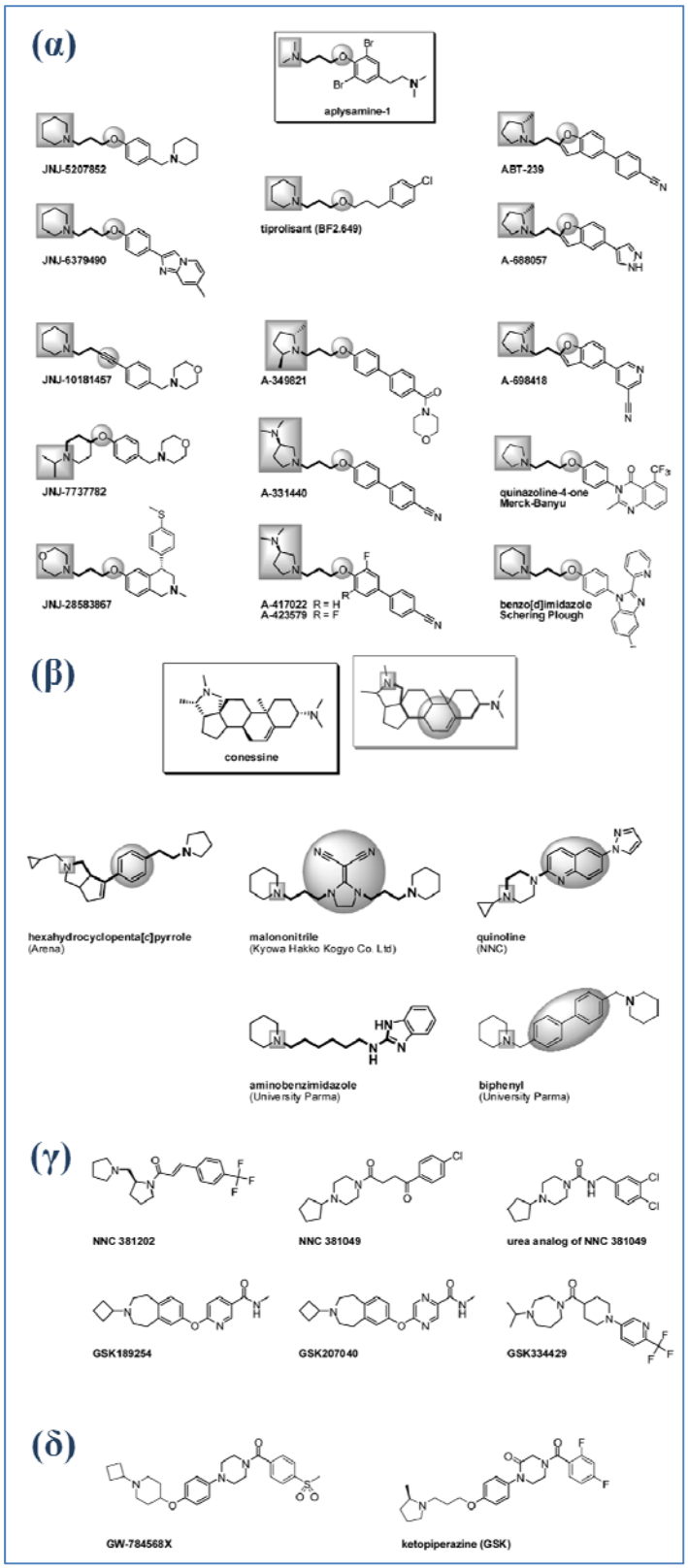


Εικόνα 1.16. Παράγωγα που φέρουν ιμιδαζολικό δακτύλιο
Συγγένεια προς τους H_3 και H4 υποδοχείς (Sander *et al.* 2008)

Αν και οι ανταγωνιστές που περιέχουν ιμιδαζολικό δακτύλιο στο μόριο τους θεωρούνται ότι έχουν μικρότερη θεραπευτική αξία έναντι εκείνων χωρίς ιμιδαζολικό δακτύλιο, συνεχίζουν να αναπτύσσονται ολοένα και περισσότερες ενώσεις, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως φαρμακευτικά εργαλεία στη μελέτη των διαφόρων υποδοχέων της ισταμίνης.

Παράγωγα που δεν φέρουν ιμιδαζολικό δακτύλιο

Οι ανταγωνιστές που δεν φέρουν ιμιδαζολικό δακτύλιο περιλαμβάνουν ενώσεις που περιέχουν δευτεροταγείς και τριτοταγείς αμίνες (Εικόνα 1.17), κυρίως, με τη μορφή αλειφατικών ετεροκυκλικών ενώσεων (Sander *et al.* 2008).



Εικόνα 1.17. H_3 ανταγωνιστές που δεν φέρουν ιμιδαζολικό δακτύλιο
(α) αλκυλαμίνες βασισμένες στην απλυσαμίνη-1132, (β) παράγωγα βασισμένα στο αλκαλοειδές κονεσσίνη, (γ) βενζο[*d*]αζεπίνες, (δ) κετοπιπεραζίνες βασισμένες στη λοραταδίνη (Sander *et al.* 2008).

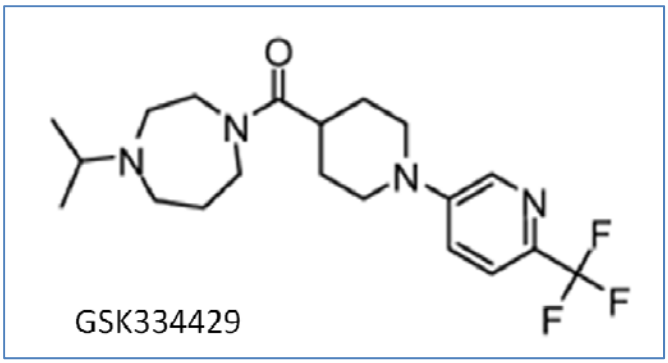
Οι ενώσεις με πιπεριδινυλο-τμήμα (Εικόνα 1.17α) έχουν γίνει αποδεκτές από μεγάλο μέρος ερευνητών (Faghih *et al.* 2003, Dvorak 2005, Morini *et al.* 2006, Sasho *et al.* 2008). Στην κατηγορία των ενώσεων αυτών ανήκει ο ανάστροφος αγωνιστής τιπρολισάντη (Εικόνα 1.17α), που μελετήθηκε σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία της επιληψίας και της νόσου του Parkinson (Raga *et al.* 2006, Ligneau *et al.* 2007). Μια άλλη δραστική ένωση είναι η NNC381202 (Εικόνα 1.17γ), που αναστέλλει το CYD 2D6 (Lau *et al.* 2006). Άλλες ενώσεις με δομή βενζιμιδαζολίου είναι η WAY361754 και τα ανάλογά της, που παρουσιάζουν βελτίωση των διαφόρων λειτουργιών στα ζώα (Jitsuoka *et al.* 2008). Η απλισαμίνη είναι παράγωγο της βρωμοτυροσίνης, που απομονώθηκε από θαλάσσιο σπόγγο *Aplysina sp.* (Xynas *et al.* 1989) και θεωρείται από τους πρώτους μη-ιμιδαζολικούς ανταγωνιστές (Εικόνα 1.17α). Ακολούθως, η ανάπτυξη των H_3 ανταγωνιστών οδήγησε σε νέες διευρυμένες δομές τόσο αναφορικά με το δακτύλιο όσο και το πλευρικό αλειφατικό τμήμα. Η πιο απλή, αλλά βασική ένωση που προέκυψε ήταν το δι-πιπεριδινικό μόριο JNJ5207852 (Εικόνα 1.17α), η οποία μελετήθηκε για την αντιμετώπιση διαταραχών του ύπνου και γνωσιακών διαταραχών (Barbier *et al.* 2004, Sander *et al.* 2008).

Ένας άλλος ανταγωνιστής, που αξίζει προσοχής, είναι η κονεσσίνη (Εικόνα 1.17β), η οποία έχει συγκρίσιμη συγγένεια για τον H_3 υποδοχέα με την απλισαμίνη, αν και προτιμούνται οι λιγότερο βασικές και περισσότερο υδρόφιλες δομές για φαρμακολογικές μελέτες (Εικόνα 1.17α), λόγω του ότι οι πιπεριδινικές δομές παρουσιάζουν μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής, εκτεταμένη κατανομή στους ιστούς και μη τοξική συσσώρευση στο ΚΝΣ.

Η φαρμακοφόρος 2,3,4,5-τετραϋδρο-1*H*-βενζο[*d*]αζεπίνο-ομάδα οδηγεί σε πολύ δραστικά και άκρως εκλεκτικά υποστρώματα. Το πρώτο βενζο(*d*)αζεπινο μόριο που σχεδιάστηκε ήταν η ουσία GSK189254 (Εικόνα 1.17γ), που δοκιμάζεται σε κλινικές μελέτες για τη θεραπεία της ναρκοληψίας (Medhurst *et al.* 2007), ενώ η GSK207040 βρέθηκε ότι μπορεί να είναι αποτελεσματική στην αντιμετώπιση γνωσιακών διαταραχών (Medhurst *et al.* 2007). Δομικά νεώτεροι ανταγωνιστές του υποδοχέα H_3 της ισταμίνης, όπως ο GSK207040 και ο GSK334429 (Εικόνα 1.17γ), έχει αναφερθεί ότι βελτιώνουν την προκληθείσα από τη σκοπολαμίνη εξασθένηση της μνήμης και τη δευτερογενή αλλοδυνία από καψαϊκίνη σε επίμυες (Medhurst *et al.* 2007).

GSK334429

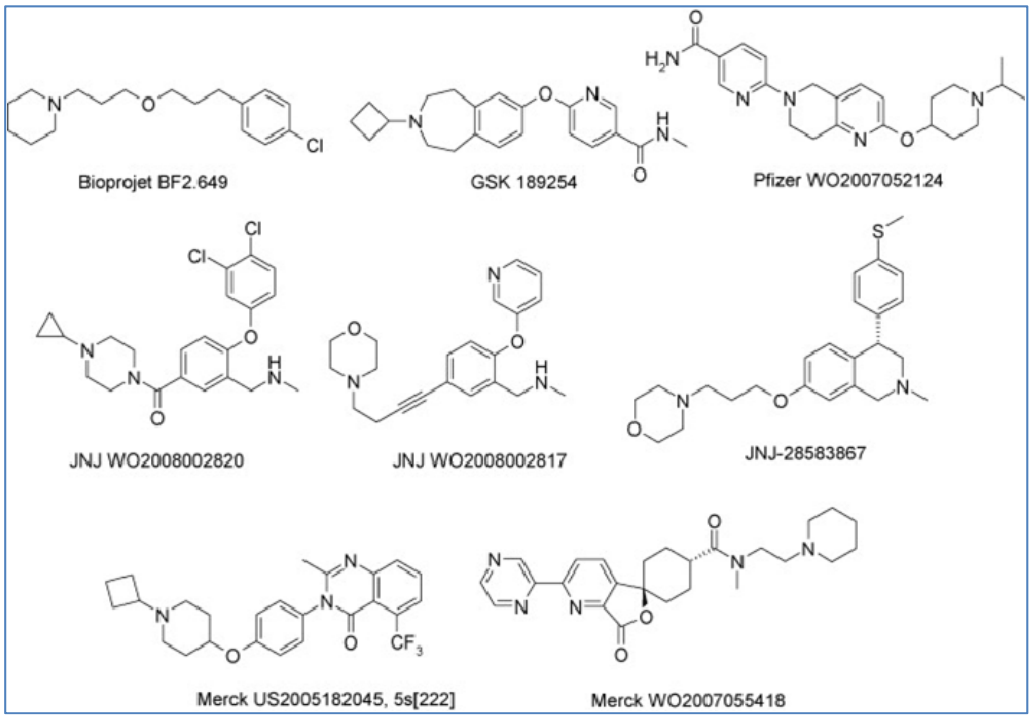
Η ουσία GSK334429 (1-(1-methylethyl)-4-({1-[6-(trifluoromethyl)-3-pyridinyl]-4-piperidinyl}carbonyl)hexahydro-1H-1,4-diazepine) είναι ισχυρός εκλεκτικός ανταγωνιστής των H_3 υποδοχέων της ισταμίνης (Εικόνα 1.18), που παρουσιάζει δράση σε πειραματικά πρότυπα προσοχής και μάθησης (Medhurst *et al.* 2007). Ιδιαίτερα υποσχόμενα είναι τα αποτελέσματα πειραμάτων σε επίμυες, που έδειξαν ότι η GSK334429 μπορεί να είναι αποτελεσματική στην αντιμετώπιση του νευροπαθητικού πόνου (Medhurst *et al.* 2008).



Εικόνα 1.18. Δομή του GSK334429
εκλεκτικού ανταγωνιστή των H_3 υποδοχέων (Medhurst *et al.* 2007, 2008)

Βρέθηκε ότι οι ουσίες GSK334429 και GSK189254 μπορούν να αναστείλουν τον πόνο που προκαλείται από το χρόνιο τραύμα συμπίεσης, την αλλοδυνία και τον μεθερπιτικό πόνο σε επίμυες (Medhurst *et al.* 2008). Το χρόνιο τραύμα συμπίεσης είναι ένα πειραματικό πρότυπο τραύματος που προκαλεί αλλοδυνία και υπεραλγησία και φαίνεται να έχει κοινά στοιχεία παθοφυσιολογίας με μια μεγάλη ποικιλία συνθηκών πόνου νευρολογικής φύσεως στην κλινική (Bennett and Xie 1988). Ο έρπης ζωστήρας είναι μολυσματικού χαρακτήρα νόσος και προσβάλλει το περιφερικό νευρικό σύστημα που προκαλείται από τον αντίστοιχο ιό. Ο πόνος είναι το κυρίαρχο σύμπτωμα με επακόλουθο τη μεθερπιτική νευραλγία, έναν νευρολογικής φύσεως πόνο που επιμένει για μήνες μέχρι και χρόνια μετά την ύφεση της χαρακτηριστικής ερυθρότητας. Κλινικο-ιολογικές συσχετίσεις δείχνουν ότι ο μεθερπιτικός πόνος είναι αποτέλεσμα του τραυματισμού του ραχιαίου ράμφους στη σπονδυλική στήλη, καθώς και του τραύματος στα περιφερικά νεύρα (Rowbotham *et al.* 1996, Fields *et al.* 1998). Τα δεδομένα δείχνουν την πιθανή εφαρμογή αυτών των ενώσεων με βραχύ χρόνο δράσης και μικρή διαπερατότητα στον εγκέφαλο, καθόσον οι H_3 υποδοχείς ρυθμίζουν τον πόνο

στο ραχιαίο κέρας και το νωτιαίο μυελό (Cannon *et al.* 2007). Στην Εικόνα 1.19 παρουσιάζονται ανταγωνιστές των H_3 υποδοχέων της ισταμίνης που είναι στο στάδιο της κλινικής αξιολόγησης.

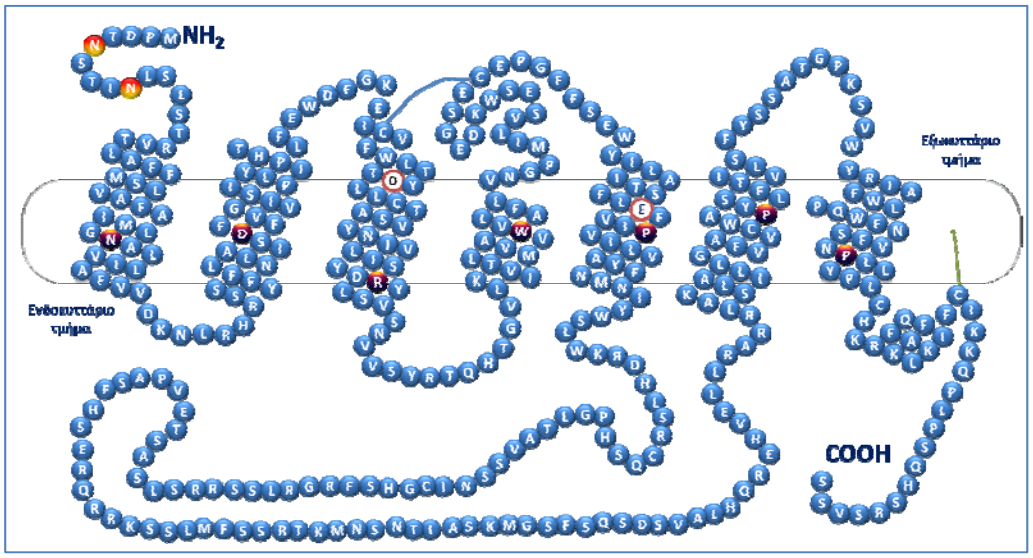


Εικόνα 1.19. Ανταγωνιστές των H_3 υποδοχέων
που αξιολογούνται σε κλινικές δοκιμές (Gemkow *et al.* 2009)

1.2.5. Ο H_4 υποδοχέας της ισταμίνης

Ο H_4 υποδοχέας της ισταμίνης (Εικόνα 1.20), που ανακαλύφθηκε πρόσφατα, φαίνεται να εμπλέκεται σε διεργασίες φλεγμονής και στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος (Thurmond *et al.* 2004, De Esch *et al.* 2005, Zampeli and Tiligada 2009, Tiligada 2012). Ο H_4 υποδοχέας εκφράζεται σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως σιτευτικά, μονοκύτταρα και Τ

λεμφοκύτταρα και σε περιφερικούς ιστούς, όπως ο σπλήνας, ο θύμος αδένας και ο εντερικός βλεννογόνος (Oda *et al*. 2000, 2002, 2005, Liu *et al*. 2001).



Εικόνα 1.20. Δομή του H_4 υποδοχέα
Ο υποδοχέας αποτελείται από 390 αμινοξέα που σχηματίζουν 7 διαμεμβρανικές έλικες, 3 εξωκυττάριους και 3 ενδοκυττάριους βρόγχους. Τα αμινοξέα Asp3.32 και Glu5.46 (λευκοί κύκλοι) είναι υπεύθυνα για τη σύνδεση της ισταμίνης. Στις διαμεμβρανικές έλικες εντοπίζονται τα συντηρημένα αμινοξέα που χαρακτηρίζουν την οικογένεια Α των υποδοχέων που προσδένονται σε πρωτεΐνες G (κόκκινοι κύκλοι). Στο εξωκυττάριο Ν-τελικό άκρο εντοπίζονται σημεία γλυκοσυλίωσης στα αμινοξέα Asn5 και Asn9. Μεταξύ των υπολειμμάτων κυστεΐνης της $3^{ης}$ διαμεμβρανικής έλικας και του $2^{ου}$ βρόγχου σχηματίζεται δισουλφιδικός δεσμός (Leurs *et al*. 2009)

Αν και η τεταρτοταγής δομή του υποδοχέα δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη, το πρώτο δομικό μοντέλο που δημιουργήθηκε με βάση την κρυσταλλική δομή της βόειας ροδοψίνης βοήθησε στον προσδιορισμό των αμινοξέων Asp94 και Glu182 ως σημείων σύνδεσης της ισταμίνης και, ακολούθως, ενεργοποίησης του υποδοχέα (Palczewski *et al*. 2000, Shin *et al.* 2002, Werner *et al*. 2010). Ένα δεύτερο μοντέλο βασισμένο, επίσης, στη

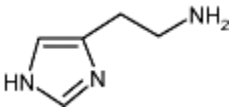
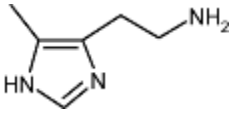
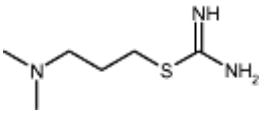
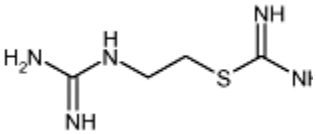
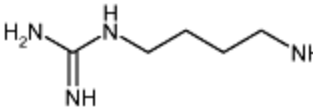
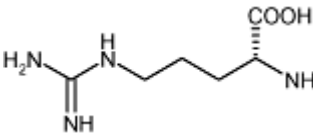
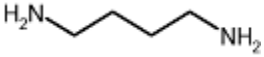
ροδοψίνη χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για την ταυτοποίηση άλλων H_4 υποστρωμάτων (Kiss *et al*. 2008).

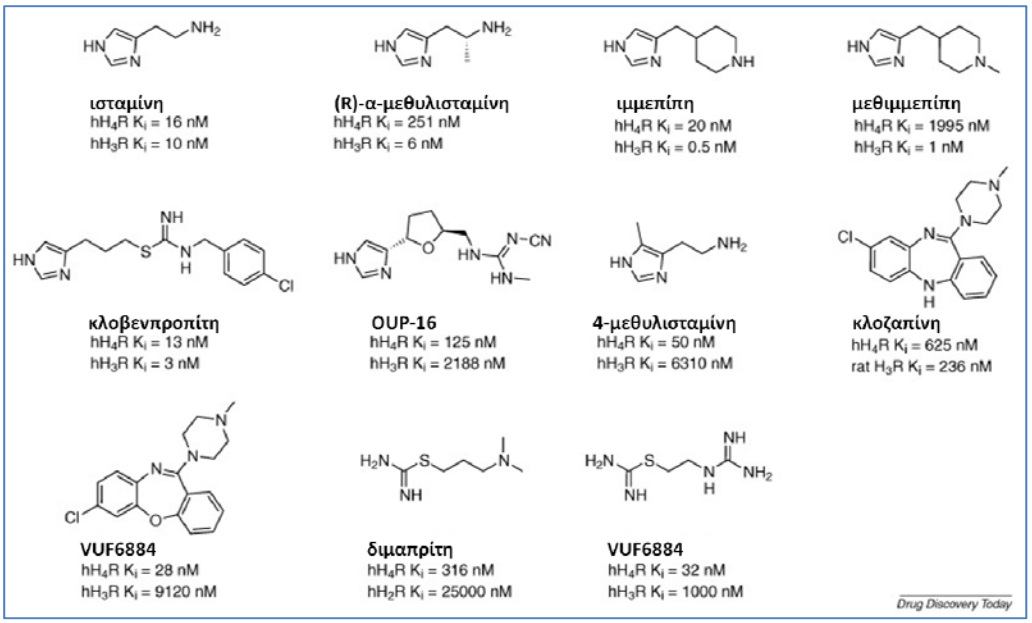
Ο H_4 υποδοχέας προάγει τη χημειοταξία των μαστοκυττάρων μεταβάλλοντας τα επίπεδα του cAMP (Hofstra *et al.* 2003). Στο μυελό των οστών ρυθμίζει την απελευθέρωση των ουδετερόφιλων και την επακόλουθη διήθηση τους στην άσηπτη πλευρίτιδα σε επίμυες (Takeshita *et al.* 2004). Από κοινού με τον H_2, ο H_4 υποδοχέας εμπλέκεται στην έκκριση της ιντερλευκίνης 16 (IL-16) από τα $CD8^+$ Τ λεμφοκύτταρα (Gantner *et al.* 2002). Προκλινικά αποτελέσματα ενισχύουν τη θεραπευτική δυναμική των προσδεμάτων του H_4 υποδοχέα στην αλλεργία, τη φλεγμονή, τα αυτοάνοσα νοσήματα και ίσως στον καρκίνο (Takeshita *et al*. 2003, Fung-Leung *et al.* 2004, Thurmond *et al*. 2004, Tiligada *et al.* 2009, Zampeli and Tiligada 2009).

ΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΤΩΝ H_4 ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

Στους κυριότερους αγωνιστές των H_4 υποδοχέων ανήκουν η 4-μεθυλ-ισταμίνη και η VUF8430 (Πίνακας 1.2, Εικόνα 1.21), οι οποίοι παρουσιάζουν ποικίλη συγγένεια και εκλεκτικότητα τόσο για τον H_3 όσο και για τον H_4 υποδοχέα σε διάφορα είδη (Lim *et al.* 2009, Smits *et al.* 2009).

Πίνακας 1.2. Συγγένεια (pK_i) αγωνιστών του H_4 υποδοχέα στην κυτταρική σειρά SK-N-MC διαφόρων ειδών (Lim *et al.* 2009)

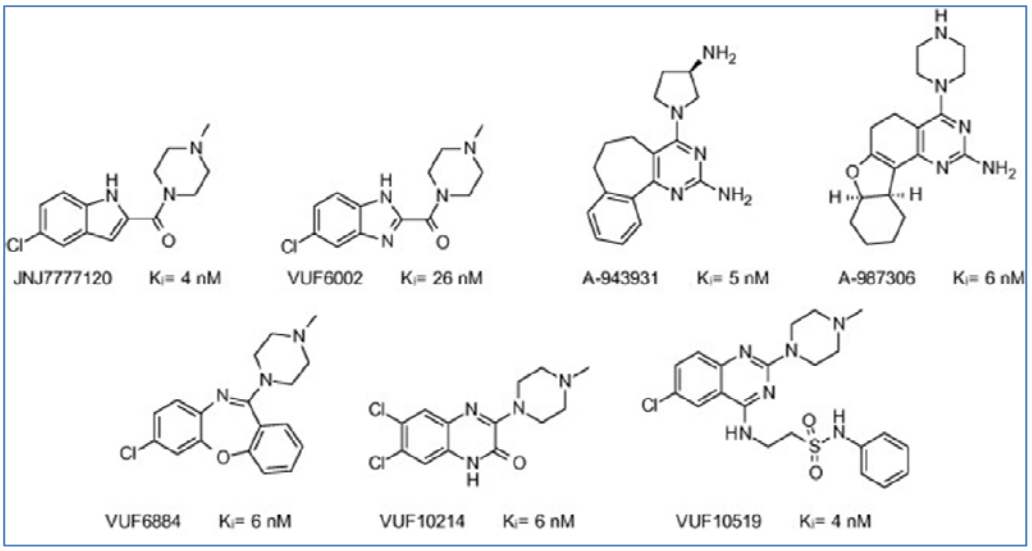
ΠΡΟΣΔΕΜΑ	ΔΟΜΗ	pK_i ΑΝΘΡΩΠΟΣ	ΜΥΣ	ΕΠΙΜΥΣ
Ισταμίνη		7.9 ± 0.1	7.4 ± 0.1	7.3 ± 0.1
4-μεθυλ-ισταμίνη		7.6 ± 0.1	7.2 ± 0.1	6.7 ± 0.1
Διμαπρίτη		6.8 ± 0.1	6.2 ± 0.1	6.0 ± 0.1
VUF 8430		7.5 ± 0.1	7.0 ± 0.1	6.9 ± 0.1
Αγματίνη		5.6 ± 0.1	5.1 ± 0.1	5.1 ± 0.2
L-αργινίνη		< 3		
Πουτρεσίνη		4.9 ± 0.1		
Καδαβερίνη		4.7 ± 0.1		
Σπερμιδίνη	NH_2-$(CH_2)_4$-NH-$(CH_2)_3$-NH_2	3.7 ± 0.1		
Σπερμίνη	NH_2-$(CH_2)_3$-NH-$(CH_2)_4$-NH-$(CH_2)_3$-NH_2	4.3 ± 0.1		



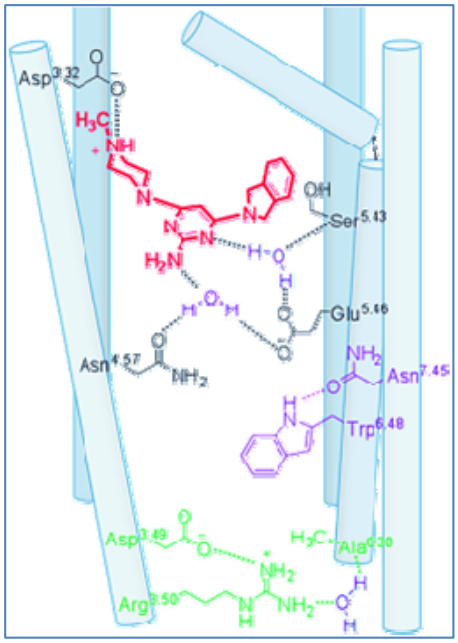
Εικόνα 1.21. Αγωνιστές του H_4 υποδοχέα
με διάφορα προφίλ εκλεκτικότητας για τον ανθρώπινο H_3 (hH_3R) και H_4 (hH_4R) υποδοχέα (Smits *et al.* 2009)

ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΤΩΝ H_4 ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

Οι κυριότερες ενώσεις που δρουν ανταγωνιστικά στους H_4 υποδοχείς είναι οι θειοπεραμίδη (Εικόνα 1.16), JNJ7777120, VUF6002, A987306 και A943931 (Εικόνα 1.22). *In silico* μελέτες προσομοίωσης αποκάλυψαν διαφορετικούς τρόπους σύνδεσης των μερικών και των ανάστροφων αγωνιστών του H_4 υποδοχέα (Werner *et al*. 2010).



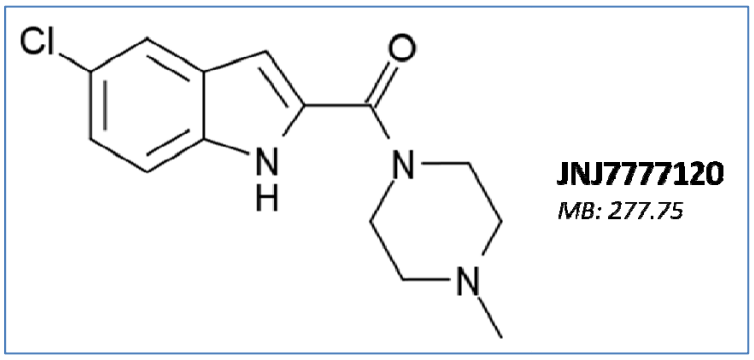
Εικόνα 1.22. Ανταγωνιστές του H_4 υποδοχέα
με διάφορα προφίλ εκλεκτικότητας για τον ανθρώπινο H_3 (hH_3R) και H_4 (hH_4R) υποδοχέα (Smits *et al.* 2009)



Εικόνα 1.23. Θέση πρόσδεσης στον H_4 υποδοχέα
Η προσομοίωση του ανθρώπινου H_4 υποδοχέα ισταμίνης αποκαλύπτει διαφορετικούς τρόπους σύνδεσης των μερικών και ανάστροφων αγωνιστών της κατηγορίας των αμινοπυριμιδινών. Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της $3^{ης}$ και $6^{ης}$ διαμεμβρανικής περιοχής που σχηματίζουν "ψευδο-ιοντική κλειδαριά" ανιχνεύθηκαν στο μοντέλο του ανθρώπινου H_4 υποδοχέα (Werner *et al.* 2010)

JNJ7777120

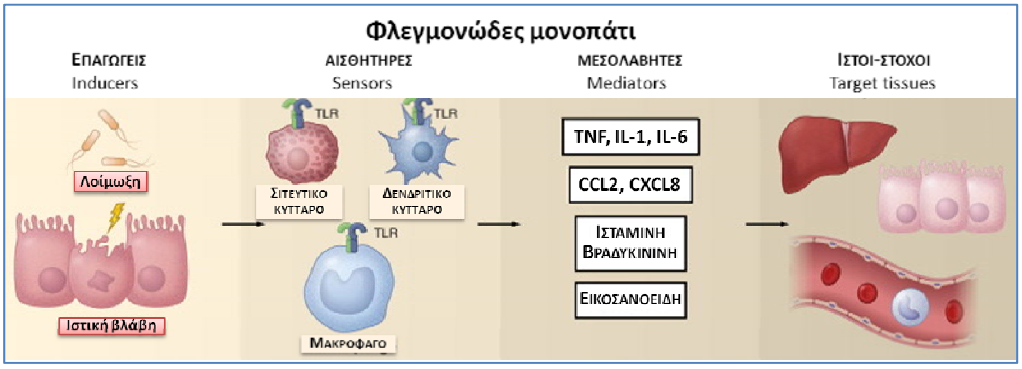
Ο ισχυρός εκλεκτικός H_4 ανταγωνιστής JNJ7777120 (Εικόνα 1.24) χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα ως πρότυπη ουσία για τη φαρμακολογική διερεύνηση του παθοφυσιολογικού ρόλου των H_4 υποδοχέων (Jablonowski *et al.* 2003, Jiang *et al.* 2008). Ο JNJ7777120 προσδένεται με μεγάλη συγγένεια στον H_4 υποδοχέα, αποδεικνύεται 1000 φορές πιο εκλεκτικός για τον H_4 υποδοχέα σε σχέση με τους άλλους υποδοχείς της ισταμίνης και τα προκλινικά δεδομένα υποστηρίζουν την ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση του (Thurmond *et al.* 2004, Dunford *et al.* 2007). Αρχικά είχε θεωρηθεί ότι η δραστικότητα του δε διαφοροποιείται στα διάφορα είδη, παρά τις διαφορές στην αμινοπεπτιδική αλληλουχία του υποδοχέα (Liu *et al.* 2001). Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν τις εξαρτώμενες από το είδος και τον ιστό ιδιότητες του JNJ7777120 (Coruzzi *et al.* 2012) και κατατάσσουν τον H_4 υποδοχέα στην ομάδα των υποδοχέων που παρουσιάζουν λειτουργική εκλεκτικότητα (Seifert *et al.* 2011).



Εικόνα 1.24. Δομή του JNJ7777120
εκλεκτικού ανταγωνιστή των H_4 υποδοχέων (5-χλωρο-1Η-ινδολο-2-υλ)-καρβονυλ]-4-μεθυλπιπεραζίνη)

1.3. Η Ισταμίνη στη Φλεγμονή

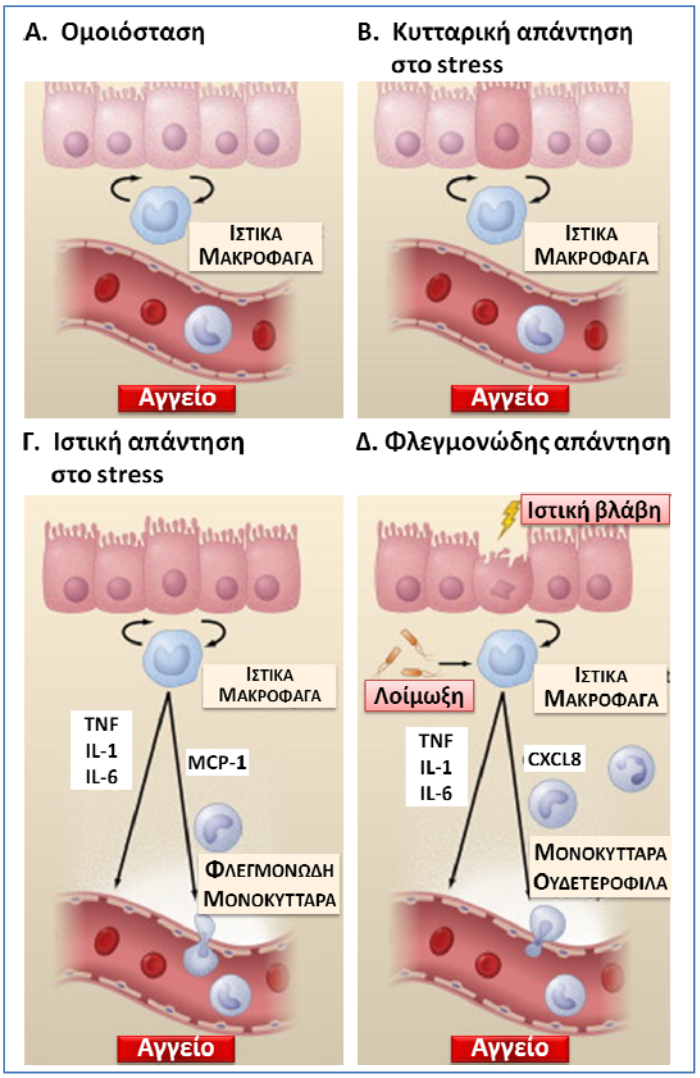
Η φλεγμονή είναι μέρος μιας πολύπλοκης βιολογικής απάντησης των αγγειακών ιστών σε επικίνδυνες προκλήσεις, όπως παθογόνοι μικροοργανισμοί, τραυματισμένα ή κατεστραμμένα κύτταρα, τοξίνες ή χημικές ουσίες που προκαλούν ερεθισμό (Εικόνα 1.25). Τα συμπτώματα της φλεγμονής καταγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Celsus τον 1^{ο} μ.Χ. αιώνα (Πίνακας 1.3) και περιλαμβάνουν πόνο, ερυθρότητα, πυρετό και οίδημα (βλέπε Scott *et al.* 2004, Medzhitov 2010). Η φλεγμονή είναι μια προστατευτική προσπάθεια του οργανισμού να απομακρύνει τη βλάβη και να ενεργοποιήσει τη διαδικασία επιδιόρθωσης (Εικόνα 1.26). Ως απάντηση του οργανισμού σε όλες τις προκλήσεις δεν είναι ταυτόσημη με τη λοίμωξη, ακόμη και στην περίπτωση που προκαλείται από μόλυνση (Abbas and Lichtman 2009). Υπό τους όρους αυτούς, η φλεγμονή είναι μια στερεότυπη απάντηση και θεωρείται ως μηχανισμός έμφυτης ανοσίας.



Εικόνα 1.25. Η φλεγμονώδης απάντηση
Η φλεγμονώδης απάντηση αποτελείται από επαγωγείς, αισθητήρες (π.χ. υποδοχείς TLRs), μεσολαβητές (π.χ. κυτταροκίνες, χημειοκίνες, βιογενείς αμίνες, εικοσανοειδή) και ιστούς-στόχους, όπου οι μεσολαβητές προκαλούν λειτουργικές αλλαγές που οδηγούν στην προσαρμογή στις επιβλαβείς συνθήκες (π.χ. λοίμωξη ή βλάβη ιστού) (Medzhitov 2010)

Πίνακας 1.3. Ορισμός της φλεγμονής
από τον 1^{ο} αιώνα μ.Χ. έως σήμερα (Scott *et al.* 2004)

ΑΠΟΣΠΑΣΜΑ	ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΕΡΜΗΝΕΙΑ	ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΣΗΜΑΣΙΑ
Celsus - 1ος αι μ.Χ. *rubor et tumor cum calore et dolore*	1^{η} τεκμηρίωση των σημείων της φλεγμονής	Σημασία της κλινικής παρατήρησης
Γαληνός - 3ος αι μ.Χ. *laudable pus*	Η μόλυνση & η φλεγμονή είναι ωφέλιμες για την επούλωση των πληγών	Η φλεγμονή ως έκφραση της χυμικής θεωρίας
Virchow - 1871 *The inflammatory reaction is a consequence of an excessive intake by interstitial cells, of food...filtering through the vessel wall*	Η φλεγμονή ως παθολογικός κυτταρικός πολλαπλασιασμός εξαιτίας της διαρροής των θρεπτικών ουσιών από τα αγγεία	Κυτταρική φύση της φλεγμονώδους αντίδρασης
Cohnheim - 1873 *Finally...there lies outside the vessel...a colourless blood corpuscle*	Έμμορφα στοιχεία του αίματος ως παθολογικοί μηχανισμοί εξάπλωσης της λοίμωξης, δευτερογενώς της αγγειακής βλάβης	1^{η} περιγραφή της διαπίδυσης λευκοκυττάρων από τα τοιχώματα των αγγείων
Metchnikoff - 1908 *the primum movens of the inflammatory reaction is a digestive action...toward the noxious agent*	Η φλεγμονή ως αμυντική κυτταρική απόκριση σε παθογόνους παράγοντες, καθοδηγούμενη από τα αγγεία	Προστατευτικός και όχι παθολογικός ρόλος των φαγοκυττάρων
Lewis - 1927 *the triple response to injury*	Η φλεγμονή χαρακτηρίζεται από αγγειακά επεισόδια που προκαλούνται από τοπικές χημικές ουσίες και νευράξονες	1^{η} αναγνώριση της νευρογενούς φλεγμονής & φυσιολογικός χαρακτηρισμός των αγγειακών συμβαμάτων
Rocha e Silva - 1974 *multi-mediated phenomenon, of a pattern type in which all mediators would come and go at the appropriate moment...increasing vascular permeability, attracting leucocytes, producing pain, local edema and necrosis*	Η φλεγμονή ορίζεται από μεσολαβητές	Βιοχημικός ορισμός της φλεγμονής



Εικόνα 1.26. Η φλεγμονή ως προσαρμοστική απόκριση του οργανισμού

Η φλεγμονή είναι μια προσαρμοστική απόκριση του οργανισμού σε επιβλαβή ερεθίσματα. (Α) Σε φυσιολογικές συνθήκες τα μακροφάγα διατηρούν την ομοιόσταση των ιστών με την αφαίρεση νεκρών κυττάρων μέσω παραγωγής αυξητικών παραγόντων. (Β) Σε επιβλαβείς συνθήκες ενεργοποιείται η προσαρμοστική κυτταρική απάντηση. (Γ) Εάν η φύση ή/και η έκταση του stress επηρεάζει ολόκληρο τον ιστό (π.χ. υποξία ή υπερθερμία) τότε ενεργοποιείται η απάντηση σε επίπεδο ιστού με τη συμμετοχή μακροφάγων και, σε μερικούς ιστούς, σιτευτικών κυττάρων. Ανάλογα με την ένταση των επιβλαβών ερεθισμάτων η απόκριση μπορεί να περιλαμβάνει κυκλοφορούντα μονοκύτταρα. (Δ) Αν η κατάσταση είναι αρκετά σοβαρή (π.χ. λοίμωξη ή τραυματισμός) ακολουθεί η οξεία φλεγμονώδης απόκριση, η οποία χαρακτηρίζεται από πρόσληψη ουδετερόφιλων και εξειδικευμένων μονοκυττάρων από την κυκλοφορία, που βοηθούν στην προστασία του ξενιστή και προάγουν την επιδιόρθωση του ιστού και την αποκατάσταση της ομοιόστασης (Medzhitov 2010). IL: ιντερλευκίνη, MCP: χημειοτακτική πρωτεΐνη μονοκυττάρων, TNF: ογκονεκρωτικός παράγοντας

1.3.1. Χαρακτηριστικά της Φλεγμονής

Η φλεγμονή διακρίνεται σε οξεία και χρόνια. Η οξεία φλεγμονή είναι η αρχική απάντηση σε επιβλαβές ερέθισμα (Εικόνα 1.26), επιτυγχάνεται με μετακίνηση πλάσματος και λευκοκυττάρων, ιδιαιτέρως κοκκιοκυττάρων, από το αίμα στον πάσχοντα ιστό και ακολουθείται από μία σειρά βιοχημικών αντιδράσεων στο τοπικό αγγειακό σύστημα, το ανοσοποιητικό σύστημα και τον ιστό (Libby 2007). Η παρατεταμένη ή χρόνια φλεγμονή χαρακτηρίζεται από σταδιακή μετακίνηση των κυττάρων στο σημείο της φλεγμονής και επιδιόρθωση του ιστού. Η οξεία φλεγμονή εμφανίζεται συνήθως μερικά λεπτά ή λίγες ώρες μετά την επίδραση του αιτίου και χαρακτηρίζεται από πόνο, πυρετό, οίδημα, ερυθρότητα και απώλεια της ιστικής λειτουργίας. Τα πρώτα τέσσερα σημεία αναφέρθηκαν για πρώτη φορά από τον Celsus, ενώ το πέμπτο προστέθηκε αργότερα (Scott *et al.* 2004, Porth 2007).

Η οξεία φλεγμονή ξεκινάει από κύτταρα που βρίσκονται σε όλους τους ιστούς και διαθέτουν υποδοχείς αναγνώρισης των φλεγμονωδών ερεθισμάτων, κυρίως μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, κύτταρα Kupffer και μαστοκύτταρα (Takeuchi and Akira 2010, Ingersoll *et al.* 2011). Η ενεργοποίηση των κυττάρων οδηγεί σε έκλυση μεσολαβητών, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τα κλινικά συμπτώματα που παρατηρούνται στη φλεγμονή (Πίνακας 1.4).

Πίνακας 1.4. Μεσολαβητές και κύρια συμπτώματα της φλεγμονής που προκαλούνται από τους φλεγμονώδεις μεσολαβητές

ΣΥΜΠΤΩΜΑ	ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΗΣ
Αγγειακή διαπερατότητα	▪ Ισταμίνη και άλλες αγγειοδραστικές αμίνες ▪ Βραδυκινίνη ▪ Λευκοτριένια (LTC_4, LTD_4, LTE_4) ▪ Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) ▪ Συμπλήρωμα (C3a, C5a) ▪ Ουσία P ▪ Μονοξείδιο του αζώτου (NO)
Αγγειοδιαστολή	▪ Μονοξείδιο του αζώτου (NO) ▪ Προσταγλανδίνες (PGI_2, PGE_1, PGE_2, PGD_2) ▪ H_2O_2
Αγγειοσύσπαση	▪ Θρομβοξάνη TXA_2 ▪ Λευκοτριένια (LTC_4, LTD_4, LTE_4) ▪ H_2O_2
Χημειοταξία & προσκόλληση λευκοκυττάρων	▪ Ισταμίνη ▪ Χημειοκίνες ▪ Λευκοτριένια (LTB_4) ▪ Λιποξίνες ▪ Συμπλήρωμα (C5a) ▪ Βακτηριακά αντιγόνα ▪ H_2O_2
Πόνος	▪ Βραδυκινίνη ▪ Προσταγλανδίνες ▪ H_2O_2
Πυρετός	▪ Κυτταροκίνες (TNF, IL-1, IL-6) ▪ Προσταγλανδίνες
Βλάβες ιστών και ενδοθηλίου	▪ Ενεργές ρίζες οξυγόνου ▪ Μονοξείδιο του αζώτου (NO) ▪ Ένζυμα

IL: ιντερλευκίνη, TNF: ογκονεκρωτικός παράγοντας

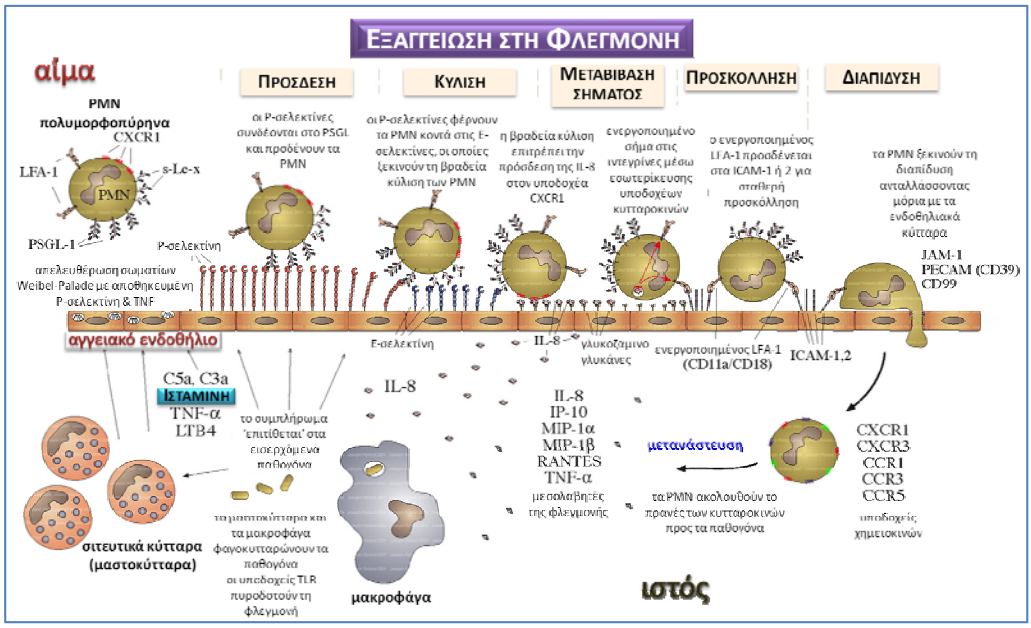
1.3.2. Ο Ρόλος των Αγγείων στη Φλεγμονή

Οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές τροποποιούν τα αιμοφόρα αγγεία και επιτρέπουν τη μετανάστευση λευκοκυττάρων από τα αγγεία στους ιστούς. Διάφορα άλλα μη κυτταρικά βιοχημικά συστήματα δρουν παράλληλα κατά την έναρξη και την διάδοση της φλεγμονής, όπως το συμπλήρωμα και το σύστημα θρόμβωσης και ινωδόλυσης (Zipfel and Skerka 2009). Γενικά, οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές έχουν μικρό χρόνο ζωής και διασπώνται γρήγορα μέσα στον ιστό.

Η οξεία φλεγμονή χαρακτηρίζεται από σημαντικές αλλαγές στα αγγεία, όπως διαστολή, αυξημένη διαπερατότητα και μειωμένη ροή του αίματος, που επάγονται από τη δράση διαφόρων μεσολαβητών της φλεγμονής (Πίνακας 1.4). Η διαστολή ξεκινάει από τα αρτηρίδια, συνεχίζει στα τριχοειδή και αυξάνει σημαντικά την ποσότητα του αίματος στην περιοχή της φλεγμονής, προκαλώντας ερυθρότητα και πυρετό. Η αυξημένη διαπερατότητα των αγγείων συντελεί στη μετακίνηση του πλάσματος στο φλεγμαίνοντα ιστό με αποτέλεσμα τη στάση, λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης των κυττάρων στο αίμα, κατάσταση που χαρακτηρίζεται από διευρυμένα αγγεία που βρίθουν κυττάρων.

Κατά την φλεγμονώδη απάντηση, τα λευκοκύτταρα μετακινούνται μέσω των αιμοφόρων αγγείων από το αίμα στην πάσχουσα περιοχή με τη διαδικασία της εξαγγείωσης (Εικόνα 1.27, Barreiro *et al.* 2010, Wong *et al.* 2010). Ορισμένα λευκοκύτταρα φαγοκυτταρώνουν βακτήρια, ιούς και υπολείμματα κυττάρων. Άλλα εκκρίνουν ένζυμα από τα κοκκία τα οποία καταστρέφουν τα παθογόνα αίτια. Τα λευκοκύτταρα εκκρίνουν επίσης μεσολαβητές της φλεγμονής, μεταξύ των οποίων σημαντικό ρόλο

διαδραματίζει η ισταμίνη, που απελευθερώνεται κυρίως από τα παρακείμενα των αγγείων σιτευτικά κύτταρα (Εικόνα 1.27). Γενικά, τα κοκκιοκύτταρα διέπουν την οξεία φλεγμονή, ενώ τα μονοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα τη χρόνια.



Εικόνα 1.27. Η εξαγγείωση στη φλεγμονή
ICAM: διακυττάριο μόριο προσκόλλησης, IL: ιντερλευκίνη, LFA: αντιγόνο σχετιζόμενο με τη λειτουργία των λεμφοκυττάρων, PSGL: γλυκοπρωτεΐνη πρόσδεμα της P-σελεκτίνης, TLR: υποδοχέας Toll-like, TNF: ογκονεκρωτικός παράγοντας

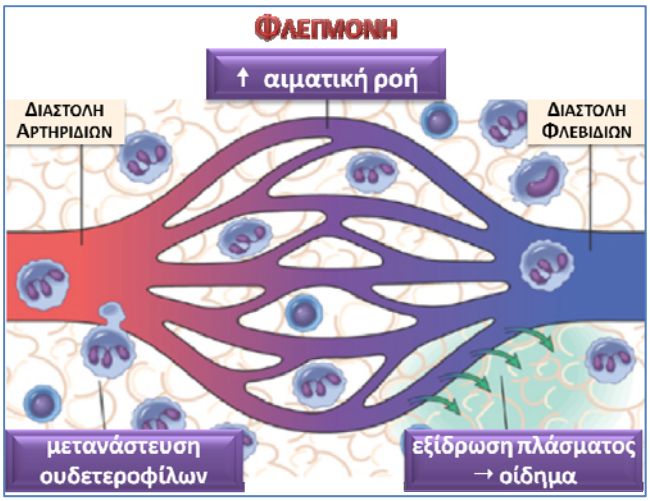
Η εξαγγείωση (Εικόνα 1.27) περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια (Barreiro *et al.* 2010, Wong *et al.* 2010):

- Εντοπισμός των λευκοκυττάρων, μετακίνηση και προσκόλληση τους στο ενδοθήλιο. Η επιλογή και ο εντοπισμός των λευκοκυττάρων διευκολύνεται μέσω των υποδοχέων των μεσολαβητών που διαθέτουν. Η ισταμίνη αποτελεί σημαντικό μεσολαβητή για την έναρξη της διαδικασίας, αφού

επάγει την έκφραση της P-σελεκτίνης στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στη συνέχεια, οι κυτταροκίνες επάγουν την έκφραση της E-σελεκτίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς και την έκφραση μορίων προσκόλλησης, όπως το διακυττάριο μόριο προσκόλλησης ICAM-1 και η πρωτεΐνη προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων VCAM-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία σταματούν τη ροή των λευκοκυττάρων και προάγουν την προσκόλληση τους στο ενδοθήλιο

- Οι χημειοκίνες ενεργοποιούν τα προσκολλημένα λευκοκύτταρα κατά μήκος του ενδοθηλίου, προκειμένου να μετακινηθούν διαμέσου των ενδοθηλιακών κυττάρων και να περάσουν τη βασική μεμβράνη προς τους ιστούς με τη διαδικασία της διαπίδυσης
- Τα λευκοκύτταρα, φθάνοντας στα ενδιάμεσα κύτταρα, ενώνονται με εξωκυττάριες πρωτεΐνες μέσω ιντεγγρινών και CD44. Ειδικές χημικές ουσίες παρεμβαίνουν και μετακινούν τα λευκοκύτταρα κατά μήκος του χημειοτακτικού πρανούς προς την περιοχή της φλεγμονής

Εκτός από τη μετανάστευση των κυττάρων, μετακινείται και πλάσμα στον πάσχοντα ιστό, που περιέχει πρωτεΐνες, όπως το ινώδες και οι ανοσοσφαιρίνες, κατά τη διαδικασία της εξίδρωσης (Εικόνα 1.28). Η μετακίνηση διευκολύνεται από χημικά επαγόμενη διαστολή και αυξημένη διαπερατότητα των αγγείων, που συντελεί στην απώλεια πλάσματος (Kenne and Lindbom 2011). Η αυξημένη συλλογή υγρού στον ιστό προκαλεί οίδημα. Στον Πίνακα 1.5 παρουσιάζονται οι μεσολαβητές της φλεγμονής που προέρχονται από το πλάσμα και οι λειτουργίες τους.



Εικόνα 1.28. Αγγειακές μεταβολές στη φλεγμονή

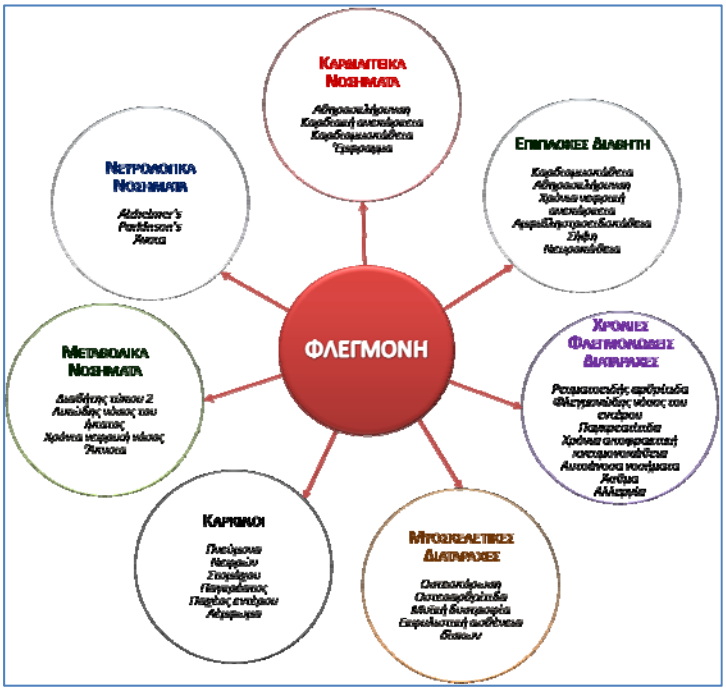
Πίνακας 1.5. Φλεγμονώδεις μεσολαβητές προερχόμενοι από το πλάσμα

ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΗΣ	ΠΗΓΗ	ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
Βραδυκινίνη	Σύστημα κινινών	Αγγειοδραστική πρωτεΐνη: Αγγειοδιαστολή, αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, σύσπαση των λείων μυών, επαγωγή πόνου
C3	Σύστημα συμπληρώματος	Διασπάται σε C3a και C3b. C3a: έκκριση ισταμίνης (αγγειοδιαστολή) C3b: δεσμεύεται στα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων, αντιδρά με την οψονίνη, επισημαίνει τους εισβολείς ως στόχους για φαγοκυττάρωση
C5a	Σύστημα συμπληρώματος	Έκκριση ισταμίνης (αγγειοδιαστολή) Χημειοτακτικός παράγοντας
Σύμπλοκο προσβολής των μεμβρανών (MAC)	Σύστημα συμπληρώματος	Σύμπλεγμα των C5b, C6, C7, C8, C9 Σχηματίζει σύμπλοκο με τις μεμβράνες του κυττάρου και διαπερνά το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων προκαλώντας λύση και θάνατο του κυττάρου
Παράγοντας XII	Ήπαρ	Ενεργοποιείται από το κολλαγόνο, τα αιμοπετάλια ή βασικές μεμβράνες. Στη συνέχεια ενεργοποιεί τα συστήματα των κινινών, της ινωδόλυσης και της συγκόλλησης στο πλάσμα
Πλασμίνη	Σύστημα ινωδόλυσης	Διασπά τους θρόμβους του ινώδους, την C3, και ενεργοποιεί τον παράγοντα XII
Θρομβίνη	Σύστημα θρόμβωσης	Μετατρέπει το διαλυτό ινωδογόνο σε αδιάλυτο ινώδες προς σχηματισμό θρόμβου. Το ινώδες προσδένεται στα κύτταρα μέσω του PAR1 και ενεργοποιεί άλλες φλεγμονώδεις απαντήσεις, όπως σύνθεση χημειοκινών και NO

MAC: σύμπλοκο προσβολής των μεμβρανών, NO: μονοξείδιο του αζώτου, PAR: υποδοχέας ενεργοποιούμενος από προτεάσες

1.3.3. Φλεγμονώδεις Διαταραχές – Ρευματικές Παθήσεις

Οι φλεγμονώδεις διαταραχές αποτελούν μια μεγάλη ομάδα παθολογικών καταστάσεων που χαρακτηρίζουν πλήθος ασθενειών στον άνθρωπο (Εικόνα 1.29), στις οποίες συχνά, αλλά όχι πάντα, εμπλέκεται το ανοσοποιητικό σύστημα (Contran *et al.* 1998).



Εικόνα 1.29. Φλεγμονώδεις διαταραχές

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι μια χρόνια συστηματική φλεγμονώδης νόσος, στην οποία, εκτός από τις περιφερικές αρθρώσεις, προσβάλλονται πολλοί ιστοί και όργανα (Szekanecz and Koch 2008). Η πρώτη αναφορά στη ρευματοειδή αρθρίτιδα έγινε το 1800 από τον Augustin Jacob Landré-Beauvais. Σήμερα, προσβάλλεται το 0.5-1% του παγκόσμιου πληθυσμού. Ο αριθμός των γυναικών είναι 2-3πλάσιος αυτού των ανδρών και αφορά κυρίως

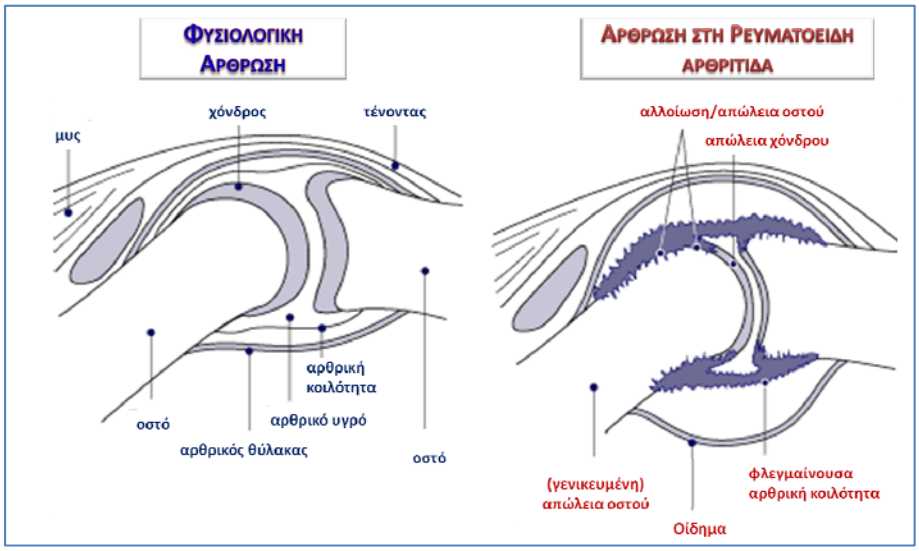
τις ηλικίες των 40-60 ετών, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι άτομα άλλων ηλικιών δεν μπορεί να προσβληθούν (Gabriel and Michaud 2009). Μία πρόσφατη επιδημιολογική μελέτη, που διενεργήθηκε στο νομό Μαγνησίας, έδειξε ότι, τουλάχιστον σε αυτή την περιοχή της κεντρικής Ελλάδας, οι ρευματικές παθήσεις είναι κοινές και επηρεάζουν σχεδόν το 25% του ενήλικου πληθυσμού (Anagnostopoulos *et al.* 2010).

Πίνακας 1.6. Επιπολασμός των ρευματικών παθήσεων στην Κεντρική Ελλάδα (Anagnostopoulos *et al.* 2010)

ΝΟΣΟΣ	**ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ (%)**	**ΗΛΙΚΙΑ (ΕΤΗ)**	**♀ : ♂**
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	0.57 (0.32-0.87)	46.8 ± 14.9	2.3:1
Αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα	0.29 (0.28-0.94)	43.5 ± 15.0	1: 4
Ψωριασική αρθρίτιδα	0.35 (0.33-1.33)	41.6 ± 2.2	2:1
Σύνδρομο Sjogren	0.23 (0.22-0.75)		
Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος	0.11		
Συστηματική σκλήρυνση	0.06		
Δερματομυοσίτιδα	0.06		
Αγγειίτιδα	0.11		
Ουρική αρθρίτιδα	4.71 (4.41-5.13)	63.0 ± 7.8	0:8
Οστεοαρθρίτιδα	17.82 (16.5-19.3)	65.6 ± 7.7	2.7:1

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι φλεγμονή των αρθρώσεων στην οποία συχνά παρατηρείται αλλοίωση και καταστροφή του αρθρικού χόνδρου και αγκύλωση των αρθρώσεων (Εικόνα 1.30). Η φλεγμονή μπορεί διαχυθεί στους πνεύμονες, το περικάρδιο, τα πέταλα του υπεζωκότα και τους οφθαλμούς (Davis *et al.* 2012). Αν και η αιτιολογία της δεν είναι γνωστή, η ρευματοειδής αρθρίτιδα ανήκει στα χρόνια αυτοάνοσα νοσήματα (Majithia and Geraci 2007). Η φαρμακολογική αντιμετώπιση περιλαμβάνει αναλγητικά,

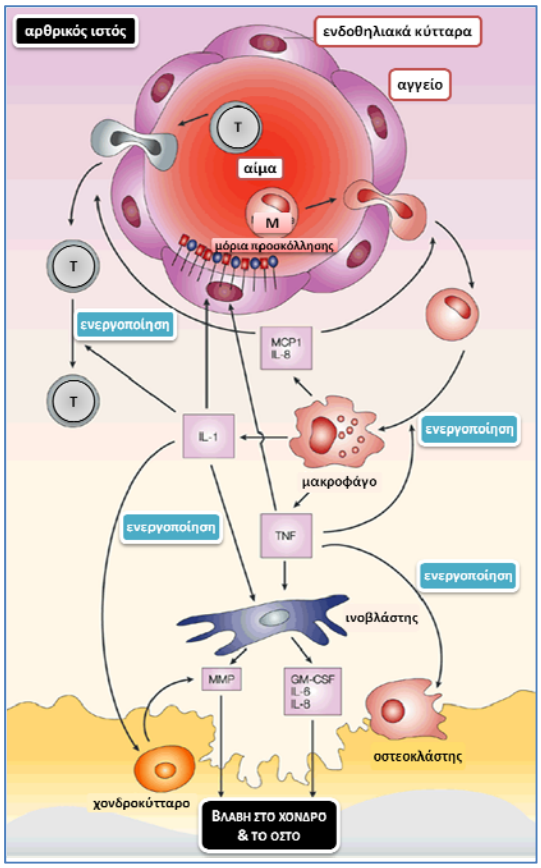
αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, κορτικοειδή και νεώτερους βιολογικούς παράγοντες (Horton and Emery 2012).



Εικόνα 1.30. Μεταβολές στις αρθρώσεις στη ρευματοειδή αρθρίτιδα

1.3.4. Ο Ρόλος των Αγγείων στις Φλεγμονώδεις Ρευματικές Παθήσεις

Τα αγγεία εμπλέκονται στην παθογένεια των φλεγμονωδών ρευματικών παθήσεων (Εικόνα 1.31), οι οποίες έχουν συσχετισθεί με αγγειακή φλεγμονή, αγγειογένεση, αθηροσκλήρυνση και αυξημένη καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνησιμότητα (Pope 2002, Szekanecz and Koch 2008). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μόρια προσκόλλησης και οι μεσολαβητές της φλεγμονής διαδραματίζουν πρωταρχικό ρόλο στη στρατολόγηση λευκοκυττάρων στο αρθρικό υγρό κατά την αγγειακή φλεγμονή (Pope 2002, Szekanecz and Koch 2008).

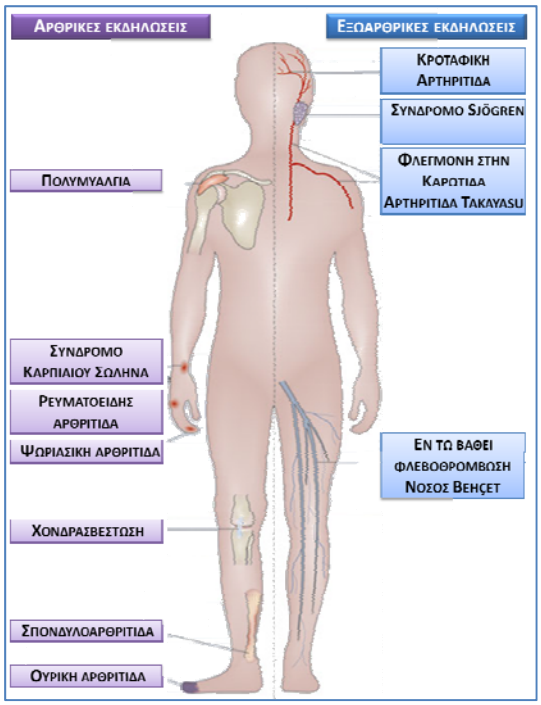


Εικόνα 1.31. Τα αγγεία στην παθογένεια της αρθρίτιδας
Τα μονοκύτταρα προσελκύονται στην άρθρωση, όπου διαφοροποιούνται σε μακροφάγα, ενεργοποιούνται και εκκρίνουν χημειοκίνες και κυτταροκίνες όπως ο ογκονεκρωτικός παράγοντας (TNF), ο οποίος αυξάνει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα και συνεπώς τη μετανάστευση περισσότερων κυττάρων στην άρθρωση. Οι αρθρικοί ινοβλάστες εκφράσουν κυτταροκίνες, χημειοκίνες και αυξητικούς παράγοντες που συμβάλλουν στις βλάβες που παρατηρούνται στο χόνδρο και τα οστά (Pope 2002). GM-CSF: παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων, IL: ιντερλευκίνη, MCP: χημειοτακτική πρωτεΐνη μονοκυττάρων, MMP: μεταλλοπρωτεϊνάση

Η εισροή των λευκοκυττάρων στην αρθρική κοιλότητα επιτυγχάνεται μετά από προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο αγγειακό ενδοθήλιο και διαενδοθηλιακή μετανάστευση (Εικόνα 1.27). Η έκκριση αγγειοδραστικών μεσολαβητών (Πίνακας 1.4) από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως η ισταμίνη, οδηγεί σε αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας και αγγειακές βλάβες, που

προκαλούνται κυρίως από τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα (Εικόνα 1.28). Η βλάβη ακολουθείται από αναγέννηση του ενδοθηλίου, η οποία ενίοτε μπορεί να συνδέεται με αγγειογένεση (Szekanecz and Koch 2004, 2008).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη ρευματοειδή αρθρίτιδα παρουσιάζουν οι εξωαρθρικές εκδηλώσεις (Εικόνα 1.32) που παρατηρούνται σε πολλά όργανα (Cojocaru *et al.* 2010, Baerwald *et al.* 2012). Η συχνότητα των εξωαρθρικών εκδηλώσεων ποικίλλει από 17% σε 41% στις σχετικές δημοσιεύσεις (Baerwald *et al.* 2012). Πιθανά όργανα-στόχοι των εξωαρθρικών εκδηλώσεων είναι τα αιμοφόρα αγγεία, οι νεφροί, το ΚΝΣ, οι οφθαλμοί και το καρδιαγγειακό σύστημα (Genta *et al.* 2006, Kuryliszyn-Moskal *et al.* 2006, Tanasescu *et al.* 2009, Schirmer *et al.* 2011, Baerwald *et al.* 2012).



Εικόνα 1.32. Σημεία φλεγμονής στις ρευματικές παθήσεις (Schirmer *et al.* 2011)

Η αγγειακή νόσος περιλαμβάνει ευρύ φάσμα αλλοιώσεων, από ρευματοειδή αγγειίτιδα έως αθηρωματικές βλάβες. Η φλεγμονώδης υπόθεση της αθηροσκλήρυνσης στη ρευματοειδή αρθρίτιδα υποδηλώνει τις συστηματικές συνέπειες των μεσολαβητών της φλεγμονής που προκαλούν τις βλάβες στα αγγεία (Tanasescu *et al.* 2009). Επίσης, 1-5% των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα εμφανίζει συστηματική αγγειίτιδα, που περιγράφεται ως φλεγμονώδης κατάσταση των μικρού και μεσαίου μεγέθους αγγείων με κλινικές εκδηλώσεις από το δέρμα και το περιφερικό νευρικό σύστημα (Genta *et al.* 2006). Τέλος, ο κεντρικός φλεγμονώδης ρόλος των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων στη συστηματική πορεία της νόσου έχει αποδοθεί στην υπερέκφραση των φλεγμονωδών μεσολαβητών ή στην ανάπτυξη νέων αγγείων μέσω αύξησης των επιπέδων του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και της ενδοθηλίνης (ET)-1 (Kuryliszyn-Moskal *et al.* 2006).

1.3.5. Η Ισταμίνη στην Αρθρίτιδα

Είναι αποδεκτό ότι η ισταμίνη και τα κύτταρα όπου παράγεται, κυρίως τα μαστοκύτταρα και τα βασεόφιλα, εμπλέκονται στην αλλεργική φλεγμονή. Πρόσφατα, ωστόσο, αναγνωρίστηκε ο ανοσορυθμιστκός ρόλος της και κατά συνέπεια η συμμετοχή της ισταμίνης στα αυτοάνοσα νοσήματα, ιδιαιτέρως μέσω σύνδεσης στους H_4 υποδοχείς (Zhang M *et al.* 2006, Zampeli and Tiligada 2009). Εκτός από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, μελέτες σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα έδειξαν ότι οι H_4 υποδοχείς (§1.2.5) εκφράζονται και στα κύτταρα του αρθρικού υγρού (Ohki *et al.* 2007).

In vitro μελέτες έδειξαν ότι η ισταμίνη διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων και την παραγωγή ενζύμων με καταλυτικό ρόλο στην διάβρωση του αρθριτικού χόνδρου (Tetlow and Woolley 2002). Οι παρατηρήσεις αυτές άνοιξαν το δρόμο για τη διερεύνηση των υποκείμενων μηχανισμών και για την ανάπτυξη και αξιολόγηση φαρμακολογικώς δραστικών ουσιών για την αντιμετώπιση της ρευματικής φλεγμονής (Ikawa *et al.* 2005; Grzybowska-Kowalczyk 2007, Ζαμπέλη 2009).

1.4. Αγγεία και Ισταμίνη

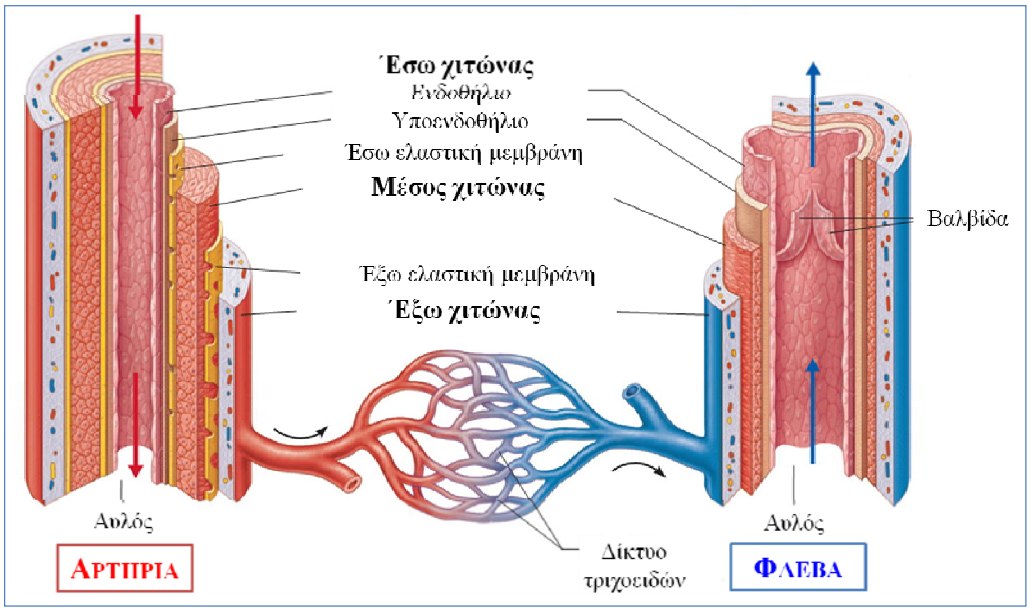
Πρόσφατες μελέτες κατέδειξαν ότι η διακλάδωση των αιμοφόρων αγγείων επηρεάζεται από το μεταβολισμό της ισταμίνης, πιθανώς μέσω της ρύθμισης της έκφρασης του παράγοντα μεταγραφής egr-1 (Huang *et al*. 2008). Οι διακλαδώσεις των αγγείων και η μορφογένεσή τους είναι σημαντικές και υπεύθυνες για την επέκταση των αγγείων σε αυξανόμενους ιστούς. Η αγγειογένεση είναι απαραίτητη στην περίπτωση τραυματισμένων ιστών σε ενήλικες οργανισμούς, προκειμένου να δημιουργηθούν νέα κύτταρα και να γίνει η αποκατάσταση του ιστού (Hurley *et al*. 1970, Rafii and Lyden 2003, Bayliss *et al*. 2006). Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι, στον άνθρωπο, η αγγειογένεση διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στην αύξηση των όγκων (Ferrara and Kerbel 2005). Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι κύτταρα και μεσολαβητές της ανοσίας δύνανται να επηρεάζουν την ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων σε ενήλικες. Τα μαστοκύτταρα, για παράδειγμα, συσσωρεύονται κατά την αγγειογένεση σε φυσιολογικές ή παθολογικές συνθήκες (Ribatt *et al*. 2001), ενώ η ισταμίνη δρα ως παράγοντας αγγειογένεσης και εμπλέκεται ευθέως στην

αύξηση των όγκων, όπου έχουν αναφερθεί υψηλά επίπεδα έκφρασης και ενζυμικής δραστικότητας της HDC (Tønnesen *et al*. 1988, Norrby 1995, Ghosh *et al.* 2001, Graff 2002, Matsumoto *et al*. 2002, Cianchi *et al*. 2005).

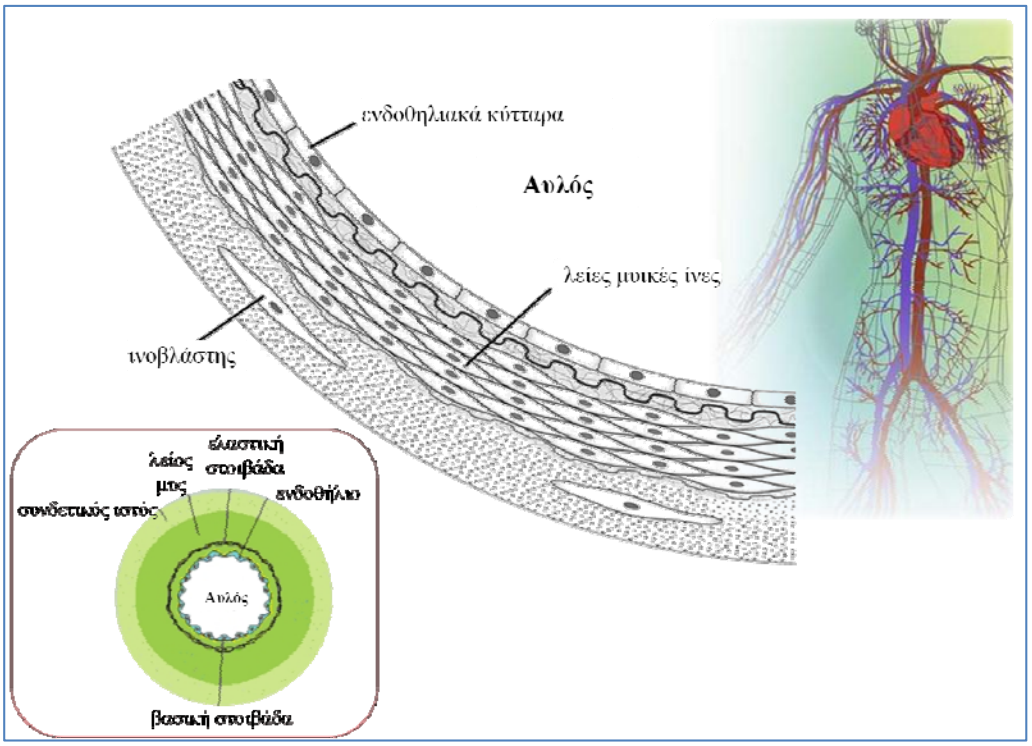
Η ισταμίνη φαίνεται να ρυθμίζει την αγγειογένεση σε επίπεδο κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαπερατότητας μέσω έκφρασης μορίων προσκόλλησης, όπως το VCAM, και μεταβολής της σύστασης του εξωκυττάριου περιβάλλοντος (Thompson and Brown 1987, Saito *et al.* 1996, Alexander and Elrod 2002). Εκλεκτικοί αγωνιστές και ανταγωνιστές των H_1 και H_2 υποδοχέων χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για το χαρακτηρισμό και την κατανομή των υποδοχέων της ισταμίνης στο αγγειακό σύστημα, ενώ οι αναφορές στους H_3 και H_4 είναι ελάχιστες (Sun *et al.* 2010). Η ισταμίνη προκαλεί σύσπαση σε απομονωμένα αγγεία δρώντας στους H_1 υποδοχείς και χάλαση μέσω των H_1 και H_2 υποδοχέων (Marshall 1984).

1.4.1. Αγγειακό Ενδοθήλιο

Το αγγειακό σύστημα περιλαμβάνει τις αρτηρίες, τις φλέβες και τα τριχοειδή που παρέχουν αίμα σε όλους σχεδόν τους ιστούς. Τα μεγάλα αγγεία είναι οι αρτηρίες και οι φλέβες, που φέρουν ένα παχύ και σκληρό τοίχωμα συνδετικού ιστού και πολλές στοιβάδες λείων μυϊκών κυττάρων (Εικόνα 1.33). Το τοίχωμα καλύπτεται από το ενδοθήλιο, που διαχωρίζεται από το παρακείμενο περιβάλλον του με τη βασική στοιβάδα (Εικόνα 1.34). Η έκταση του συνδετικού ιστού και των λείων μυών στο αγγειακό τοίχωμα ποικίλει ανάλογα με τη διάμετρο και τη λειτουργία του αγγείου (Alberts *et al*. 2002).



Εικόνα 1.33. Σχηματική απεικόνιση της δομής αρτηριών και φλεβών



Εικόνα 1.34. Σχηματική απεικόνιση αρτηρίας όπου διακρίνεται το ενδοθήλιο

Το ενδοθήλιο είναι μια λεπτή στοιβάδα κυττάρων που περιβάλλει την εσωτερική επιφάνεια των αιμοφόρων αγγείων, μεταξύ του αίματος και του υπόλοιπου του αγγειακού τοιχώματος. Τα κύτταρα που είναι σε απευθείας επαφή με το αίμα ονομάζονται αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα (Εικόνα 1.34). Τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα περιβάλλουν ολόκληρο το κυκλοφορικό σύστημα, από την καρδιά μέχρι και τα πιο μικρά τριχοειδή αγγεία και έχουν πολύ καθορισμένες και μοναδικές λειτουργίες. Ο φυσιολογικός ρόλος του ενδοθηλίου είναι διττός. Συμμετέχει ενεργά τόσο στη λειτουργία της καρδιάς, όσο και στη ρύθμιση της περιφερικής κυκλοφορίας, με τελικό αποτέλεσμα τη ρύθμιση της αιματικής ροής στους διάφορους ιστούς του οργανισμού (Galley and Webster 2004). Παράλληλα, με τη ρύθμιση του αγγειακού τόνου μέσω αγγειοδιαστολής και αγγειοσύσπασης, ουσίες που παράγονται και εκλύονται από το αγγειακό ενδοθήλιο ρυθμίζουν τη διαπερατότητα των αγγείων, την πήξη του αίματος, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και θάνατο και τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων (Luscher and Barton 1997, Mann *et al* 2003, Galley and Webster 2004), ενώ υπάρχουν ενδείξεις για τη συμμετοχή του ενδοθηλίου στις διαδικασίες της ανάπτυξης (Cleaver and Melton 2003).

Εκτός από τις γενικές λειτουργίες, ο ρόλος του ενδοθηλίου διαφοροποιείται στις διάφορες ανατομικές περιοχές του οργανισμού και σε πλήθος παθολογικών καταστάσεων (Tse and Stan 2010). Πρόσφατα δεδομένα ενισχύουν τις ενδείξεις για τη συμμετοχή του ενδοθηλίου στα αυτοάνοσα νοσήματα. Κατά τη φλεγμονώδη διεργασία παρατηρείται μετανάστευση των λευκοκυττάρων από την συστηματική κυκλοφορία στον φλεγμαίνοντα ιστό μέσω παραγόντων, όπως οι σελεκτίνες, οι ιντεγγρίνες και οι χημειοκίνες (Εικόνα 1.27, Butcher and Picker 1996). Στην πολυπαραγοντική αυτή

διαδικασία το ενδοθήλιο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, αφού πολλοί παράγοντες είτε παράγονται είτε αλληλεπιδρούν με αυτό, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η εξαγγείωση των λευκοκυττάρων (Εικόνα 1.27, Johnston and Butcher 2002).

Το ενδοθήλιο εμπλέκεται:

- στην αθηροσκλήρυνση (Gimbrone and García-Cardeña 2012)
- στη λειτουργία του 'διαχωριστικού φράγματος', δρώντας ως ένα ημι-εκλεκτικό φράγμα ανάμεσα στο χιτώνα και τον περιβάλλοντα ιστό και ελέγχοντας με αυτό τον τρόπο τη διέλευση ουσιών, καθώς και τη μετακίνηση των λευκοκυττάρων μέσα και έξω από τη ροή του αίματος. Η εκτεταμένη ή επί μακρόν αύξηση της διαπερατότητας της μονοστοιβάδας του ενδοθηλίου, όπως στην περίπτωση της χρόνιας φλεγμονής, οδηγεί σε οίδημα (Barreiro *et al.* 2010, Wong *et al.* 2010)
- στη θρόμβωση και στην ινωδόλυση. Το ενδοθήλιο, γενικά, παρέχει μια μη θρομβογενή επιφάνεια, αφού περιέχει θειϊκή ηπαρίνη που δρα ως συμπαράγοντας στην ενεργοποίηση της αντιθρομβίνης, μιας πρωτεάσης που απενεργοποιεί πολλούς παράγοντες στο σύστημα της θρόμβωσης (Tanaka *et al.* 2009)
- στη φλεγμονή (Aksu *et al.* 2012)
- στο σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση) (Risau 1997, Red-Horse *et al.* 2007, Ucuzian *et al.* 2010)
- στην αγγειοδιαστολή και στην αγγειοσύσπαση και επομένως στον έλεγχο της πίεσης του αίματος (Haller 1997, Ghiadoni *et al*. 2012)

Το ενδοθήλιο είναι ένας ενεργός μεταβολικά ιστός, που επιτελεί μια σειρά λειτουργιών που αφορούν στην αιμόσταση των αγγείων (Busse *et al*.

1985). Οι λειτουργίες του ενδοθηλίου ρυθμίζονται από τις βιογενείς αμίνες, οι οποίες, με σπάνιες εξαιρέσεις, απελευθερώνονται ή καταβολίζονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του χιτώνα ή τα μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα. Στις αμίνες αυτές συγκαταλέγονται οι κατεχολαμίνες, η σεροτονίνη, η ισταμίνη, καθώς και η ακετυλοχολίνη, της οποίας ο ρόλος εστιάζεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα του χιτώνα και στα κύτταρα που ρυθμίζουν τις βιογενείς αμίνες. Μια από τις λειτουργίες του ενδοθηλίου είναι η διατήρηση ενός εκλεκτικού φράγματος ανάμεσα στο αίμα και στους ιστούς. Σε περίπτωση φλεγμονής, η απόκριση του ενδοθηλίου οδηγεί στην αυξημένη διαπερατότητά του, με αποτέλεσμα μεγάλα μόρια, που υπό κανονικές συνθήκες παρέμεναν στο αγγειακό τμήμα, να μπορούν τώρα να διασχίσουν το ενδοθήλιο (Εικόνα 1.27). Ο μεταβολισμός του ενδοθηλίου ποικίλει, όχι μόνο μεταξύ των κυττάρων του χιτώνα και των μικροαγγειακών κυττάρων, αλλά και από όργανο σε όργανο, καθώς και μέσα σε ένα συγκεκριμένο μικροαγγειακό σώμα (Tse and Stan 2010).

Οι δυσλειτουργίες του ενδοθηλίου ή η απώλεια της λειτουργίας του είναι ενδεικτικά στοιχεία των αγγειακών ασθενειών (Deanfield *et al*. 2005, Roberts *et al*. 2009). Σε αγγειακά νοσήματα, στον άνθρωπο, η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου είναι συστηματική παθολογική κατάσταση και ορίζεται ως μη υπάρξη ισορροπίας ανάμεσα στις παραγόμενες από το ενδοθήλιο αγγειοσυσταλτικές και αγγειοδιασταλτικές ουσίες. Δυσλειτουργία του ενδοθηλίου απαντάται συχνά σε καρδιαγγειακές παθήσεις, διαβήτη, υπέρταση, υπερλιπιδαιμία, καθώς και σε καπνιστές (Ghiadoni *et al*. 2012). Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου είναι προγνωστικός δείκτης για την εμφάνιση καρδιαγγειακών συμπτωμάτων σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις και

εμφανίζεται σε φλεγμονές, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και ο συστημικός ερυθηματώδης λύκος (Khan *et al*. 2010).

1.4.2. Αγγειακό Ενδοθήλιο και Ισταμίνη

Η ισταμίνη είναι μία αγγειοδραστική ουσία που επιδρά στη διαπερατότητα των αγγείων και ασκεί αγγειοδιασταλτική ή αγγειοσυσπαστική δράση ανάλογα με την έκφραση των υποδοχέων της που εντοπίζονται σε διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς και σημεία του αγγειακού συστήματος (Jansen-Olesen *et al*. 1997, Su *et al*. 2005). Στο αγγειακό ενδοθήλιο, η ισταμίνη επάγει την παροδική έκφραση της P-σελεκτίνης, την έκκριση μεσολαβητών της πρώιμης φάσης των αντιδράσεων υπερευαισθησίας, όπως η προσταγλανδίνη PGI_2, ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) και το λευκοτριένιο LTB_4 και τη δοσο- και χρονο-εξαρτώμενη σύνθεση των μεσολαβητών της όψιμης φάσης IL-6 και IL-8 (Jeannin *et al*. 1994). Όσον αφορά το μηχανισμό της θρόμβωσης, η ισταμίνη και άλλοι μεσολαβητές της φλεγμονής επάγουν τον ιστικό παράγοντα (θρομβοπλαστίνη) στο ενδοθήλιο (Napoleone *et al*. 1997, Kawano *et al*. 2001, Eto *et al*. 2002, Steffel *et al*. 2005). Η ισταμίνη επάγει την έκφραση του ιστικού παράγοντα, αλλά δεν ενεργοποιεί το μηχανισμό της θρόμβωσης, μέσω της ενεργοποίησης του H_1 υποδοχέα (Steffel *et al*. 2005).

Η ισταμίνη που απελευθερώνεται τοπικά από τα μαστοκύτταρα ή τα μακροφάγα προκαλεί σύσπαση στα αθηρωματικά στεφανιαία αγγεία και συμμετέχει στην αθηρογένεση επιδρώντας στην έκφραση των σχετικών γονιδίων στα μονοκύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα (Murata *et al*. 2005).

Εκτός από την κλασική προέλευση της ισταμίνης από τα μαστοκύτταρα, η ανίχνευση της HDC στα αγγειακά μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα υποστηρίζει την πιθανή αγγειακή προέλευση της ισταμίνης (Tippens and Gruetter 2004). Η εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοδιασταλτική δράση της ισταμίνης επιτελείται μέσω των H_1 υποδοχέων, με ρύθμιση της παραγωγής του NO από την συνθετάση του NO (NOS) (Tanimoto *et al.* 2007). Η ισταμίνη αυξάνει τη διέλευση μακρομορίων στις μονοστοιβάδες των ενδοθηλιακών ομφαλικών κυττάρων μέσω των H_1 υποδοχέων. Αντίθετα, μειώνει τη διαπερατότητα των μονοστοιβάδων των ενδοθηλιακών κυττάρων αορτής πειραματοζώων μέσω των H_2 υποδοχέων (Ikeda *et al*. 1999, Hekimian *et al*. 1992), ενώ έχει αναφερθεί ο ρόλος των H_2 υποδοχέων στον έλεγχο της λειτουργίας των περιφερικών αγγείων (Grennan *et al*. 1974). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι H_3 υποδοχείς ρυθμίζουν τον πόνο σε περιφερικά αγγεία, σε αγγεία κλάδους της σπονδυλικής και του εγκεφάλου (Hough and Rice 2011). Οι H_3 υποδοχείς στο ενδοθήλιο της αορτής επιδρούν στην εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο διαστολή της αορτής (Djuric and Andjelkovic 1995; Djuric *et al*. 1996).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός - Ερωτήματα

Σύμφωνα με τα όσα αναφέρθηκαν στο Γενικό Μέρος της διατριβής για τη διερεύνηση του ρόλου της ισταμίνης και των υποδοχέων της στα σπλαχνικά αγγεία υπό φλεγμονώδεις καταστάσεις, τέθηκαν τα παρακάτω ερωτήματα:

1. Προκαλεί φλεγμονώδεις εκδηλώσεις στα αγγεία η εγκατάσταση πειραματικής αρθρίτιδας στους επίμυες; Επηρεάζονται τα επίπεδα ισταμίνης στα σπλαχνικά αγγεία στην πειραματική αρθρίτιδα;
2. Παρατηρείται αυτορυθμιστική δράση της ισταμίνης στα σπλαχνικά αγγεία; Συμμετέχουν οι υποδοχείς της ισταμίνης στις εξω-αρθρικές μεταβολές στα αγγεία επίμυων με πειραματική αρθρίτιδα; Ποια η επίδραση της συστηματικής χορήγησης ανταγωνιστών των H_1, H_3 και H_4 υποδοχέων στα επίπεδα ισταμίνης στα σπλαχνικά αγγεία φυσιολογικών επίμυων και πειραματοζώων με πειραματική αρθρίτιδα;
3. Συμβάλλει το αγγειακό ενδοθήλιο στην εν δυνάμει αυτορυθμιστική δράση της ισταμίνης στα αγγεία;

Σχεδιασμός της μελέτης

Η επιλογή των αγγείων ως υποστρώματος για τη επίτευξη των επιστημονικών στόχων της διατριβής βασίζεται στο σημαντικό ρόλο του αγγειακού συστήματος στην ομοιόσταση του οργανισμού και στη συστηματική φλεγμονή. Τα μεγάλα σπλαχνικά αγγεία αποτελούν πειραματικό πρότυπο λόγω του κομβικού ρόλου τους στο αγγειακό και κυκλοφορικό σύστημα και συνεπώς στην (παθο)φυσιολογία του οργανισμού (βλέπε §1.3.2, 1.3.4).

Αρχικά προσδιορίστηκαν φθοριοφασματομετρικά τα φυσιολογικά επίπεδα ισταμίνης στην απομονωθείσα κοιλιακή αορτή και κάτω κοίλη φλέβα επίμυων. Για τη διερεύνηση φλεγμονωδών εκδηλώσεων στα αγγεία εγκαταστάθηκε πειραματική αρθρίτιδα σε επίμυες και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της ισταμίνης στα σπλαχνικά αγγεία. Λόγω του ρόλου του ενδοθηλίου στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου και στην απελευθέρωση αγγειοδραστικών ουσιών, διενεργήθηκαν προκαταρκτικές δοκιμασίες με σκοπό τη μελέτη της συμμετοχής του αγγειακού ενδοθηλίου στις βιολογικές διεργασίες που διερευνήθηκαν στη διατριβή.

Προηγούμενα αποτελέσματα του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας υποστηρίζουν τις αυτορυθμιστικές ιδιότητες της ισταμίνης στην περιφέρεια. Προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή αυτορυθμιστική δράση της ισταμίνης σε φυσιολογικά και σε 'φλεγμαίνοντα' αγγεία και να προταθεί ο υποτύπος του εμπλεκόμενου υποδοχέα, ερωτήματα που αποτελούν πρωτότυπη ερευνητική υπόθεση της διατριβής, χορηγήθηκαν συστηματικά εκλεκτικοί ανταγωνιστές/ανάστροφοι αγωνιστές των υποδοχέων της ισταμίνης και προσδιορίστηκε η βέλτιστη δοσολογία με βάση τη σχέση δόσης-

αποτελέσματος. Η μελέτη εστιάστηκε στους H_1, H_3 και H_4 υποδοχείς, αφού τα βιβλιογραφικά δεδομένα υποδηλώνουν το ρόλο αυτών των υποδοχέων στη λειτουργία των αγγείων και τη φλεγμονή (βλέπε §1.3, 1.4). Η επιλογή των ουσιών έγινε σύμφωνα με τις φαρμακολογικές ιδιότητες τους (βλέπε §1.2). Η διμεθινδένη (ανταγωνιστής των H_1 υποδοχέων) χρησιμοποιήθηκε κυρίως ως μάρτυρας, επειδή ο ρόλος των H_1 υποδοχέων στη λειτουργία των αγγείων, αλλά και σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, είναι ευρέως αποδεκτός, αν και περιορισμένα μελετημένος όσον αφορά τους ερευνητικούς στόχους της διατριβής. Οι GSK334429 και JNJ7777120 είναι νέες ουσίες που έχουν αναπτυχθεί ως εκλεκτικοί ανταγωνιστές/ανάστροφοι αγωνιστές των πρόσφατα ταυτοποιημένων H_3 και H_4 υποδοχέων αντίστοιχα (βλέπε §1.2.4, 1.2.5).

Τα δεδομένα που προκύπτουν από αυτές τις μελέτες αναμένεται να συμβάλλουν στη σύγχρονη διεθνή προσπάθεια (α) αξιολόγησης του (αυτο)νευρο- και άνοσο-ρυθμιστικού ρόλου των υποδοχέων της ισταμίνης στη φλεγμονή, ως νέου θεραπευτικού στόχου, (β) ανάπτυξης αποτελεσματικότερων φαρμάκων για τις φλεγμονώδεις καταστάσεις και (γ) προσδιορισμού αξιόπιστων δεικτών φλεγμονής, ιδιαίτερα στα αγγεία, λόγω της άμεσης αλληλεπίδρασής τους με το περιφερικό αίμα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΥΛΙΚΑ

2.1.1. Πειραματόζωα

Αρσενικοί επίμυες τύπου Wistar μέσου βάρους 250-300 g από το εκτροφείο του Ινστιτούτου Pasteur (Αθήνα) χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα της διατριβής. Τα ζώα ελάμβαναν τροφή και νερό *ad libidum* και παρέμεναν υπό έλεγχο στις εγκαταστάσεις πειραματισμού του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας (αριθμός αδείας 31 ΕΕ ΕΠ 010) για 10-15 ημέρες.

2.1.2. Χημικά αντιδραστήρια και φαρμακολογικά δραστικές ουσίες

Για την εκχύλιση, απομόνωση και προσδιορισμό της ισταμίνης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια: ισταμίνη [research grade, Serva, Heidelberg, Germany, stock standard διάλυμα 10 mg% (w/v) σε 0.05N H_2SO_4], κινίνη hemisulphate (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA, stock standard διάλυμα 10mg% σε 0,1N H_2SO_4), μεθανόλη, n-βουτανόλη, n-επτάνιο, *o*-φθαλαλδεΰδη, θειικό οξύ (H_2SO_4), υπερχλωρικό οξύ ($HClO_4$) [p.a., Merck, Darmstand, Germany].

Οι φαρμακολογικά δραστικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους διαλύθηκαν και αραιώθηκαν στις κατάλληλες συγκεντρώσεις σε φυσιολογικό ορό [NaCl 0.9% (w/v), Demo, Αθήνα] και παρατίθενται στον Πίνακα 2.1. Οι ουσίες GSK334429 (1-(1-methylethyl)-4-({1-[6-(trifluoromethyl)-3-pyridinyl]-4-piperidinyl}carbonyl) hexahydro-1H-1,4-diazepine) & JNJ7777120 (5-chloro-2-[(4-methylpiperazin-

1-yl)carbonyl]-1*H*-indole ήταν χορηγία των Dr Andy D. Medhurst και Dr Robin L. Thurmond, αντίστοιχα, στα πλαίσια συνεργασίας των GlaxoSmithKline (Essex, UK) και Johnson & Johnson Pharmaceutical (San Diego, CA, USA) με το Εργαστήριο Φαρμακολογίας.

Πίνακας 2.1. Φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος

ΟΥΣΙΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΟΣΗ	ΙΔΙΟΤΗΤΑ
Διμεθινδένη, μηλεϊνικό άλας	Fenistil®, Novartis	50, 100 mg/kg εφάπαξ	εκλεκτικός ανταγωνιστής H_1 υποδοχέων
GSK334429	Glaxo SmithKline Essex, UK	1, 3 mg/kg εφάπαξ	εκλεκτικός ανταγωνιστής H_3 υποδοχέων
JNJ7777120	Johnson & Johnson, CA, USA	10, 30 mg/kg εφάπαξ	εκλεκτικός ανταγωνιστής H_4 υποδοχέων

Ο πλήρης ανοσοενισχυτικός παράγων του Freund (Complete Freund's Adjuvant, CFA, Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA) είναι εναιώρημα θερμικά νεκρωθέντος *Mycobacterium tuberculosis* (strain H37 Ra, ATCC 25177) σε υγρή παραφίνη, σε συγκέντρωση 1 mg/ml.

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Χορήγηση ουσιών

Ο CFA χορηγήθηκε ενδοδερμικά (i.d.) με βελόνη 25 G στην περιοχή έκφυσης της ουράς του επίμυος. Τα φάρμακα (Πίνακας 2.1) χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά (i.p.) με βελόνη 29 G στο αριστερό κατώτερο τεταρτημόριο της κοιλιακής χώρας προς αποφυγή τραυματισμού ζωτικών οργάνων. Πριν τη χορήγηση των ουσιών τα πειραματόζωα ελάμβαναν ελαφρά αναισθησία με αιθέρα για 1 min σε ειδική κλειστή συσκευή. Στην περίπτωση χορήγησης δύο ουσιών μεσολαβούσε διάστημα 10 min μεταξύ των χορηγήσεων.

Τα φάρμακα χορηγήθηκαν σε φυσιολογικούς επίμυες και σε ομάδες επίμυων στους οποίους είχε τροποποιηθεί το υπόστρωμα με φαρμακολογικά μέσα (§2.2.2). Σε κάθε πειραματική διαδικασία τα πειραματόζωα χωρίζονταν σε ομάδες των 2, 4 ή 6 ατόμων και περιλαμβάνονταν ομάδες μαρτύρων που ελάμβαναν είτε Φ.Ο. είτε άλλες ουσίες ανάλογα με τις ανάγκες του πειραματικού πρωτοκόλλου (Πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.2. Ομάδες επίμυων

ΟΜΑΔΑ	ΥΠΟ-ΟΜΑΔΑ		ΜΑΡΤΥΡΑΣ
Α	Α1	Διμεθινδένη (50 mg/ml i.p.)	Φ.Ο. (0.1ml i.p.)
	Α2	Διμεθινδένη (100 mg/ml i.p.)	
Β	Β1	GSK334429 (1 mg/ml i.p.)	
	Β2	GSK334429 (3 mg/ml i.p.)	
Γ	Γ1	JNJ7777120 (10 mg/ml i.p.)	
	Γ2	JNJ7777120 (30 mg/ml i.p.)	
Δ		CFA (0.1 mg/0.1ml i.d.)	Φ.Ο. (0.1ml i.d.)
Ε	Ε1	CFA (0.1 mg/0.1ml i.d.) + Διμεθινδένη (50 mg/ml i.p.)	Φ.Ο (0.1ml i.d.) + Διμεθινδένη (50 mg/ml i.p.)
	Ε1	CFA (0.1 mg/0.1ml i.d.) + Διμεθινδένη (50 mg/ml i.p.)	Φ.Ο (0.1ml i.d.) + Διμεθινδένη (50 mg/ml i.p.)
Ζ	Ζ1	CFA (0.1 mg/0.1ml i.d.) + GSK334429 (1 mg/ml i.p.)	Φ.Ο (0.1ml i.d.) + GSK334429 (1 mg/ml i.p.)
	Ζ2	CFA (0.1 mg/0.1ml i.d.) + GSK334429 (3 mg/ml i.p.)	Φ.Ο (0.1ml i.d.) + GSK334429 (3 mg/ml i.p.)
Η	Η1	CFA (0.1 mg/0.1ml i.d.) + JNJ7777120 (10 mg/ml i.p.)	Φ.Ο (0.1ml i.d.) + JNJ7777120 (10 mg/ml i.p.)
	Η1	CFA (0.1 mg/0.1ml i.d.) + JNJ7777120 (30 mg/ml i.p.)	Φ.Ο (0.1ml i.d.) + JNJ7777120 (30 mg/ml i.p.)

CFA: ανοσοενισχυτικός παράγων του Freund (Complete Freund's Adjuvant), GSK334429 (1-(1-methylethyl)-4-({1-[6-(trifluoromethyl)-3-pyridinyl]-4-piperidinyl} carbonyl) hexahydro-1H-1,4-diazepine), i.d.: ενδοδερμική χορήγηση, i.p.: ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση, JNJ7777120 (5-chloro-2-[(4-methyl piperazin-1-yl) carbonyl]-1*H*-indole, Φ.Ο.: φυσιολογικός ορός [NaCl 0,9% (w/v)]

2.2.2. Πειραματική αρθρίτιδα

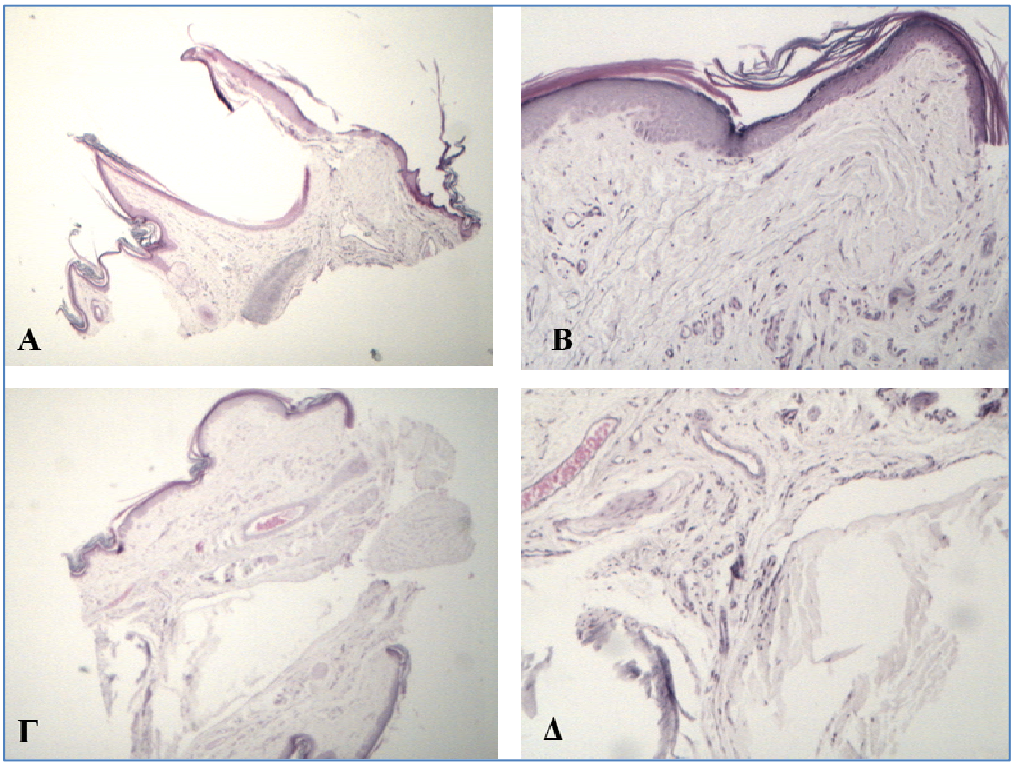
Η εγκατάσταση πειραματικής αρθρίτιδας (ΠΑ) πραγματοποιήθηκε με συστηματική χορήγηση CFA. Ο CFA χορηγήθηκε i.d. στη βάση της ουράς των επίμυων την ημέρα 1 και η ανάπτυξη της αρθρίτιδας στα πειραματόζωα παρακολουθήθηκε με βάση μια ημιποσοτική κλίμακα από 0 έως 4 για κάθε άκρο (Hirano *et al*. 1994) σύμφωνα και με τον Πίνακα 2.3. Οι βαθμοί για κάθε άκρο αθροίστηκαν, ώστε να προκύπτει ο μέγιστος βαθμός σοβαρότητας κλινικών σημείων αρθρίτιδας ίσος με 16.

Την 21^{η} ημέρα μετά τη χορήγηση του CFA οι επίμυες εμφάνιζαν έντονα σημεία αρθρίτιδας και στα τέσσερα άκρα τους (Εικόνα 2.1), αν και κατά την ιστολογική εξέταση των πρασκευασμάτων δακτύλων αρουραίου μετά τη χορήγηση του CFA δεν παρατηρήθηκαν στοιχεία φλεγμονής (Εικόνα 2.2).

Πίνακας 2.3. Ημιποσοτική κλίμακα αξιολόγησης σημείων αρθρίτιδας σε πειραματική αρθρίτιδα (Hirano *et al*. 1994).

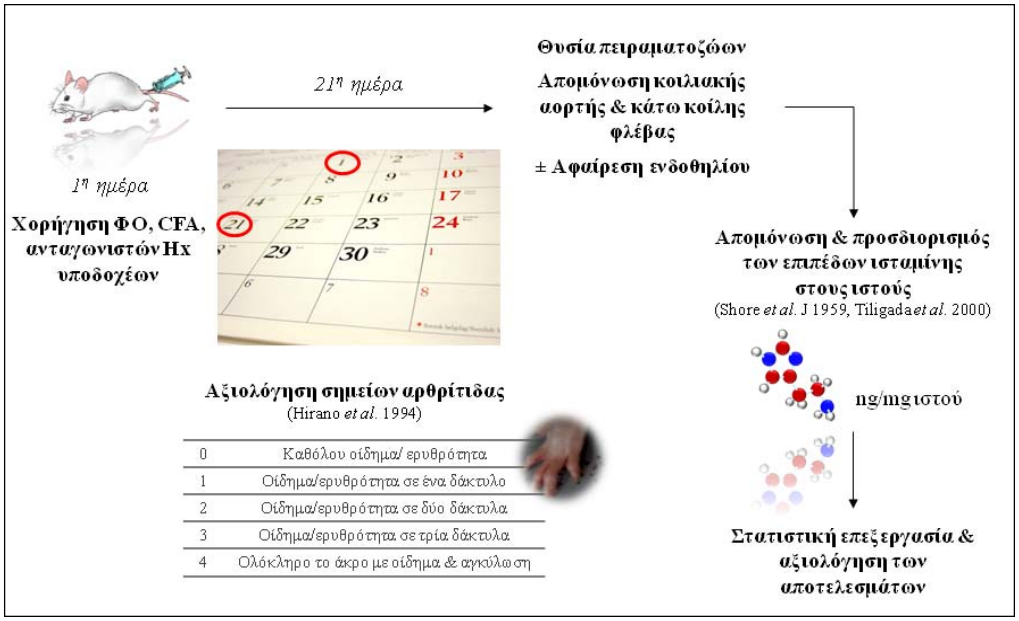
ΒΑΘΜΟΣ	ΣΗΜΕΙΑ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑΣ
0	Καθόλου οίδημα/ ερυθρότητα
1	Οίδημα/ερυθρότητα σε ένα δάκτυλο
2	Οίδημα/ερυθρότητα σε δύο δάκτυλα
3	Οίδημα/ερυθρότητα σε τρία δάκτυλα
4	Ολόκληρο το άκρο με οίδημα και αγκύλωση

Εικόνα 2.1. Κλινικά σημεία αρθρίτιδας
Ενδεικτικές φωτογραφίες άκρων φυσιολογικού επίμυος (μάρτυρας) και επίμυος με πειραματική αρθρίτιδα (CFA), όπου είναι εμφανή τα κλινικά σημεία της αρθρίτιδας, όπως οίδημα και αγκύλωση του άκρου.



Εικόνα 2.2. Ιστολογική εικόνα δακτύλων αρουραίου μετά τη χορήγηση CFA
Α, Β) Άνω τμήμα δακτύλου αρουραίου χωρίς στοιχεία φλεγμονής. Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (Α. x25, Β. x200)
Γ, Δ) Κάτω τμήμα δακτύλου αρουραίου, συμπεριλαμβανομένης της φαλαγγο-φαλαγγικής άρθρωσης, χωρίς στοιχεία φλεγμονής. Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (Γ. x25, Δ. x200)

Τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν την 21η ημέρα και στη συνέχεια έγινε η απομόνωση της κοιλιακής αορτής (abdominal aorta, AO) και της κάτω κοίλης φλέβας (inferior vena cava, IVC) ή/και αφαίρεση του αγγειακού ενδοθηλίου (Εικόνα 2.3), όπως περιγράφεται στις παραγράφους 2.2.3 και 2.2.4.

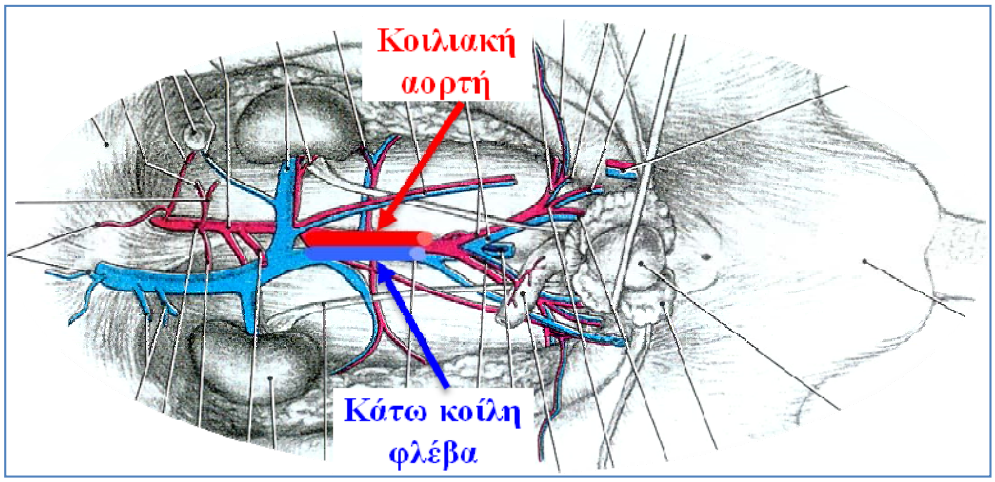


Εικόνα 2.3. Σχηματική απεικόνιση του πειραματικού πρωτοκόλλου
CFA: πλήρης ανοσοενισχυτικός παράγων του Freund (Complete Freund's Adjuvant), Hx υποδοχέας της ισταμίνης (x: 1-4), ΦΟ: φυσιολογικός ορός [NaCl 0,9% (w/v)].

2.2.3. Απομόνωση των σπλαχνικών αγγείων

Υπό ελαφρά αναισθησία με αιθέρα διενεργείτο τομή στην κοιλιακή χώρα. Η κοιλία διανοιγόταν κατά την ανατομική τάξη και γινόταν είσοδος στην περιτοναϊκή κοιλότητα με ταυτόχρονο έλεγχο των σπλάγχνων. Μετά την είσοδο στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο, η παρασκευή της κοιλιακής αορτής γινόταν από το επίπεδο των νεφρικών αρτηριών μέχρι το διχασμό των κοινών λαγονίων αρτηριών (Εικόνα 2.4). Η κάτω κοίλη φλέβα παρασκευαζόταν από

το επίπεδο του ήπατος μέχρι και το διχασμό αυτής στις δύο κοινές λαγόνιες φλέβες (Εικόνα 2.4). Ακολουθούσε απολίνωση και διατομή της κοιλιακής αορτής και της κάτω κοίλης φλέβας μετά από μέτρηση του μήκους του κάθε παρασκευάσματος, ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι αποκλίσεις στις διαστάσεις και κατά συνέπεια στη μάζα του κάθε παρασκευάσματος.



Εικόνα 2.4. Σχηματική απεικόνιση των σπλαχνικών αγγείων σε αρσενικό επίμυ.

2.2.4. Αφαίρεση και απομόνωση ενδοθηλίου στο παρασκεύασμα κοιλιακής αορτής

Μετά την πιλοτική εφαρμογή διαφόρων μεθόδων χειρουργικής απομόνωσης του ενδοθηλίου (Εικόνα 1.33-1.34), αποφασίστηκε η εφαρμογή πειραματικού πρωτοκόλλου αφαίρεσης της στοιβάδας του ενδοθηλίου με χημικές μεθόδους. Συγκεκριμένα, έγινε έκπλυση του εσωτερικού αυλού των αρτηριών με διάλυμα δεοξυχολικού νατρίου 0.5 % (g/ml) σε φυσιολογικό ορό για 1 min και στη συνέχεια με καθαρό φυσιολογικό ορό (Iwatani *et al*. 2008, Takenaga *et al*. 1995).

2.2.5. Απομόνωση και προσδιορισμός ισταμίνης στους ιστούς

Η απομόνωση της ισταμίνης από τους ιστούς έγινε όπως περιγράφεται στο Διάγραμμα 2.1 (Shore *et al.* 1959, Tiligada *et al*. 2000).

Ομογενοποίηση του ιστού σε 2.1 ml 0.4N HClO4

↓

Παραμονή στους 0° C για 10 min

↓

Φυγοκέντρηση σε 2500 rpm για 10 min

↓

Μεταφορά 2 ml υπερκειμένου σε σωληνάριο Quickfit® που περιείχε 0,250 ml 5N NaOH, 0,750 g NaCl(s) και 5 ml n-βουτανόλη

↓

Ανακίνηση για 5 min → Φυγοκέντρηση σε 2500 rpm για 10 min

↓

Απομάκρυνση της κάτω υδατικής φάσης

↓

Προσθήκη 2,5 ml κορεσμένου διαλύματος 0.1N NaOH

↓

Ανακίνηση για 5 min → Φυγοκέντρηση σε 2500 rpm για 10 min

↓

Μεταφορά 4 ml υπερκειμένου σε σωληνάριο Quickfit® που περιείχε 2,5 ml 0.1N H2SO4 και 7, 5 ml *n*-επτάνιο

↓

Ανακίνηση για 1 min → Φυγοκέντρηση σε 2500 rpm για 10 min

↓

Απομάκρυνση της άνω οργανικής φάσης

↓

Παραλαβή υδατικής φάσης (δείγμα)

Διάγραμμα 2.1. Σχηματική περιγραφή της απομόνωσης της ισταμίνης από τους ιστούς

Ο ιστός μετά την απομόνωσή του ομογενοποιήθηκε σε 2,1 ml 0,4N υπερχλωρικού οξέος σε γυάλινο ομογενοποιητή των 10 ml με πιστόνι από Teflon (TRI-R STIR-R), προκειμένου να καταστραφούν οι μεμβράνες. Έτσι,

τα επίπεδα ισταμίνης που προσδιορίστηκαν αντιπροσωπεύουν τη συνολική ισταμίνη που εντοπίζεται στους ιστούς, είτε αυτή είναι αποθηκευμένη είτε έχει απελευθερωθεί και δεν έχει απομακρυνθεί από τον εξωκυττάριο χώρο του ιστού.

Το ομογενοποίημα παρέμεινε για 10 min σε πάγο και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε σε 2.500 rpm για 10 min. Ένα μέρος από το υπερκείμενο (2 ml) μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα των 15 ml με εσμυρισμένο πώμα που περιείχε 0.25ml 5N NaOH, 0.75 g NaCl και 5 ml n-βουτανόλης. Το δείγμα αναδεύτηκε για 5 min σε αναδευτήρα με σκοπό την εκχύλιση της ισταμίνης στο κλάσμα της βουτανόλης, όπου δεν εκχυλίζονται η ιστιδίνη και η ιστιδυλ-ιστιδίνη, και επαναφυγοκεντρήθηκε στις ίδιες στροφές για 10 min. Η κάτω υδατική φάση αφαιρέθηκε με πιπέτα Pasteur και προστέθηκαν 2.5 ml 0,1 N NaOH κορεσμένου με NaCl στην επάνω φάση της βουτανόλης με σκοπό την απομάκρυνση των αμινοξέων και κυρίως της ιστιδίνης. Ακολούθησε ανάδευση για 5 min και φυγοκέντρηση σε 2.500 rpm για 10 min. Από το υπερκείμενο 4 ml μεταφέρθηκαν σε άλλο σωλήνα των 15 ml που περιείχε 2.5 ml 0,1 N H_2SO_4 και 7.5 ml n-επτανίου και μετά από σύντομη ανάδευση το δείγμα φυγοκεντρήθηκε σε 2500 rpm για 10 min. Η επάνω φάση απομακρύνθηκε με τη βοήθεια αντλίας κενού και η κάτω φάση, που περιείχε την εκχυλισμένη πλέον ισταμίνη, προσδιορίστηκε ποσοτικά φθοριοφωτομετρικά (Διάγραμμα 2.2) σε μήκος κύματος διέγερσης (excitation) 360 nm και εκπομπής (emission) 450 nm (Shore *et al.* 1959, Tiligada *et al*. 2000), με φθοριοφωτόμετρο AMINCO-Bowman (American Instrument Company, Maryland, USA) εξοπλισμένο με λάμπα Xenon.

1,2 ml δείγμα

↓

+ 0,24 ml 1N NaOH (αλκαλοποίηση)

↓

+ 0,06 ml 1% (w/v) μεθανολικό διάλυμα ο-φθαλαλδεΰδης (*ο*-PT)

↓

Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 4min
(σχηματισμός ανιχνεύσιμου φθορίζοντος παραγώγου ισταμίνης)

↓

+ 0,12 ml 2N H_2SO_4
(όξινση & σταθεροποίηση του ασταθούς παραγώγου)

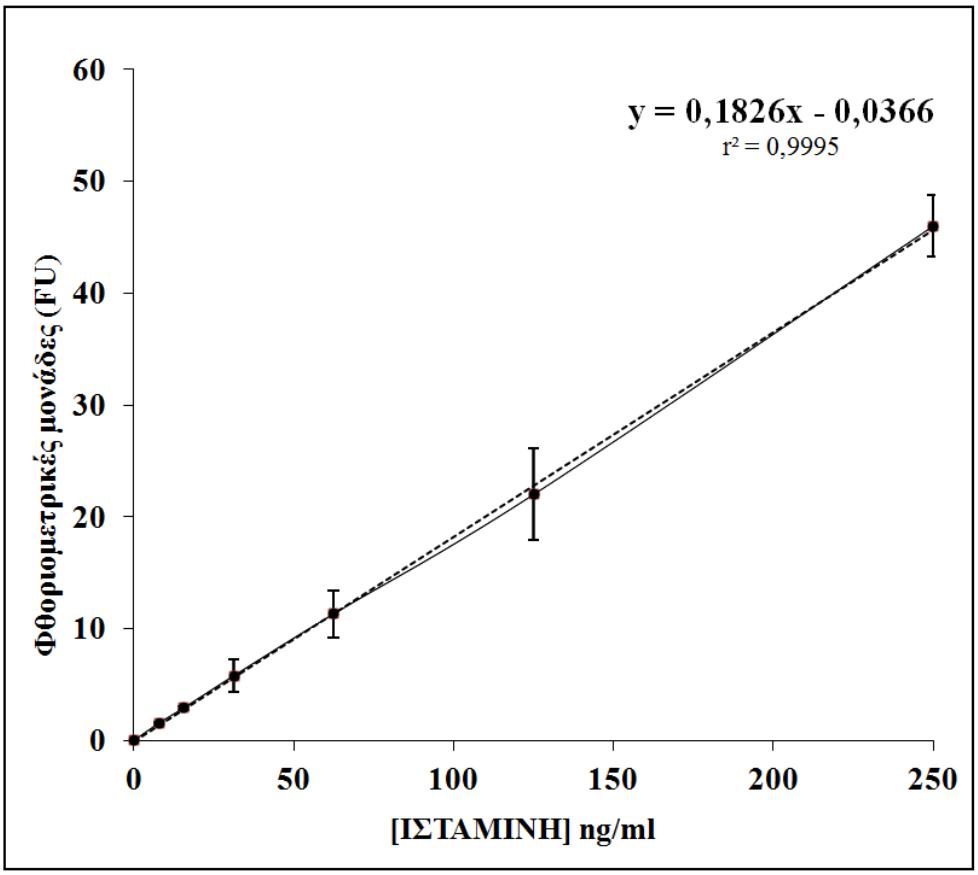
Διάγραμμα 2.2. Σχηματική περιγραφή του ποσοτικού προσδιορισμού της ισταμίνης

Παράλληλα, σε κάθε προσδιορισμό μετρήθηκε και τυφλό δείγμα, το οποίο παρασκευάσθηκε όπως ακριβώς το δείγμα, με τη διαφορά ότι η προσθήκη του 0.12ml 2N H_2SO_4 προηγήθηκε της προσθήκης της ο-PT (Διάγραμμα 2.2). Η αντιστροφή αυτή είχε ως αποτέλεσμα τη μη αλκαλοποίηση του διαλύματος και συνεπώς η αντίδραση ισταμίνης-αντιδραστηρίου δεν ήταν εφικτή. Η τιμή που ελήφθη από το τυφλό δείγμα αφαιρέθηκε από την τιμή που ελήφθη από το δείγμα και κατόπιν προσδιορίστηκε η ποσότητα της ισταμίνης. Σε κάθε σειρά προσδιορισμών περιλαμβάνονταν δύο τουλάχιστον διαλύματα ελέγχου ισταμίνης περιεκτικότητας 20 και 50 ng/ml, καθώς και τα αντίστοιχα τυφλά των διαλυμάτων ελέγχου. Η ρύθμιση του φθοριοφωτομέτρου γινόταν πριν από κάθε προσδιορισμό με το μητρικό διάλυμα κινίνης 1 μg/ml σε μήκος κύματος διέγερσης 350 nm και εκπομπής 450 nm, ενώ ο μηδενισμός του οργάνου γινόταν με διάλυμα 0.1N H_2SO_4.

Η φθοριοφωτομετρική μέθοδος θεωρείται από τις πιο αξιόπιστες, ευαίσθητες και ειδικές μεθόδους για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ισταμίνης σε διάφορους ιστούς. Χρησιμοποιείται γενικά για Ν-μη υποκατεστημένες ιμιδαζολαιθυλαμίνες, ενώ ο προσδιορισμός άλλων βιογενών αμινών αποφεύγεται, αφού το φθορίζον παράγωγο αυτών δεν ανιχνεύεται στις συγκεκριμένες κορυφές του φάσματος (Shore *et al.* 1959). Η γραμμική συσχέτιση της συγκέντρωσης της ισταμίνης με την ένταση του φθορισμού υποστηρίζει την αξιοπιστία της μεθόδου.

2.2.6. Καμπύλη αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ισταμίνης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ισταμίνης στα δείγματα έγινε με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς, για την οποία χρησιμοποιήθηκαν υποδιπλάσιες αραιώσεις ισταμίνης 250 – 7.812 ng/ml 0,1N H_2SO_4 (Εικόνα 2.6). Η σταθερά συσχετίσεως r που προέκυψε (Εικόνα 2.5) υποδηλώνει την αναλογική σχέση μεταξύ των φθοριομετρικών μονάδων και της συγκέντρωσης της ισταμίνης στο φάσμα που μελετήθηκε.



Εικόνα 2.5. Καμπύλη αναφοράς της ισταμίνης
Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± σταθερό σφάλμα (N = 4), r: σταθερά συσχετίσεως

2.3. Ανάλυση & στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ng ισταμίνης ανά mg ιστού και παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± σταθερό σφάλμα (mean value + SEM) από N ανεξάρτητες μετρήσεις. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα SPSS v.19 (SPSS Inc., IL, USA). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων μέσων όρων υπολογίστηκαν ανάλογα με τις πειραματικές μετρήσεις με μη παραμετρικές δοκιμασίες, t-test ή/και ανάλυση μεταβλητών (ANOVA) ακολουθούμενη από post-hoc δοκιμασίες Scheffé ή

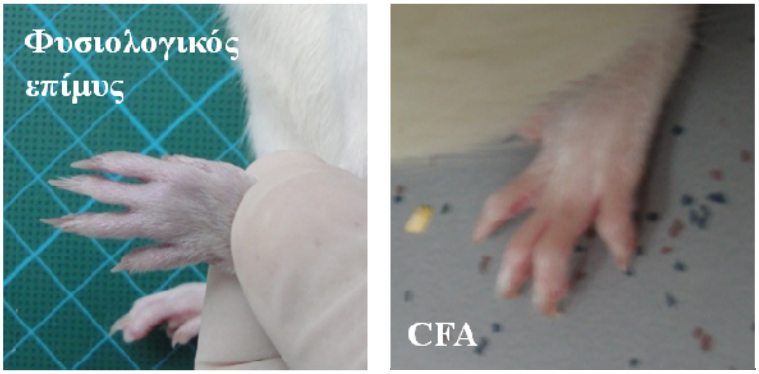
Dunnett T3. Ο συντελεστής συσχέτισης r (Spearman correlation factor, r) υπολογίστηκε με ανάλυση με τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression). Αποδεκτό επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε το $P < 0.05$ σε όλες τις στατιστικές αναλύσεις.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. <u>Ερώτημα 1^{ο}</u>: Προκαλεί φλεγμονώδεις εκδηλώσεις στα αγγεία η εγκατάσταση ΠΑ σε επίμυες; Επηρεάζονται τα επίπεδα ισταμίνης στα σπλαχνικά αγγεία στην ΠΑ;

3.1.1. Κλινική αξιολόγηση των σημείων της αρθρίτιδας

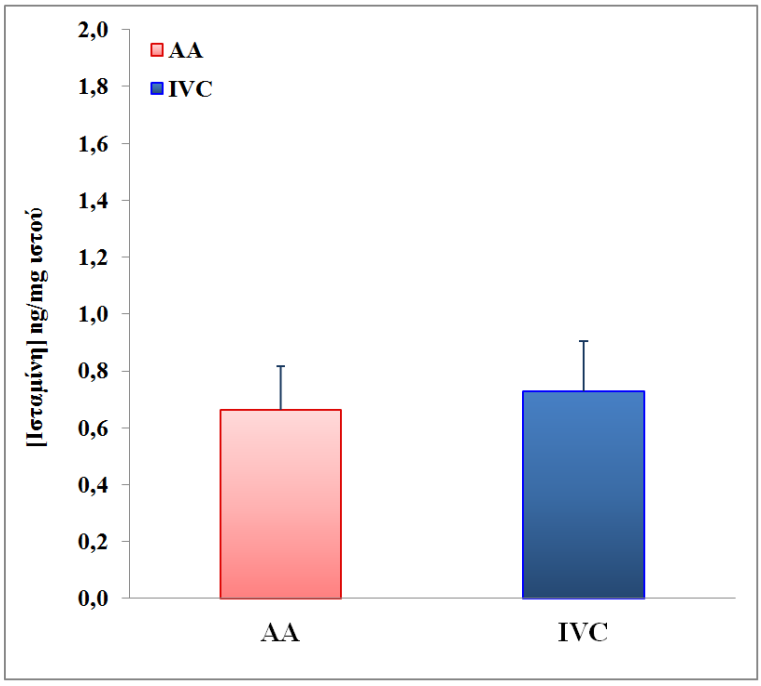
Στην εικόνα 3.1. είναι έκδηλα τα σημεία αρθρίτιδας, όπως αυτά αξιολογούνταν καθημερινά με βάση την ημιποσοτική κλίμακα που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.2.2 (Hirana *et al*. 1995, Ζαμπέλη 2009). Οι επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε CFA, εμφάνιζαν προοδευτικά σημεία αρθρίτιδας και στα 4 άκρα τους. Τις πρώτες 5 ημέρες μετά τη χορήγηση του CFA, οι επίμυες δεν παρουσίασαν σημεία αρθρίτιδας στα άκρα τους. Κατά τις επόμενες 10 ημέρες εμφανίστηκαν σταδιακά επιδεινούμενα σημεία αρθρίτιδας στα πειραματόζωα με ΠΑ (§ 2.2.2). Όλα τα πειραματόζωα εμφάνισαν οίδημα, ερυθρότητα και αγκύλωση των δακτύλων σε όλα τα άκρα και συνεπώς κανένα πειραματόζωο δεν εξαιρέθηκε από τη μελέτη.



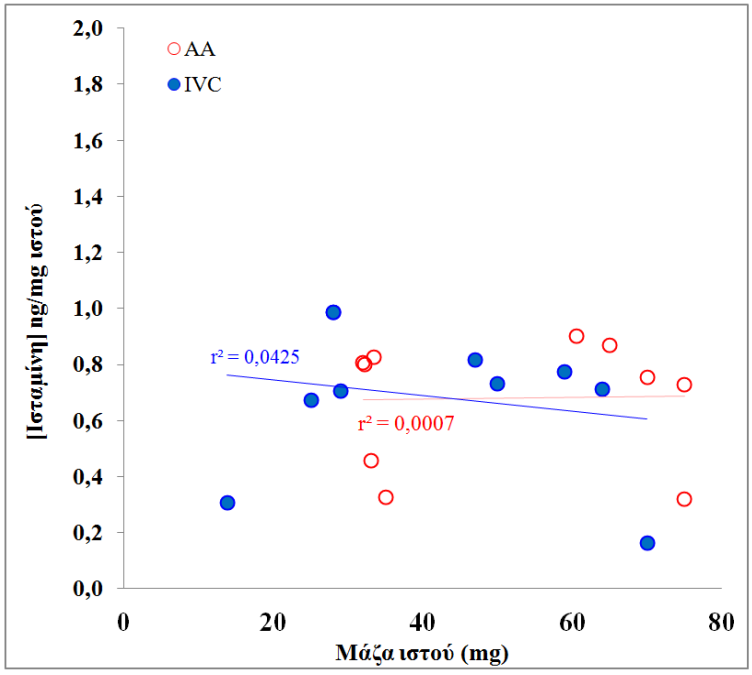
Εικόνα 3.1. Κλινική εικόνα των άκρων επίμυων
μετά την εγκατάσταση πειραματικής αρθρίτιδας (CFA). Κατά τις ημέρες 10-20 μετά τη χορήγηση του CFA ήταν εμφανές το οίδημα και η αγκύλωση στις αρθρώσεις συγκριτικά με τα άκρα των φυσιολογικών επίμυων που δεν είχαν λάβει CFA.

3.1.2. Επίπεδα ισταμίνης στα αγγεία φυσιολογικών επίμυων και επίμυων με πειραματική αρθρίτιδα

Η μάζα του ιστού που ελήφθη από φυσιολογικούς επίμυες (N = 9) ήταν 43.57 ± 6.39 mg για τα δείγματα της κοιλιακής αορτής και 34.05 ± 5.67 mg για τα δείγματα της κάτω κοίλης φλέβας. Τα φυσιολογικά επίπεδα ισταμίνης ήταν αντίστοιχα 0.66 ± 0.08 ng/mg και 0.73 ± 0.09 ng/mg. Κατά τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν προέκυψε σημαντική διαφορά μεταξύ των παραπάνω τιμών ($P > 0.05$, paired t-test, Παράρτημα Π.Ι.1, Εικόνα 3.2), ούτε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της μάζας του ιστού με τα επίπεδα ισταμίνης που προσδιορίστηκαν σε κάθε δείγμα ($P > 0.05$, Εικόνα 3.3).

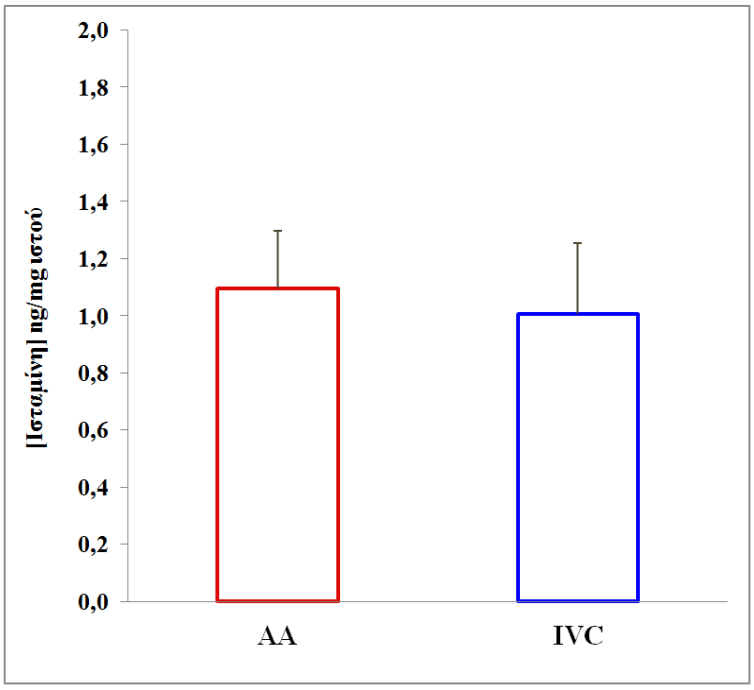


Εικόνα 3.2. Επίπεδα ισταμίνης σε φυσιολογικά αγγεία
Δείγματα κοιλιακής αορτής (AA) και κάτω κοίλης φλέβας (IVC) φυσιολογικών επίμυων (N = 9)



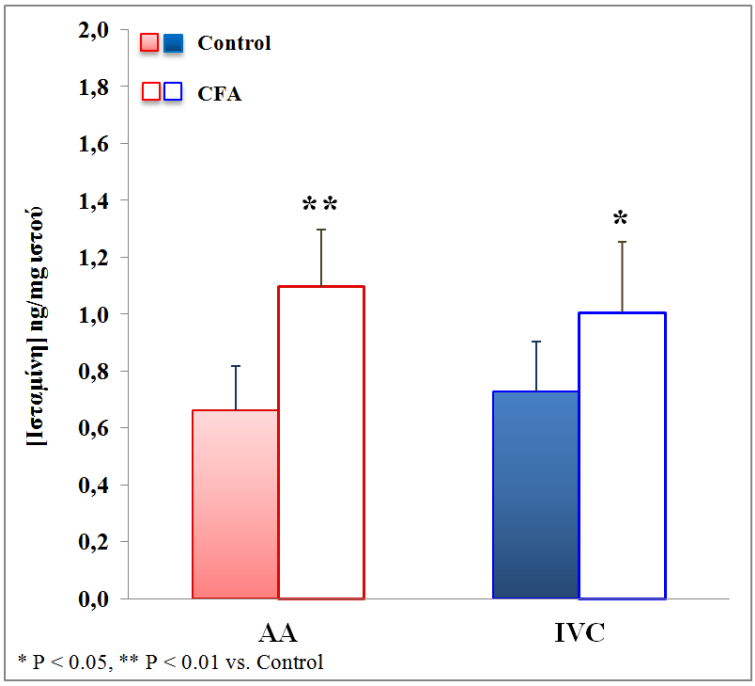
Εικόνα 3.3. Συσχέτιση μάζας ιστού και επιπέδων ισταμίνης
στα δείγματα κοιλιακής αορτής (○) και κάτω κοίλης φλέβας (●) φυσιολογικών επίμυων, r: Spearman's correlation coefficient.

Μετά την εγκατάσταση ΠΑ με τη συστηματική χορήγηση 0.1mg/0.1ml CFA τα επίπεδα ισταμίνης ήταν 1.10 ± 0.08 ng/mg και 1.01 ± 0.09 ng/mg ιστού στην κοιλιακή αορτή και την κάτω κοίλη φλέβα, αντίστοιχα, και δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους ($P > 0.05$, paired t-test, Παράρτημα Π.Ι.1, Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4. Επίπεδα ισταμίνης σε πειραματική αρθρίτιδα
Δείγματα κοιλιακής αορτής (AA) και κάτω κοίλης φλέβας (IVC) επίμυων με πειραματική αρθρίτιδα (N = 9).

Η εγκατάσταση ΠΑ αύξησε στατιστικά σημαντικά ($P < 0.05$, ANOVA, Παράρτημα Π.Ι.2) τα επίπεδα ισταμίνης στα παρασκευάσματα των αγγείων σε σχέση με τα επίπεδα της αμίνης που προσδιορίστηκαν στους αντίστοιχους ιστούς φυσιολογικών επίμυων (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5. Επίπεδα ισταμίνης στα αγγεία
Δείγματα κοιλιακής αορτής (AA) και κάτω κοίλης φλέβας (IVC) φυσιολογικών επίμυων (N = 9) και πειραματοζώων (N = 12-15) με πειραματική αρθρίτιδα (CFA).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά την ομογενοποίηση του ιστού σε 0.4N υπερχλωρικό οξύ (Διάγραμμα 2.1) καταστρέφονται οι κυτταρικές μεμβράνες. Έτσι, τα επίπεδα ισταμίνης που προσδιορίστηκαν αντιπροσωπεύουν τη συνολική ισταμίνη που εντοπίζεται στους ιστούς, είτε αυτή εντοπίζεται στον ενδοκυττάριο είτε στον εξωκυττάριο χώρο (Εικόνες 3.2, 3.4). Η απουσία στατιστικά σημαντικής συσχέτισης της μάζας του ιστού και των επιπέδων ισταμίνης στα δείγματα των αγγείων (Εικόνα 3.3) ελαχιστοποίησε την επίδραση της μάζας του παρασκευάσματος στον ποσοτικό προσδιορισμό της ισταμίνης.

Οι μεταβολές στα επίπεδα ισταμίνης στα αγγεία χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτης για τη διερεύνηση της πρόκλησης έξω-αρθρικών φλεγμονωδών

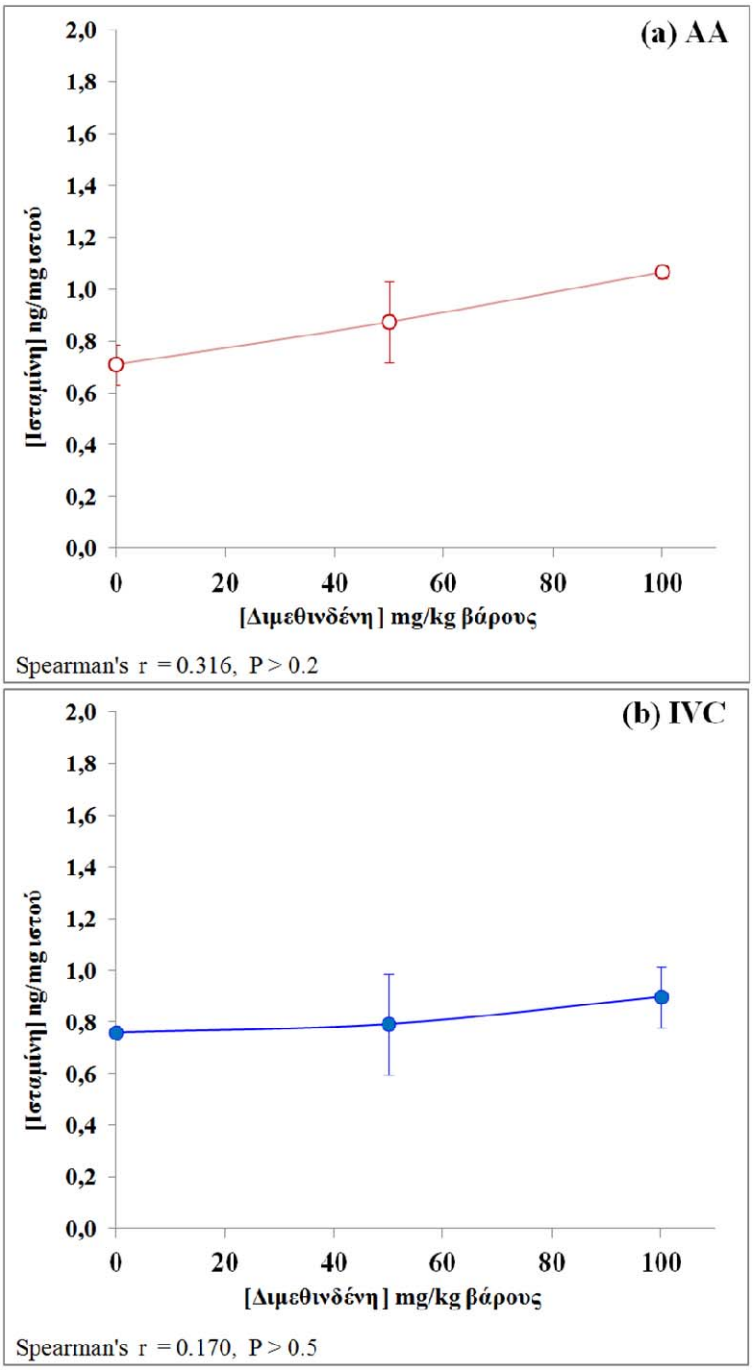
εκδηλώσεων στην ΠΑ. Οι φυσιολογικοί επίμυες έλαβαν ενδοδερμικά στη βάση της ουράς Φ.Ο. και όχι υγρή παραφίνη (Πίνακας 2.2), στην οποία είναι διαλυμένος ο CFA, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι η υγρή παραφίνη αποτελεί αρθριτογόνο παράγοντα και η χορήγησή της σε επίμυες προκαλεί τοπική φλεγμονώδη αντίδραση στις αρθρώσεις αυξάνοντας την ανοσολογική απάντηση (Kleinau *et al*. 1993, Holmdahl *et al*. 1992). Η χορήγηση CFA προκάλεσε την εμφάνιση σημείων αρθρίτιδας στα άκρα των πειραματοζώων (Εικόνα 3.1), καθώς και στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της ισταμίνης στα αγγεία σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς επίμυες (Εικόνα 3.5). Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ενδείξεις συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης στο πειραματικό πρότυπο αρθρίτιδας που εγκαταστάθηκε με τη χορήγηση CFA.

Τέλος, στις *in vivo* μελέτες, όπως αυτή που περιγράφεται στη διατριβή, οι περιορισμοί προέρχονται κυρίως από την παρουσία πλήθους άγνωστων, μη ελεγχόμενων μεταβλητών, όπως η κατανομή ποικίλων τύπων κυττάρων και η ανταλλαγή ουσιών μέσω της αιματικής ροής (Kessler *et al.* 1995, Dartt 2002).

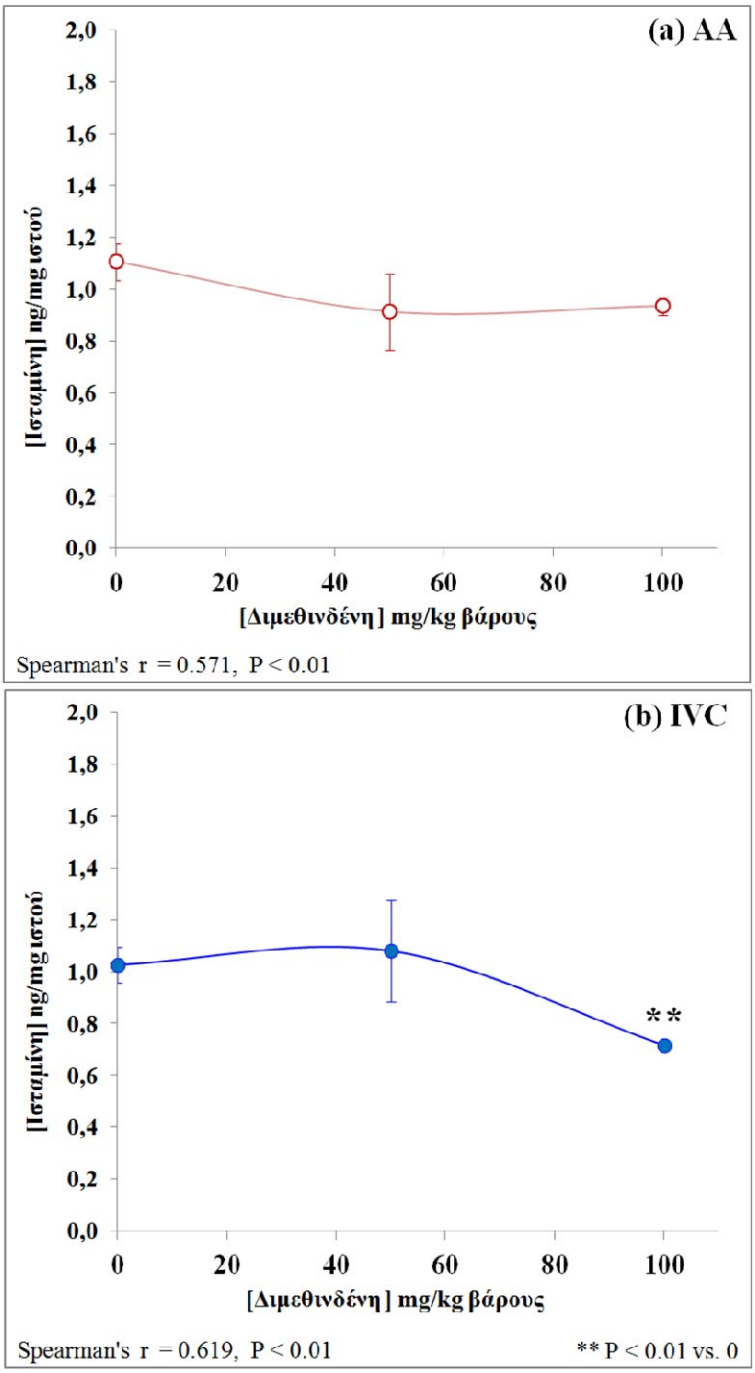
3.2. <u>Ερώτημα 2^{ο}</u>: Παρατηρείται αυτορυθμιστική δράση της ισταμίνης στα σπλαχνικά αγγεία; Συμμετέχουν οι υποδοχείς της ισταμίνης στις μεταβολές στα αγγεία επίμυων με ΠΑ; Ποια η επίδραση της συστηματικής χορήγησης ανταγωνιστών των H_1, H_3 και H_4 υποδοχέων στα επίπεδα ισταμίνης στα αγγεία φυσιολογικών επίμυων και πειραματοζώων με ΠΑ;

3.2.1. Επίδραση των ανταγωνιστών των H_1 υποδοχέων στα επίπεδα ισταμίνης στα σπλαχνικά αγγεία

Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση διμεθινδένης σε φυσιολογικούς επίμυες δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($P > 0.05$, Παράρτημα Π.Ι.3) δόσης φαρμάκου-επιπέδων ισταμίνης τόσο στην κοιλιακή αορτή (Εικόνα 3.6a), όσο και στην κάτω κοίλη φλέβα (Εικόνα 3.6b). Αντίθετα, στατιστικά σημαντική ($P < 0.01$, Παράρτημα Π.Ι.3) συσχέτιση μεταξύ της δόσης της διμεθινδένης και των επιπέδων της ισταμίνης παρατηρήθηκε στην κοιλιακή αορτή (Εικόνα 3.7a) και στην κάτω κοίλη φλέβα (Εικόνα 3.7b) επίμυων με πειραματική αρθρίτιδα.



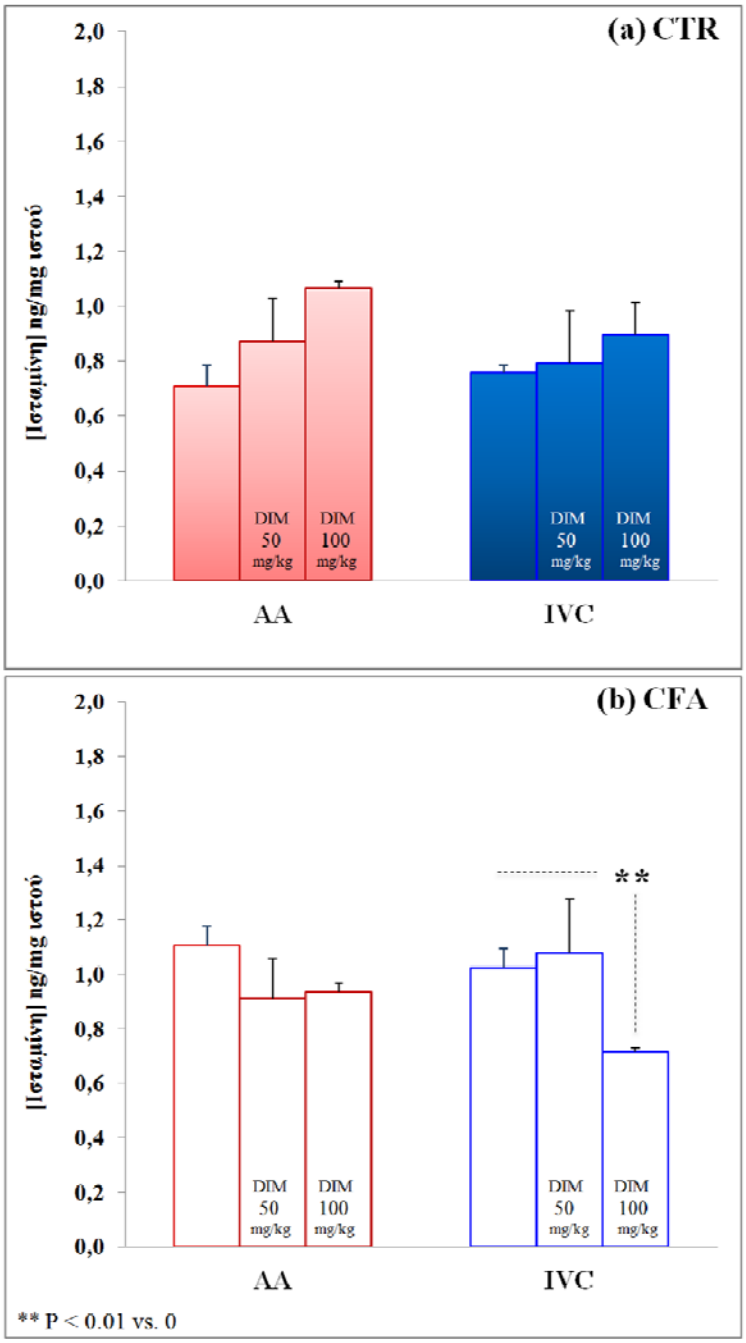
Εικόνα 3.6. Σχέση δόσης-αποτελέσματος της επίδρασης διμεθινδένης στα επίπεδα ισταμίνης φυσιολογικών επίμυων
(a) κοιλιακή αορτή (AA) και (b) κάτω κοίλη φλέβα (IVC) (N = 3-8).



Εικόνα 3.7. Σχέση δόσης-αποτελέσματος της επίδρασης διμεθινδένης στα επίπεδα ισταμίνης επίμυων με πειραματική αρθρίτιδα
(a) κοιλιακή αορτή (AA) και (b) κάτω κοίλη φλέβα (IVC) (N = 5-8).

Στα αγγεία των φυσιολογικών επίμυων, η χορήγηση διμεθινδένης δεν μετέβαλε σημαντικά ($P > 0.05$, Παράρτημα Π.Ι.4) τα επίπεδα της ισταμίνης στα αγγεία και στις δύο δόσεις που χορηγήθηκε (Εικόνα 3.8a).

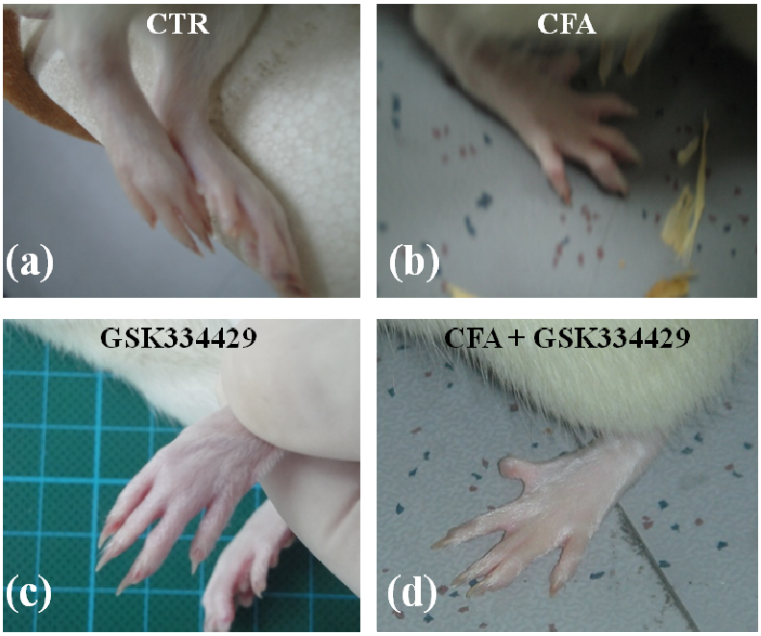
Στην πειραματική αρθρίτιδα, η συστηματική εφάπαξ χορήγηση 100mg/kg διμεθινδένης μείωσε στατιστικά σημαντικά ($P < 0.01$, Παράρτημα Π.Ι.4) τα επίπεδα της ισταμίνης στην κάτω κοίλη φλέβα σε σύγκριση με τα επίπεδα της αμίνης που προσδιορίστηκαν στα δείγματα του ιστού που ελήφθησαν από επίμυες με πειραματική αρθρίτιδα, στους οποίους δεν είχε χορηγηθεί το αντισταμινικό φάρμακο (Εικόνα 3.8b). Αντίθετα, η διμεθινδένη δεν μετέβαλε σημαντικά ($P > 0.05$, Παράρτημα Π.Ι.4) τα επίπεδα της ισταμίνης στην κοιλιακή αορτή των πειραματοζώων με πειραματική αρθρίτιδα (Εικόνα 3.8b a) στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν.



Εικόνα 3.8. Επίπεδα ισταμίνης στα αγγεία μετά τη χορήγηση διμεθινδένης κοιλιακή αορτή (AA) και κάτω κοίλη φλέβα (IVC) (a) φυσιολογικών επίμυων (CTR) και (b) επίμυων με πειραματική αρθρίτιδα (CFA) (DIM) (N = 3-8).

3.2.2. Επίδραση των ανταγωνιστών των H_3 υποδοχέων στα επίπεδα ισταμίνης στα σπλαχνικά αγγεία

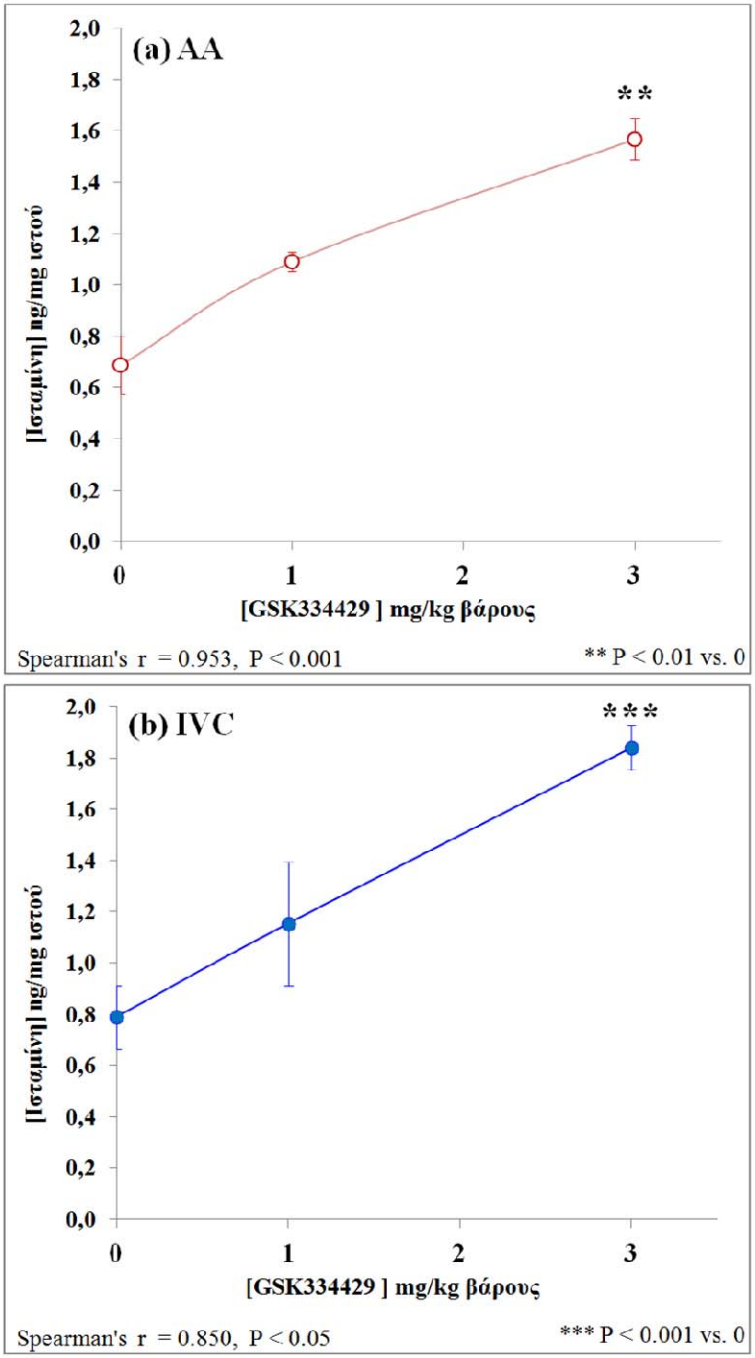
Κατά τη χορήγηση του ανταγωνιστή των H_3 υποδοχέων GSK334429 δεν παρατηρήθηκε αγκύλωση των δακτύλων στα άκρα των φυσιολογικών επίμυων και των πειραματοζώων με ΠΑ (Εικόνα 3.9).



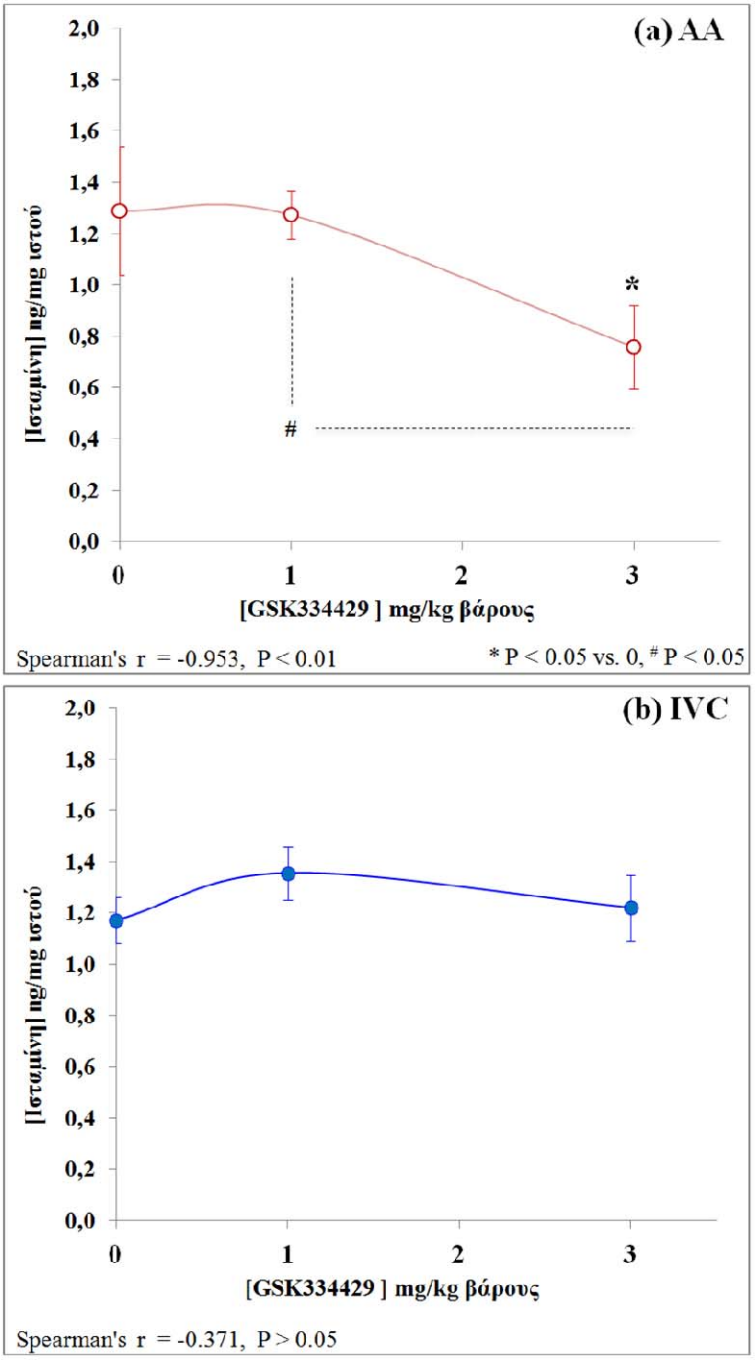
Εικόνα 3.9. Κλινική εικόνα άκρων μετά τη χορήγηση GSK334429 φυσιολογικών επίμυων (a, c) και πειραματοζώων με πειραματική αρθρίτιδα (b, d), χωρίς (a, b) και μετά (c, d) τη χορήγηση του ανταγωνιστή των H_3 υποδοχέων GSK334429 σε δόση 3mg/kg. Στα ζώα με πειραματική αρθρίτιδα (CFA) εμφανίστηκε οίδημα και αγκύλωση στις αρθρώσεις (b), σημεία που δεν παρατηρήθηκαν στα άκρα των φυσιολογικών επίμυων (CTR, a). Οι φλεγμονώδεις αλλοιώσεις ήταν εμφανώς μικρότερες στα ζώα που έλαβαν GSK334429 (CFA + GSK334429, c-d).

Η συσχέτιση δόσης ουσίας-επιπέδων ισταμίνης μετά την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του ανταγωνιστή των H_3 υποδοχέων GSK334429 σε φυσιολογικούς επίμυες ήταν στατιστικά σημαντική ($P < 0.05$, Παράρτημα Π.Ι.5) τόσο στην κοιλιακή αορτή (Εικόνα 3.10a), όσο και στην κάτω κοίλη φλέβα (Εικόνα 3.10b). Στους επίμυες με πειραματική αρθρίτιδα, στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της δόσης του GSK334429 και των επιπέδων ισταμίνης ($P < 0.01$, Παράρτημα Π.Ι.5) παρατηρήθηκε μόνο στην κοιλιακή αορτή (Εικόνα 3.11a), ενώ στην κάτω κοίλη φλέβα η συσχέτιση ήταν οριακά σημαντική ($P = 0.062$, Παράρτημα Π.Ι.5, Εικόνα 3.11b).

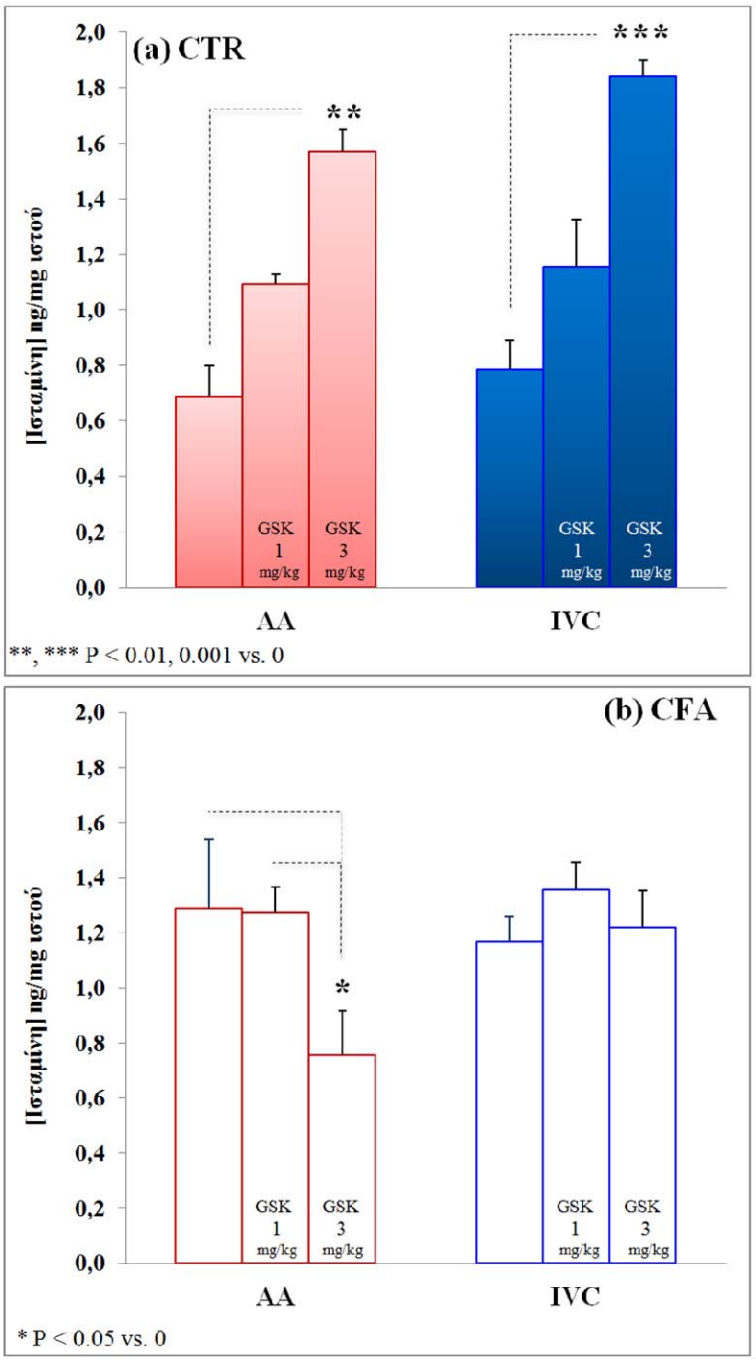
Στους φυσιολογικούς επίμυες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων ισταμίνης και στα δύο αγγεία ($P < 0.01$, ANOVA, Παράρτημα Π.Ι.6), όταν ο GSK334429 χορηγήθηκε στη μεγαλύτερη δόση των 3mg/kg (Εικόνα 3.12a). Στους επίμυες με πειραματική αρθρίτιδα, τα επίπεδα της ισταμίνης μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά ($P < 0.05$, ANOVA, Παράρτημα Π.Ι.6) μόνο στην κοιλιακή αορτή των επίμυων που έλαβαν εφ' άπαξ 3mg/kg GSK334429 (Εικόνα 3.12b). Αντίθετα, ο GSK334429 δεν επέφερε σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της ισταμίνης στην κάτω κοίλη φλέβα ($P > 0.05$, ANOVA, Παράρτημα Π.Ι.6) των πειραματοζώων με πειραματική αρθρίτιδα (Εικόνα 3.12b).



Εικόνα 3.10. Σχέση δόσης-αποτελέσματος της επίδρασης GSK334429 στα επίπεδα ισταμίνης φυσιολογικών επίμυων
(a) κοιλιακή αορτή (AA) και (b) κάτω κοίλη φλέβα (IVC) (N = 3-4)



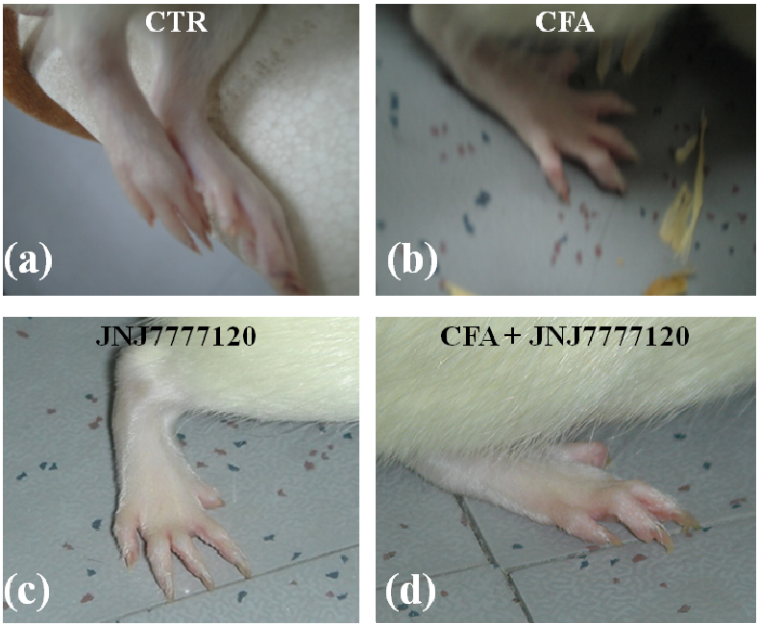
Εικόνα 3.11. Σχέση δόσης-αποτελέσματος της επίδρασης GSK334429 στα επίπεδα ισταμίνης σε πειραματική αρθρίτιδα
(a) κοιλιακή αορτή (AA) και (b) κάτω κοίλη φλέβα (IVC) (N = 3-8).



Εικόνα 3.12. Επίπεδα ισταμίνης μετά τη χορήγηση GSK334429 (GSK) κοιλιακή αορτή (AA) και κάτω κοίλη φλέβα (IVC) (a) φυσιολογικών επίμυων (CTR) και (b) επίμυων με πειραματική αρθρίτιδα (CFA) (N = 3-8)

3.2.3. Επίδραση των ανταγωνιστών των H_4 υποδοχέων στα επίπεδα ισταμίνης στα σπλαχνικά αγγεία

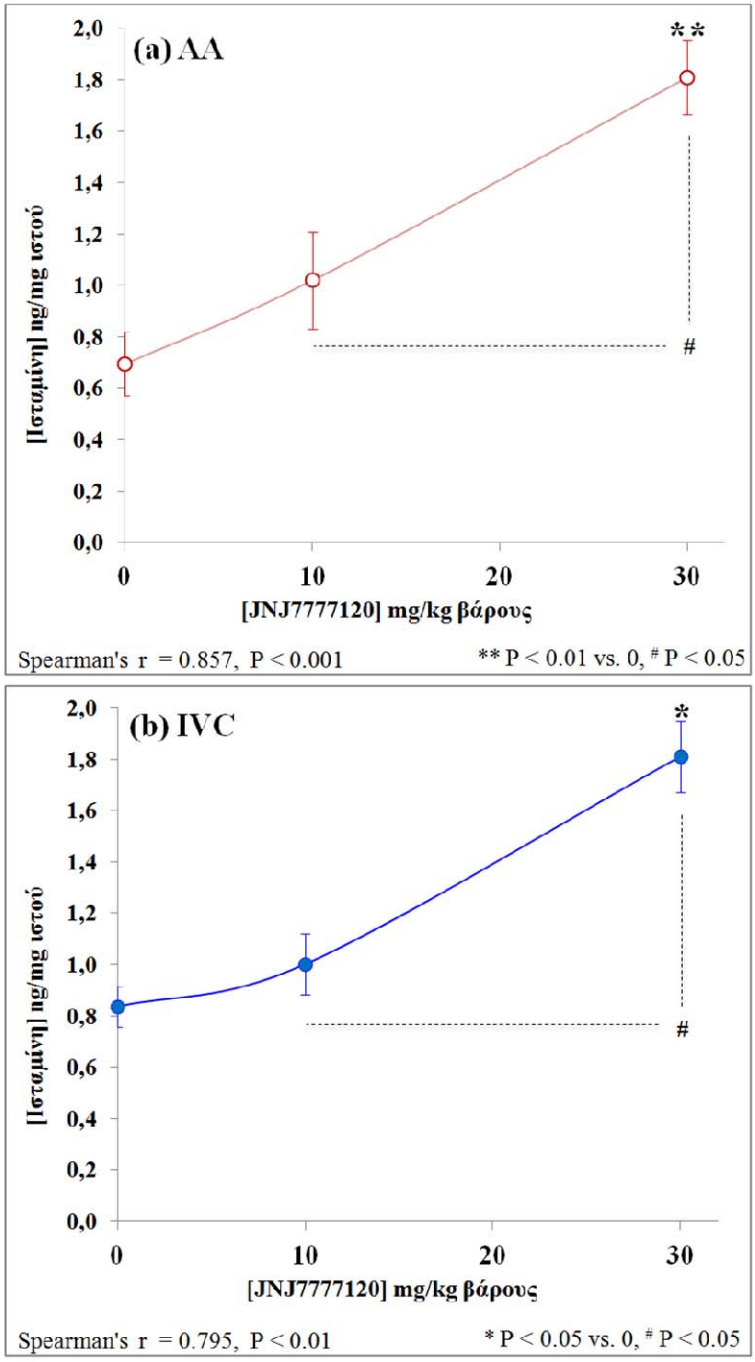
Μετά τη ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του ανταγωνιστή των H_4 υποδοχέων JNJ7777120 σε επίμυες με πειραματική αρθρίτιδα παρατηρήθηκε μερική αγκύλωση στα δάκτυλα των πειραματοζώων (Εικόνα 3.13).



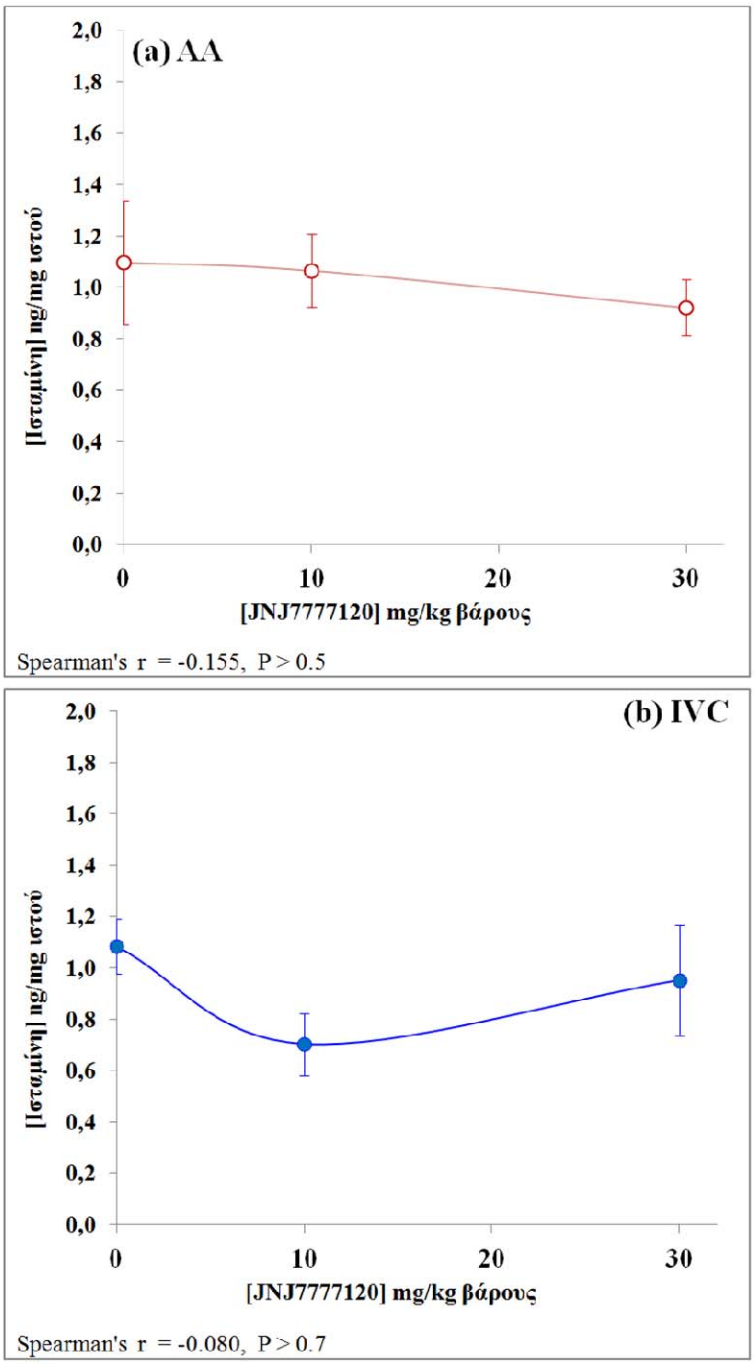
Εικόνα 3.13. Κλινική εικόνα άκρων μετά τη χορήγηση JNJ7777120 φυσιολογικών επίμυων (a, c) και πειραματοζώων με πειραματική αρθρίτιδα (b, d), χωρίς (a, b) και μετά (c, d) τη χορήγηση του ανταγωνιστή των H_4 υποδοχέων JNJ7777120 σε δόση 30mg/kg. Στα ζώα με πειραματική αρθρίτιδα (CFA) εμφανίστηκε οίδημα και αγκύλωση στις αρθρώσεις (b), σημεία που δεν παρατηρήθηκαν στα άκρα των φυσιολογικών επίμυων (CTR, a). Φλεγμονώδεις αλλοιώσεις στα ζώα με πειραματική αρθρίτιδα που έλαβαν JNJ7777120 (CFA + JNJ7777120) παρατηρήθηκαν μερικώς (d).

Η χορήγηση του JNJ7777120 στα φυσιολογικά πειραματόζωα οδήγησε σε στατιστικά σημαντική σχέση δόσης-επιπέδων ισταμίνης ($P > 0.5$, Παράρτημα Π.Ι.7) στην κοιλιακή αορτή (Εικόνα 3.14a) και στην κάτω κοίλη φλέβα (Εικόνα 3.14b), ενώ στους επίμυες με πειραματική αρθρίτιδα, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($P < 0.01$, Παράρτημα Π.Ι.7) συσχέτιση μεταξύ της δόσης του JNJ7777120 και των επιπέδων ισταμίνης στα αγγεία αυτά (Εικόνα 3.15). Είναι ενδιαφέρον ότι, ενώ τα επίπεδα ισταμίνης στα αγγεία των φυσιολογικών επίμυων αυξήθηκαν μετά τη χορήγηση του JNJ7777120, δεν παρατηρήθηκε παράλληλη εμφάνιση σημείων αρθρίτιδας στα άκρα των πειραματοζώων (Εικόνα 3.13).

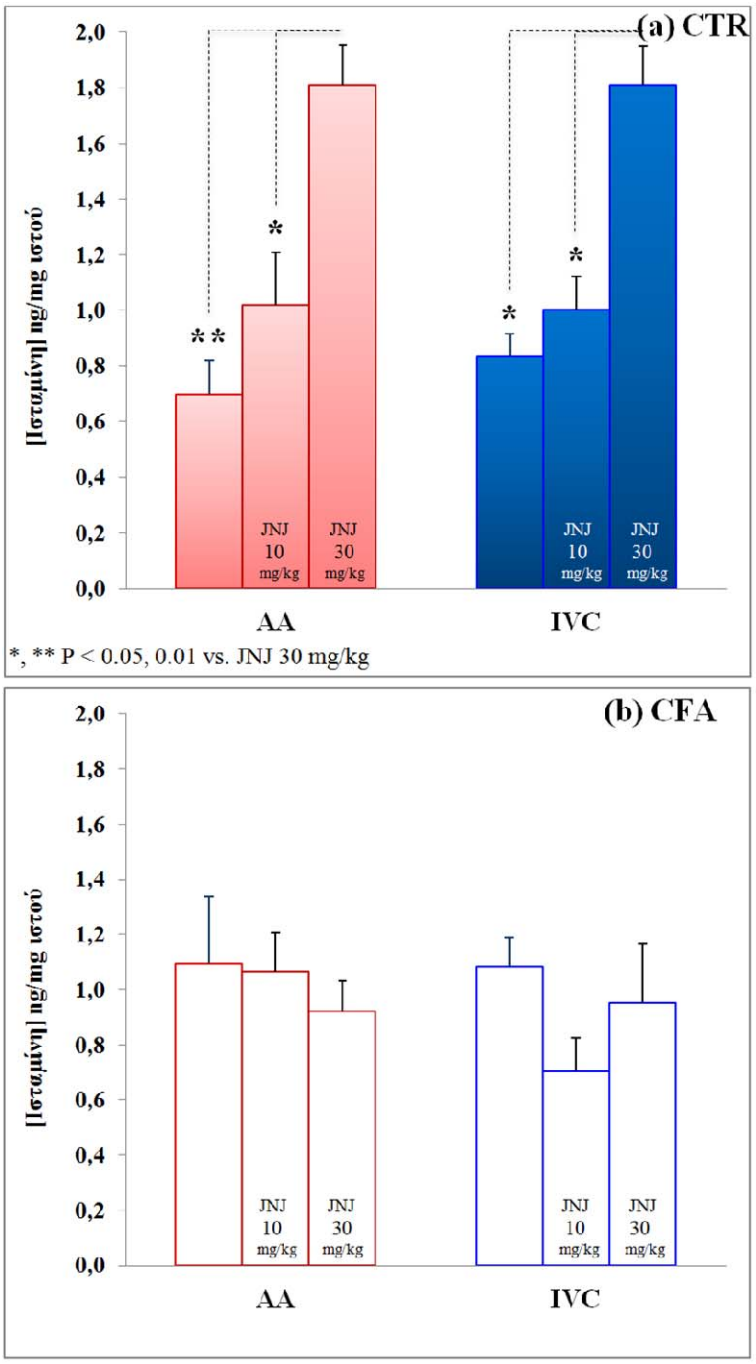
Όπως και στην περίπτωση του GSK334429 (Εικόνα 3.12), τα επίπεδα ισταμίνης και στα δύο αγγεία των φυσιολογικών επίμυων αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά ($P < 0.05$, ANOVA, Παράρτημα Π.Ι.6), όταν ο JNJ7777120 χορηγήθηκε στη μεγαλύτερη δόση των 30mg/kg (Εικόνα 3.16a). Αντίθετα, στους επίμυες με πειραματική αρθρίτιδα, η χορήγηση του JNJ7777120 δεν μετέβαλε στατιστικά σημαντικά ($P > 0.05$, ANOVA, Παράρτημα Π.Ι.8) τα επίπεδα της ισταμίνης ούτε στην κοιλιακή αορτή ούτε στην κάτω κοίλη φλέβα (Εικόνα 3.16b).



Εικόνα 3.14. Σχέση δόσης-αποτελέσματος της επίδρασης JNJ7777120 στα επίπεδα ισταμίνης φυσιολογικών επίμυων
(a) κοιλιακή αορτή (AA) και (b) κάτω κοίλη φλέβα (IVC) (N = 4-6).



Εικόνα 3.15. Σχέση δόσης-αποτελέσματος της επίδρασης JNJ7777120 στα επίπεδα ισταμίνης σε πειραματική αρθρίτιδα
(a) κοιλιακή αορτή (AA) και (b) κάτω κοίλη φλέβα (IVC) επίμυων με πειραματική αρθρίτιδα (N = 4-8)



Εικόνα 3.16. Επίπεδα ισταμίνης μετά τη χορήγηση JNJ7777120 (JNJ) κοιλιακή αορτή (AA) και κάτω κοίλη φλέβα (IVC) (a) φυσιολογικών επίμυων (CTR) και (b) επίμυων με πειραματική αρθρίτιδα (CFA) (N = 4-8)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η συστηματική χορήγηση των ανταγωνιστών των υποδοχέων της ισταμίνης σε φυσιολογικούς επίμυες έδειξε ότι η αυτορυθμιστική δράση της ισταμίνης τόσο στην κοιλιακή αορτή όσο και στην κάτω κοίλη φλέβα επιτελείται μέσω των H_3 και H_4 υποδοχέων (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1. Μεταβολές στα επίπεδα ισταμίνης στα αγγεία
Συγκριτικές μεταβολές στα επίπεδα ισταμίνης στα αγγεία φυσιολογικών επίμυων και πειραματοζώων με πειραματική αρθρίτιδα μετά από εφ' άπαξ συστηματική χορήγηση ανταγωνιστών των υποδοχέων ισταμίνης

ΟΥΣΙΑ	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΕΠΙΜΥΕΣ		ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ	
	AA	IVC	AA	IVC
-			↑	↑
Διμεθινδένη	↔	↔	↔	↓
GSK334429	↑	↑	↓	↔
JNJ7777120	↑	↑	↔	↔

AA: κοιλιακή αορτή, IVC: κάτω κοίλη φλέβα, ↑ αύξηση & ↔ μη στατιστικά σημαντική μεταβολή vs. επίπεδα ισταμίνης στα αντίστοιχα αγγεία φυσιολογικών επίμυων χωρίς χορήγηση ανταγωνιστών (-), ↓ μείωση & ↔ μη στατιστικά σημαντική μεταβολή vs. επίπεδα ισταμίνης στα αντίστοιχα αγγεία επίμυων με πειραματική αρθρίτιδα χωρίς χορήγηση ανταγωνιστών

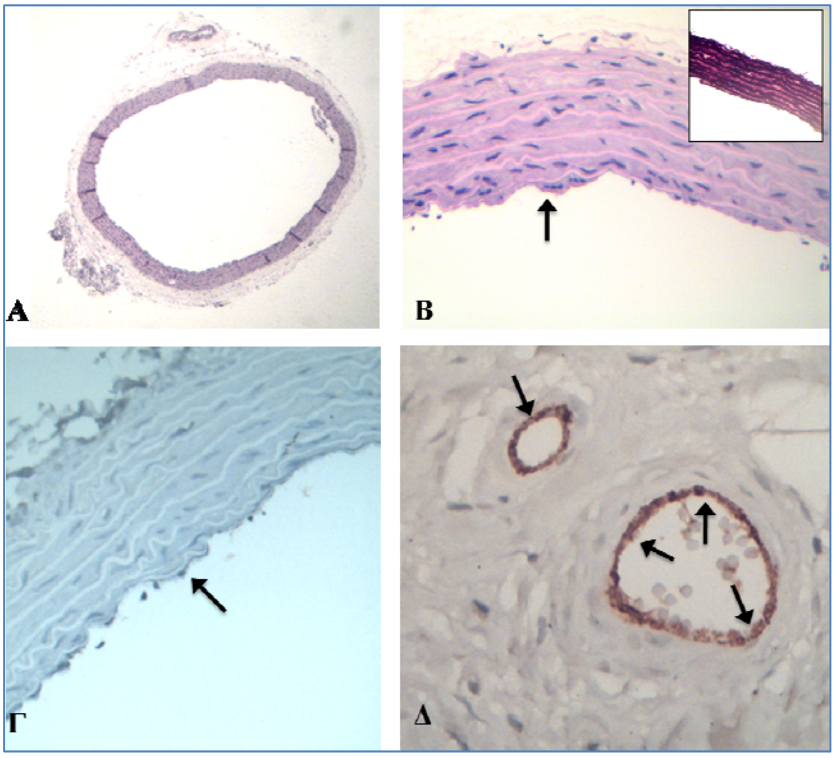
Και στις δύο περιπτώσεις, η δοσοεξαρτώμενη αύξηση των επιπέδων της ισταμίνης μετά τη χορήγηση των ανταγωνιστών (Εικόνες 3.10, 3.14) υποδηλώνει την ύπαρξη μηχανισμού, κατά τον οποίον η ενδογενής ισταμίνη δρώντας επί των H_3 και H_4 υποδοχέων καθορίζει τα φυσιολογικά επίπεδα της ιδίας στα σπλαχνικά αγγεία μέσω αρνητικής ρύθμισης. Αφού η χορήγηση των ουσιών ήταν συστηματική παραμένει αδιευκρίνιστο εάν η αυτορυθμιστική ιδιότητα της ισταμίνης είναι έμμεση ή/και άμεση επί των αγγείων. Αν και οι H_1

υποδοχείς δεν φάνηκε να συμμετέχουν στην αυτορυθμιστική δράση της ισταμίνης στα φυσιολογικά αγγεία (Εικόνα 3.6), η συμμετοχή τους σε έναν εν δυνάμει ομοιοστατικό, φυσιολογικό μηχανισμό δε μπορεί να αποκλειστεί.

Αντίθετα, οι H_1 υποδοχείς φαίνεται να αποκτούν ρόλο στην παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων της ισταμίνης στην κάτω κοίλη φλέβα κατά τη συστηματική φλεγμονή (Εικόνα 3.7), ενώ ο αποκλεισμός των H_3 υποδοχέων απεκατέστησε τα φυσιολογικά επίπεδα της ισταμίνης στην κοιλιακή αορτή στην πειραματική αρθρίτιδα (Εικόνα 3.11). Η απουσία εμφανούς συμμετοχής των H_4 υποδοχέων στην αυτορυθμιστική δράση της ισταμίνης στα φλεγμαίνοντα αγγεία (Εικόνα 3.15), σε αντίθεση με τα φυσιολογικά, υποστηρίζει το ομοιοστατικό, φυσιολογικό ρόλο του και απομακρύνει την πιθανότητα εμπλοκής του υποδοχέα στη συστηματική φλεγμονή, τουλάχιστον όσον αφορά τα σπλαχνικά αγγεία του επίμυος.

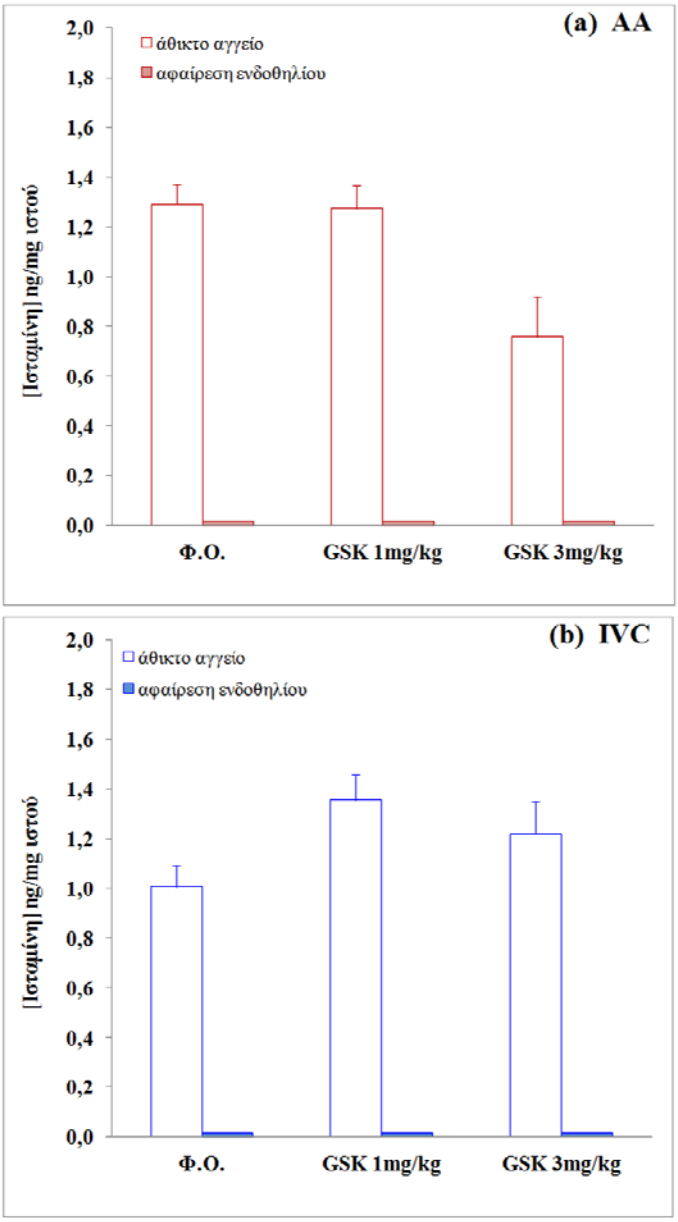
3.3. <u>Ερώτημα 3ο</u>: Συμβάλλει το αγγειακό ενδοθήλιο στην αυτορυθμιστική δράση της ισταμίνης στα αγγεία στη συστηματική φλεγμονή;

Η επιτυχής *ex vivo* εξαίρεση του ενδοθηλίου (§2.2.4) επιβεβαιώθηκε με ιστολογικές εξετάσεις των παρασκευασμάτων, όπου διαφαίνεται η πλήρης αφαίρεσή του χωρίς ταυτόχρονη βλάβη στον μέσο χιτώνα (Εικόνα 3.17).

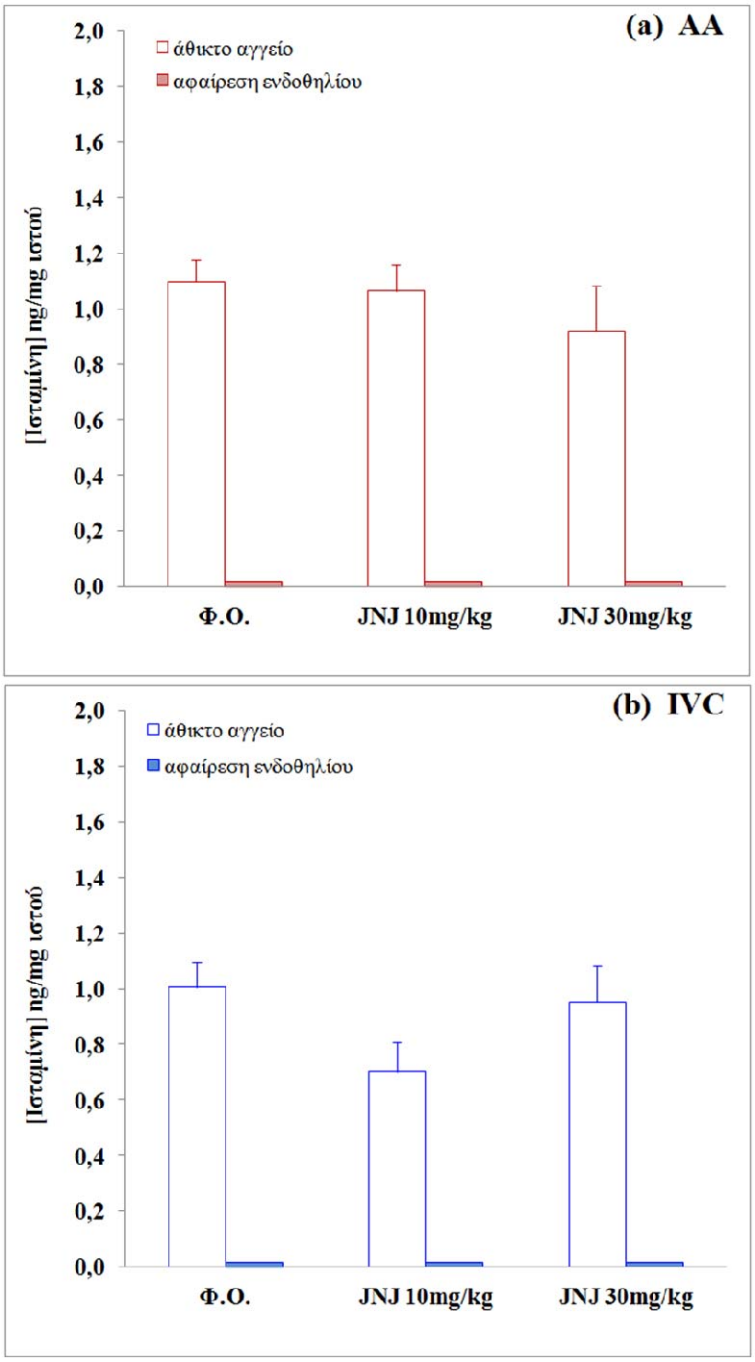


Εικόνα 3.17. Εγκάρσια τομή αορτής αρουραίου απουσία ενδοθηλίου
Α. Χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης, x25. **Β**. Απουσία ενδοθηλίου στην προσαύλια επιφάνεια του αορτικού τοιχώματος (βέλος), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, x200. Ένθετο πλαίσιο: Η χρώση ορσεΐνης αναδεικνύει τις ελαστικές ίνες του τοιχώματος της αορτής, x100. **Γ.** Ανοσοϊστοχημική χρώση για τον ενδοθηλιακό δείκτη CD31 επιβεβαιώνει την απουσία ενδοθηλίου στην προσαύλια επιφάνεια του αορτικού τοιχώματος (βέλος), x200, ενώ **Δ.** αναδεικνύεται η παρουσία του σε αγγεία του θετικού μάρτυρα (βέλη), x200

Μετά την αφαίρεση του ενδοθηλίου τα επίπεδα ισταμίνης δεν ήταν ανιχνεύσιμα ούτε στην κοιλιακή αορτή ούτε στην κάτω κοίλη φλέβα επίμυων με πειραματική αρθρίτιδα χωρίς ή μετά τη συστηματική χορήγηση GSK334429 (Εικόνα 3.18) ή JNJ7777120 (Εικόνα 3.19).



Εικόνα 3.18. Επίπεδα ισταμίνης απουσία ενδοθηλίου μετά από χορήγηση GSK334429 (GSK)
(a) κοιλιακή αορτή (AA) και (b) κάτω κοίλη φλέβα (IVC) επίμυων με πειραματική αρθρίτιδα (N = 4-8)



Εικόνα 3.19. Επίπεδα ισταμίνης απουσία ενδοθηλίου μετά από χορήγηση JNJ7777120 (JNJ)

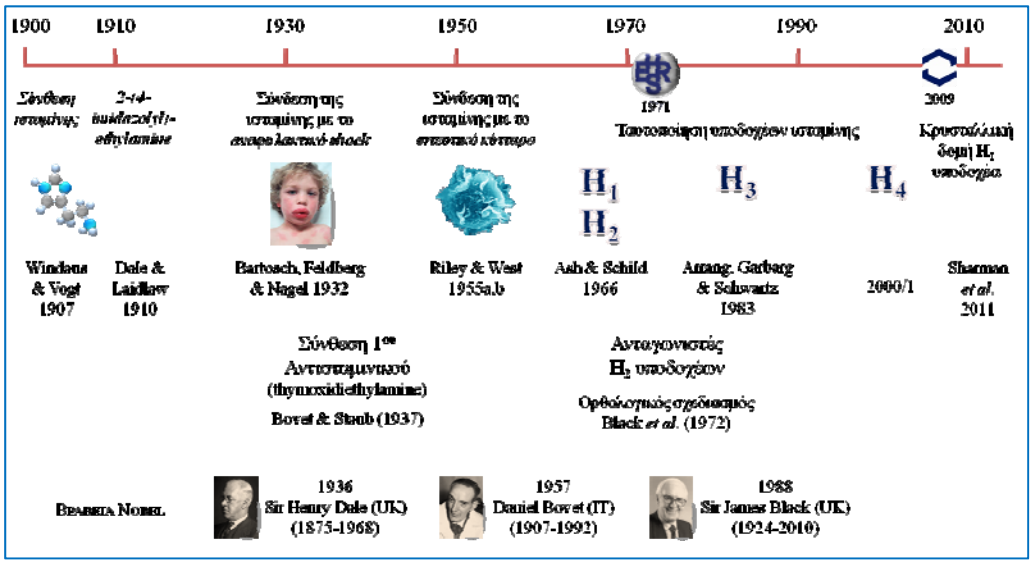
(a) κοιλιακή αορτή (AA) και (b) κάτω κοίλη φλέβα (IVC) επίμυων με πειραματική αρθρίτιδα (N = 4-8)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αν και η αξιοπιστία της μεθοδολογικής διαδικασίας κατά την *ex vivo* εξαίρεση του ενδοθηλίου χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, προκειμένου να αποκλειστεί η επίδραση των τεχνικών ή/και χημικών χειρισμών στην αποικοδόμηση της ισταμίνης και συνεπώς στην αδυναμία ανίχνευσής της, τα αποτελέσματα των ενδεικτικών αυτών πειραμάτων υποδηλώνουν ότι το ενδοθήλιο είναι η κύρια πηγή ισταμίνης στα σπλαχνικά αγγεία, όπου η ενδογενής αμίνη επιτελεί την αυτορυθμιστική δράση της.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι υποδοχείς της ισταμίνης έχουν αποδειχθεί σημαντικοί στόχοι για φαρμακολογικές θεραπευτικές παρεμβάσεις εδώ και πολλά χρόνια (Simons and Simons 1994, Akdis and Simons 2006, Parsons and Ganellin 2006, Simons and Simons 2011). Η κατανομή τους στους διάφορους ιστούς και ο ακριβής ρόλος τους στην παθοφυσιολογία δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί και συνεχίζουν να είναι υπό διερεύνηση (O'Mahony *et al*. 2011). Ο H_4 υποδοχέας, που ανακαλύφθηκε πρόσφατα, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή (Zampeli and Tiligada 2009) και έχει αποτελέσει τον πιο πρόσφατο σταθμό την ιστορία της ισταμίνης (Εικόνα 4.1), ανοίγοντας το δρόμο για τη διερεύνηση του ανοσορρυθμιστικού ρόλου της ισταμίνης στα φλεγμονώδη και αυτοάνοσα νοσήματα (De Esch *et al*. 2005, Bhatt *et al*. 2010, Stegaev *et al*. 2012).



Εικόνα 4.1. Σταθμοί στην ιστορία της ισταμίνης
(Parsons and Ganellin 2006)

Αν και η ισταμίνη μελετάται για περισσότερα από 100 χρόνια (Εικόνα 4.1), σήμερα, χρησιμοποιώντας αγωνιστές και ανταγωνιστές των υποδοχέων της ως φαρμακολογικά εργαλεία, η διεθνής ερευνητική κοινότητα προσπαθεί να κατανοήσει τις θεραπευτικές προοπτικές που προσφέρει αυτός ο επιστημονικός τομέας (Shahid *et al*. 2009; Tiligada *et al.* 2009).

Σκοπός της διατριβής ήταν η φαρμακολογική μελέτη της φλεγμονώδους απάντησης στα σπλαχνικά αγγεία υπό φυσιολογικό και τροποποιημένο υπόστρωμα, με κύριο στόχο τη διερεύνηση της περιφερικής αυτορρυθμιστικής δράσης της ισταμίνης στη συστηματική φλεγμονή. Δείκτη απετέλεσε ο προσδιορισμός των επιπέδων ισταμίνης (§2.2.5, Shore *et al.* 1959, Tiligada *et al*. 2000) στα περιφερικά αγγεία (Thompson and Brown 1987, Saito *et al.* 1996, Alexander and Elrod 2002) και συγκεκριμένα στην κάτω κοίλη φλέβα και στην κοιλιακή αορτή (§2.2.3). Ως πειραματικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε η συστηματική αρθρίτιδα, που εγκαταστάθηκε με τη χορήγηση CFA σε επίμυες (§2.2.2, Hirano *et al*. 1994, Ζαμπέλη 2009), και βασίστηκε στα δεδομένα που υποστηρίζουν την εμπλοκή της ισταμίνης, όχι μόνο σε αλλεργικές καταστάσεις, αλλά και σε άλλα φλεγμονώδη νοσήματα και σε αυτοάνοσες ασθένειες (§1.3, Ζαμπέλη 2009, Zampeli *et al*. 2008, 2009). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι παρά το πλήθος των πειραματικών προτύπων που έχουν αναπτυχθεί για τη μελέτη της αρθρίτιδας, κανένα δεν αντανακλά το σύνολο των αρθρικών και συστηματικών χαρακτηριστικών, τις ανοσολογικές ιδιότητες και τους γενετικούς παραγόντες της ανθρώπινης ασθένειας, ωστόσο, μέχρι σήμερα, η χρήση του CFA σε επίμυες αποτελεί αποδεκτό και αξιόπιστο πειραματικό πρότυπο (Hirano *et al*. 1994, Ζαμπέλη 2009, Hu *et al.* 2012).

Τα επίπεδα ισταμίνης στα δείγματα της κοιλιακής αορτής και της κάτω κοίλης φλέβας σε φυσιολογικούς επίμυες ήταν 0.66 ± 0.08 ng/mg και 0.73 ± 0.09 ng/mg ιστού, αντίστοιχα, χωρίς αυτή η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 3.2). Η εγκατάσταση της πειραματικής αρθρίτιδας είχε ως αποτέλεσμα την στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της ισταμίνης στην κοιλιακή αορτή και στην κάτω κοίλη φλέβα σε 1.10 ± 0.08 ng/mg και 1.01 ± 0.09 ng/mg ιστού, αντίστοιχα (Εικόνα 3.5). Αν και κατά την ιστολογική εξέταση των πρασκευασμάτων δακτύλων αρουραίου μετά τη χορήγηση του CFA δεν παρατηρήθηκαν στοιχεία φλεγμονής (Εικόνα 2.2), η καταγραφή του κλινικού φαινοτύπου μετά την εγκατάσταση της πειραματικής αρθρίτιδας έδειξε έκδηλα σημεία αρθρίτιδας και στα τέσσερα άκρα των επίμυων, τα οποία άρχισαν να εμφανίζονται προοδευτικά 5 ημέρες μετά τη χορήγηση του CFA, με εμφανές οίδημα και αγκύλωση κατά τη $10^{η}$ έως την $20^{η}$ ημέρα (Εικόνα 3.1). Και στις δύο περιπτώσεις των φυσιολογικών και των επίμυων με ΠΑ χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά ανταγωνιστές των H_1, H_3 και H_4 υποδοχέων της ισταμίνης σε διάφορες δόσεις (Πίνακας 2.2), προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος των υποδοχέων αυτών στην περιφερική αυτορυθμιστική δράση της ισταμίνης στα αγγεία (§1.2).

Οι H_1 ανταγωνιστές περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό ενώσεων με διαφορετικές φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες και κατατάσσονται σε πρώτης και δεύτερης γενιάς. Πολλοί από τους ανταγωνιστές πρώτης γενιάς χρησιμοποιούνται για περισσότερο από πενήντα χρόνια για την αντιμετώπιση αλλεργιών (Emanuel 1999, Sharma and Hamelin 2003, Simons and Simons 2011). Η διμεθινδένη (Εικόνα 1.11) που χρησιμοποιήθηκε στη διατριβή ανήκει στους H_1 ανταγωνιστές πρώτης γενιάς (§1.2.2). Στους

φυσιολογικούς επίμυες, η διμεθινδένη δε μετέβαλε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα της ισταμίνης στην κοιλιακή αορτή και στην κάτω κοίλη φλέβα (Εικόνα 3.6), σε αντίθεση με τους επίμυες με πειραματική αρθρίτιδα, όπου προκάλεσε δοσοεξαρτώμενη μείωση των επιπέδων της ισταμίνης μόνο στην κάτω κοίλη φλέβα (Εικόνα 3.7). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν τη μη συμμετοχή των H_1 υποδοχέων στη φυσιολογική αυτορυθμιστική δράση της ισταμίνης στα σπλαχνικά αγγεία των επίμυων, αλλά την εμπλοκή ενδογενών μηχανισμών, που μεσολαβούνται μέσω των H_1 υποδοχέων και οδηγούν στην αύξηση των επιπέδων ισταμίνης, ιδιαιτέρως στις φλέβες κατά τη συστηματική φλεγμονή. Η διαφοροποίηση της απάντησης μεταξύ αρτηρίας και φλέβας αποτελεί το έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση αυτού του φαινοτύπου και του ρόλου του στη φλεγμονώδη διαδικασία.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η χορήγηση του εκλεκτικού ανταγωνιστή των H_3 υποδοχέων GSK334429 (§1.2.4, Εικόνα 1.17) σε φυσιολογικούς επίμυες οδήγησε σε δοσοεξαρτώμενη αύξηση των επιπέδων της ισταμίνης στα αγγεία που μελετήθηκαν (Εικόνα 3.10), ενώ στους επίμυες με πειραματική αρθρίτιδα οι H_3 υποδοχείς φάνηκε να εμπλέκονται στην ενδογενή αυτορυθμιστική δράση της ισταμίνης στην κοιλιακή αορτή, αλλά όχι στην κάτω κοίλη φλέβα (Εικόνα 3.11). Οι H_3 υποδοχείς εντοπίζονται, κυρίως, στο ΚΝΣ (Watanabe *et al.* 1984, Drutel *et al.* 2001, Haas *et al.* 2008), ενώ πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι δεν εκφράζονται στα μαστοκύτταρα (Gantner *et al.* 2002, Hofstra *et al.* 2003, Lippert *et al.* 2004). Οι H_3 υποδοχείς κατανέμονται στην περιφέρεια, σε μικρότερη πυκνότητα, μεταξύ άλλων στο γαστρεντερικό και στο καρδιαγγειακό σύστημα (Bertaccini *et al.* 1991, Stark 2007). Στο καρδιαγγειακό σύστημα εντοπίζονται, κυρίως, προσυναπτικά στις

μεταγαγγλιακές συμπαθητικές ίνες, που νευρώνουν τα αιμοφόρα αγγεία και την καρδιά και έχει προταθεί ότι ενεργοποιούνται από την ενδογενή ισταμίνη (Malinowska *et al*. 1998), γεγονός που υποστηρίζεται και από την εμπλοκή των H_3 υποδοχέων στην αυτορυθμιστική δράση της ισταμίνης που παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία (Εικόνα 3.12, Πίνακας 3.1). Αν και η πλειονότητα των παλαιότερων μελετών βασίστηκε στη θειοπεραμίδη, η οποία σήμερα κατατάσσεται στους ανταγωνιστές των H_3 και H_4 υποδοχέων (Εικόνα 1.16, Gbahou *et al.* 2006), η ενεργοποίηση των H_3 υποδοχέων έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει την απελευθέρωση νορεπινεφρίνης και κατά συνέπεια μειώνει τη νευρογενή αγγειοσύσπαση (Malinowska *et al*. 1998). Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι οι νεότεροι ανάστροφοι αγωνιστές των H_3 υποδοχέων θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην αντιμετώπιση του πόνου στα φλεγμονώδη νοσήματα και στο νευροπαθητικό πόνο (Hough and Rice 2011, Gemkow *et al*. 2009, Tiligada *et al*. 2009). Η διαφοροποίηση της εμπλοκής των H_3 υποδοχέων στην αυτορυθμιστική δράση της ισταμίνης σε φυσιολογικές συνθήκες και στη συστηματική φλεγμονή (Εικόνα 3.12) υποδηλώνει τη φυσιολογική αρνητική ρύθμιση των επιπέδων της ισταμίνης στα αγγεία, πιθανώς μέσω των περιφερικών προσυναπτικών H_3 υποδοχέων, η οποία αίρεται στη φλεγμονή κυρίως στις αρτηρίες (Πίνακας 3.1). Τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με την βελτίωση της κλινικής εικόνας των άκρων των επίμυων με πειραματική αρθρίτιδα (Εικόνα 3.9) μετά τη χορήγηση του GSK334429 (Εικόνα 1.18), αναδεικνύουν την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη, προκειμένου να αξιολογηθεί η δυνατότητα ρύθμισης της αγγειακής λειτουργείας σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις μέσω εκλεκτικών ουσιών που στοχεύουν τους H_3 υποδοχείς.

Σε αντίθεση με τους H_3 υποδοχείς, οι H_4 υποδοχείς φαίνεται ότι συμμετέχουν στο αρνητικό αυτορυθμιστικό δίκτυο της ισταμίνης στα φυσιολογικά αγγεία, αλλά δεν εμπλέκονται σε αντίστοιχους μηχανισμούς που ενεργοποιούνται κατά τη φλεγμονή (Εικόνα 3.16, Πίνακας 3.1). Η ουσία JNJ7777120 (Εικόνα 1.24), που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη, είναι ισχυρός εκλεκτικός ανταγωνιστής των H_4 υποδοχέων (Jiang *et al*. 2008) με πιθανές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Thurmond *et al*. 2004). Αν και πρόσφατα αναφέρθηκαν τα εξαρτώμενα από το είδος και τον ιστό φαρμακολογικά χαρακτηριστικά του JNJ7777120 (Coruzzi *et al.* 2012) και η λειτουργική εκλεκτικότητα του H_4 υποδοχέα (Seifert *et al.* 2011), δεν αποκλείεται οι παρατηρούμενες δράσεις του JNJ7777120 να προκύπτουν από την πρόσδεση της ουσίας σε νευρωνικούς H_4 υποδοχείς (Lethbridge and Chazot 2010) που ρυθμίζουν φυσιολογικές αγγειακές λειτουργίες. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται τόσο από την απουσία ιστολογικών φλεγμονωδών αλλοιώσεων στις αρθρώσεις των επιμύων με πειραματική αρθρίτιδα (Εικόνα 2.2), όσο και από τη μερική μόνο άρση των φλεγμονωδών αλλοιώσεων στα άκρα των ζώων με πειραματική αρθρίτιδα μετά τη χορήγηση του JNJ7777120 (Εικόνα 1.13).

Τέλος, η διαφοροποίηση της δράσης των ανταγωνιστών των υποδοχέων της ισταμίνης στα αγγεία υποδηλώνει ανεξερεύνητες μέχρι σήμερα ιδιότητες της ισταμίνης στο αγγειακό σύστημα, ενώ η προκαταρκτική μελέτη της συμμετοχής του ενδοθηλίου στις παραπάνω δράσεις της ισταμίνης κατέδειξε την επιτακτική ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης και αξιολόγησης της κλινικής και θεραπευτικής σημασίας της στο αγγειακό σύστημα.

5. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Τα επίπεδα ισταμίνης που προσδιορίστηκαν αντιπροσωπεύουν τη συνολική ισταμίνη που εντοπίζεται στους ιστούς, είτε αυτή εντοπίζεται στον ενδοκυττάριο είτε στον εξωκυττάριο χώρο. Η απουσία στατιστικά σημαντικής συσχέτισης της μάζας του ιστού και των επιπέδων ισταμίνης στα δείγματα των αγγείων ελαχιστοποίησε την επίδραση της μάζας του παρασκευάσματος στον ποσοτικό προσδιορισμό της ισταμίνης.
- Οι μεταβολές στα επίπεδα ισταμίνης στα αγγεία χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτης για τη διερεύνηση της πρόκλησης εξω-αρθρικών φλεγμονωδών εκδηλώσεων στην ΠΑ.
- Η χορήγηση CFA προκάλεσε την εμφάνιση σημείων αρθρίτιδας στα άκρα των πειραματοζώων, καθώς και στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της ισταμίνης στα αγγεία σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς επίμυες. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν *ενδείξεις* συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης στο πειραματικό πρότυπο αρθρίτιδας που εγκαταστάθηκε με τη χορήγηση CFA.
- Στις *in vivo* μελέτες, όπως αυτή που περιγράφεται στη διατριβή, οι περιορισμοί προέρχονται κυρίως από την παρουσία πλήθους άγνωστων, μη ελεγχόμενων μεταβλητών, όπως η κατανομή ποικίλων τύπων κυττάρων και η ανταλλαγή ουσιών μέσω της αιματικής ροής.
- Η χορήγηση διμεθινδένης δε μετέβαλε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα της ισταμίνης στα αγγεία των φυσιολογικών επίμυων στις δόσεις που χορηγήθηκε.

- Η χορήγηση GSK334429 στους φυσιολογικούς επίμυες προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων ισταμίνης στα αγγεία στη μεγαλύτερη δόση των 3mg/kg. Στους επίμυες με πειραματική αρθρίτιδα, τα επίπεδα της ισταμίνης μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά μόνο στην κοιλιακή αορτή των επίμυων που έλαβαν εφ'άπαξ 3mg/kg GSK334429.
- Ο JNJ7777120, όταν χορηγήθηκε στη μεγαλύτερη δόση των 30mg/kg, τα επίπεδα ισταμίνης και στα δύο αγγεία των φυσιολογικών επίμυων αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά. Αντίθετα, στους επίμυες με πειραματική αρθρίτιδα, η χορήγηση του JNJ7777120 δε μετέβαλε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα της ισταμίνης ούτε στην κοιλιακή αορτή ούτε στην κάτω κοίλη φλέβα.
- Από τα πειράματα καταδεικνύεται η αυτορυθμιστική δράση της ισταμίνης στα αγγεία των επίμυων με πειραματική αρθρίτιδα και έμμεσα η συμβολή του αγγειακού ενδοθηλίου στη δράση αυτή με την απελευθέρωση ισταμίνης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε, για πρώτη φορά, η πιθανή αυτορυθμιστική δράση της ισταμίνης και η συμμετοχή των υποδοχέων της στα μεγάλα αγγεία επίμυων, υπό φυσιολογικές συνθήκες και στη συστηματική φλεγμονή. Η επιλογή των σπλαχνικών αγγείων της κοιλιακής αορτής και της κάτω κοίλης φλέβας έγινε, αφενός λόγω του κομβικού τους ρόλου στο αγγειακό και κυκλοφορικό σύστημα, και κατ΄επέκταση στην παθοφυσιολογία του οργανισμού, αφετέρου λόγω προηγούμενων ευρημάτων που υποδήλωναν την αυτορυθμιστική δράση της ισταμίνης στην περιφέρεια. Για το σκοπό αυτό χορηγήθηκαν συστηματικά ανταγωνιστές των υποδοχέων της ισταμίνης σε φυσιολογικούς επίμυες και σε επίμυες με πειραματική αρθρίτιδα και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα ισταμίνης στα αγγεία, καθώς και η βέλτιστη δοσολογία των ανταγωνιστών σύμφωνα με τη σχέση δόσης-αποτελέσματος. Η επιλογή των ουσιών έγινε με βάση τις φαρμακολογικές τους ιδιότητες. Χρησιμοποιήθηκαν η διμεθινδένη, ανταγωνιστής των H_1 υποδοχέων, κυρίως ως μάρτυρας, αφού ο ρόλος των H_1 υποδοχέων στα αγγεία και τη φλεγμονή είναι αποδεκτός, αν και όχι πλήρως μελετημένος, και οι ουσίες GSK334429 και JNJ7777120, οι οποίες αναπτύχθηκαν πρόσφατα ως εκλεκτικοί ανταγωνιστές/ανάστροφοι αγωνιστές των H_3 και H_4 υποδοχέων αντίστοιχα. Μετά από στατιστική επεξεργασία και αξιολόγηση, τα αποτελέσματα έδειξαν την αυτορυθμιστική δράση της ισταμίνης στα περιφερικά αγγεία φυσιολογικών επίμυων, στην οποία συμμετέχουν οι H_3 και H_4 υποδοχείς. Η δράση αυτή διαφοροποιήθηκε στην πειραματική αρθρίτιδα, όπου οι H_1 και H_3 υποδοχείς ρύθμισαν αντίστοιχα τα επίπεδα ισταμίνης στις φλέβες και στις αρτηρίες των επίμυων. Στη συνέχεια, επειδή το ενδοθήλιο ρυθμίζει τον αγγειακό τόνο και την απελευθέρωση ισταμίνης και άλλων αγγειοδραστικών ουσιών, πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικές μελέτες μετά από *ex vivo* αφαίρεση του ενδοθηλίου στα αγγεία των επίμυων. Τα ευρήματα παρείχαν ενδείξεις για την εμπλοκή του ενδοθηλίου στην αυτορυθμιστική δράση της ισταμίνης στα περιφερικά αγγεία των επίμυων. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της διατριβής αποκάλυψαν νέους ρόλους της ισταμίνης στα περιφερικά αγγεία με την πιθανή συμμετοχή του αγγειακού ενδοθηλίου. Συγκεκριμένα, τα ευρήματα έδειξαν ότι τα επίπεδα της ισταμίνης στα φυσιολογικά σπλαχνικά αγγεία ρυθμίζονται μέσω των H_3 και H_4 υποδοχέων, ενώ κατά τη συστηματική φλεγμονή, η ρύθμιση διαφοροποιείται και εξαρτάται από τους H_1 και H_3 υποδοχείς στις φλέβες και στις αρτηρίες αντίστοιχα. Λαμβάνοντας υπόψη τη συμμετοχή των H_1 υποδοχέων στη φλεγμονή, το νευρορυθμιστικό ρόλο των H_3 υποδοχέων και τις ανοσορυθμιστικές ιδιότητες των H_4 υποδοχέων, τα αποτελέσματα αναμένεται να συμβάλουν στην περεταίρω αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης των υποδοχέων της ισταμίνης στις ομοιοστατικές λειτουργίες των αγγείων και στην αγγειακή συμμετοχή στη συστηματική φλεγμονή. Απώτερος σκοπός είναι η φαρμακολογική αξιολόγηση νέων αποτελεσματικότερων θεραπευτικών προσεγγίσεων στη φλεγμονή των αγγείων.

SUMMARY

This study investigated, for the first time, the potential autoregulatory action of histamine in the rat large peripheral vessels and the contribution of histamine receptors, both under physiological conditions and in systemic inflammation. The selection of the abdominal aorta and the inferior vena cava as experimental tissues was based on their vital role in the pathophysiology of the cardiovascular system and on the existing indications of the putative autoregulatory action of histamine in peripheral tissues. Therefore, various doses of histamine receptor antagonists were administered intraperitoneally in normal animals and in a rat model of experimental arthritis. Histamine levels were quantified in the blood vessels and the optimum dose of histamine receptor antagonists was determined from the resulting dose-response curve. The histamine receptor ligands were selected according to their pharmacological properties. The H_1 receptor antagonist dimethindene was mostly used as a control agent based on the accepted, but not fully elucidated role of the H_1 receptors in the functionality of blood vessels, as well as in numerous inflammatory processes. GSK334429 and JNJ7777120 have been recently developed and chatacterised as selective H_3 and H_4 antagonists/reverse agonists, respectively. Statistical analysis of the results showed that histamine exerts autoregulatory actions in the peripheral blood vessels of normal rats via binding to the H_3 and H_4 receptors. In experimental arthritis, H_1 and H_3 receptors seemed to underlie the autoregulatory properties of histamine in the rat abdominal aorta and inferior vena cava, respectively. Considering that the endothelium regulates the vascular tone and the release of histamine and other vasoactive substances, preliminary studies were performed in the rat blood vessels where the vascular endothelium was removed *ex vivo*. The results provided evidence towards the implication of the endothelium in the histamine autoregulatory action in the rat large blood vessels. In conclusion, the findings revealed new roles of histamine in the peripheral blood vessels, with the possible involvement of the vascular endothelium. In particular, the results demonstrated that the histamine levels are regulated through the H_3 and H_4 receptors in the peripheral blood vessels of normal rats, whereas a differential regulation was observed in systemic inflammation that was elicited via the H_1 and H_3 receptors in veins and arteries, respectively. Considering the contribution of the H_1 receptors in inflammation, the neuroregulatory properties of the H_3 receptors and the immunomodulatory characteristics of the H_4 receptors, these results will contribute to the future evaluation of the interaction of the histamine receptors in peripheral blood vessel homeostasis and in the vascular involvement in systemic inflammation. The final aim is the pharmacological evaluation of novel and more beneficial therapeutic interventions in systemic vascular inflammation.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abbas AB, Lichtman AH (2009) "Chapter 2 Innate Immunity". Basic Immunology. Functions and disorders of the immune system (3rd ed.)

Akdis CA, Blaser K (2003) Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* **112**:15-22.

Akdis CA, Simons FE (2006) Histamine receptors are hot in immunopharmacology. *Eur J Pharmacol* **533**:69-76.

Aksu K, Donmez A, Keser G (2012) Inflammation-induced thrombosis: mechanisms, disease associations and management. *Curr Pharm Des* **18**:1478-1493.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K**,** Walter P (2002) Molecular Biology of the Cell. Blood Vessels and Endothelial Cells, 4th edition. New York: Garland Science.

Alexander JS, Elrod JW (2002). Extracellular matrix, junctional integrity and matrix metalloproteinase interactions in endothelial permeability regulation. *J Anat* **200**:561-574.

Alguacil LF, Perez-Garcia C (2003) Histamine H_3 receptor: a potential drug target for the treatment of central nervous system disorders. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disor* **2**:303-313.

Anagnostopoulos I, Zinzaras E, Alexiou I, Papathanasiou AA, Davas E, Koutroumpas A, Barouta G, Sakkas LI (2010) The prevalence of rheumatic diseases in central Greece: a population survey. *BMC Musculoskelet Disord* **11**:98.

Arrang J, Morisset S, Gbahou F (2007) Constitutive activity of the histamine H_3 receptor. *Trends Pharmacol Sci* **28**:350-357.

Arrang JM, Garburg M, Schartz JC (1983) Auto inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H_3) of histamine receptor. *Nature* **302**:832-837.

Ash AS, Schild HO (1966) Receptors mediating some actions of histamine. *Br J Pharmacol Chemother* **27**:427-439.

Baerwald C, Kneitz C, Bach M, Licht M (2012) Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* [Epub ahead of print]

Bakker RA (2004) Histamine H_3-receptor isoforms. *Inflamm Res* **53**:509-516.

Bakker RA, Lozada AF, van Marle A, Shenton FC, Drutel G, Karlstedt K, Hoffmann M, Lintunen M, Yamamoto Y, van Rijn RM, Chazot PL, Panula P, Leurs R (2006) Discovery of naturally occurring splice variants of the rat histamine H_3 receptor that act as dominant-negative isoforms. *Mol Pharmacol* **69**:1194-1206.

Barbier AJ, C Berridge C, Dugovic C, Laposky AD, Wilson SJ, Boggs J, Aluisio L, Lord B, Mazur C, Pudiak CM, Langlois X, W Xiao W, R Apodaca R, Carruthers N, Lovenberg TW (2004) Acute wake promoting actions of JNJ5207852, a novel diamine-based H-3 Antagonist. *Br J Pharmacol* **143**:649-661.

Barreiro O, Martín P, González-Amaro R, Sánchez-Madrid F (2010) Molecular cues guiding inflammatory responses. *Cardiovasc Res* **86**:174-182.

Bartosch R, Feldberg W, Nagel E (1932) Das Freiwerden eines histaminhnlichen Stoffes bei der Anaphylaxie des Meerschweinchens. *Arch Ges Physiol* **230**:129.

Bayliss PE, Bellavance KL, Whitehead GG, Abrams JM, Aegerter S, Robbins HS, Cowan DB, Keating MT, O'Reilly T, Wood JM, Roberts TM, Chan J (2006). Chemical modulation of receptor signaling inhibits regenerative angiogenesis in adult zebrafish. *Nat Chem Biol* **2**:265-273.

Bennett GJ, Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* **50**:355-363.

Bertaccini G, Coruzzi G, Adami M, Pozzoli C, Gambarelli E (1991) Histamine H3 receptors: an overview. *Ital J Gastroenterol* **23**:378-385.

Bhatt HG, Agrawal YK, Raval HG, Manna K, Desai PR (2010) Histamine H_4 receptor: a novel therapeutic target for immune and allergic responses. *Mini Rev Med Chem* **10**:1293-1308.

Bhuiyan ME, Waki H, Gouraud SS, Takagishi M, Kohsaka A, Masanobu Maeda M (2011) Histamine receptor H_1 in the nucleus tractus solitarii regulates arterial pressure and heart rate in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**:523-529.

Black JW, Duncan WA, Durant CJ, Ganellin CR, Parsons EM (1972) Definition and antagonism of histamine H_2 receptors. *Nature* **236:**385-390.

Bohme TM, Keim C, Kreutzmann K, Linder M, Dingermann T, Dannhardt G, Mutschler E, Lambrech G (2003) Structure−Activity Relationships of Dimethindene Derivatives as New M_2-Selective Muscarinic Receptor Antagonists. *J Med Chem* **46**:856-867.

Bongers G, Bakker RA, Leurs R (2007) Molecular aspects of the histamine H_3 receptor. *Biochem pharmacol* **73:**1195-1204.

Bovet D, Staub A-M (1937) Action protectrice des éthers phénoliques an cours de l'intoxication histaminique. *C R Soc Biol (Paris*) **124**:547-549.

Busse R, Trogisch G, Bassenge E (1985) The role of endothelium in the control of vascular tone. *Basic Res Cardiol* **80**:475-490.

Butcher EC, Picker LJ (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* **272**:60-66.

Cannon KE, Chazot PL, Hann V, Shenton F, Hough LB, Rice Fl (2007) Immunohistochemical localization of histamine H_3 receptors in rodent skin, dorsal root ganglia, superior cervical ganglia and spinal cord: potential antinociceptive targets. *Pain* **129**:76-92.

Celanire S, Wijtmans M, Talaga P, Leurs R, de Esch IJ (2005) Keynote review: histamine H_3 receptor antagonists reach out for the clinic. *Drug Discov Today* **10**:1613-1627.

Chadha HS, Abraham MH, Mitchel RC (1994) Physicochemical analysis of the factors governing distribution of solutes between blood and brain. *Bioorg Med Chem Letts* **4**:2511-2516.

Chazot Pl, Wilson AJ (2008) The European Histamine Research Society (EHRS) symposium for EPHAR.2008. *Inflamm Res* **57**:S05-S06.

Cianchi F, Cortesini C, Schiavone N, Perna F, Magnelli L, Fanti E, Bani D, Messerini L, Fabbroni V, Perigli G, Capaccioli S, Masini E (2005). The role of cyclooxygenase-2 in mediating the effects of histamine on cell proliferation and vascular endothelial growth factor production in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **11**:6807-6815.

Cleaver O, Melton DA (2003). Endothelial signaling during development. *Nat Med* **9**:661-668.

Cojocaru M, Cojocaru IM, Silosi I, Vrabie CD, Tanasescu R (2010) Extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Maedica* **5**:286-291.

Cook-Mills JM, Deem TL (2005) Active participation of endothelial cells in inflammation. *J Leukoc Biol* **77**:487-495.

Coruzzi G, Pozzoli C, Adami M, Grandi D, Guido N, Smits R, de Esch I, Leurs R (2012) Strain-dependent effects of the histamine H_4 receptor antagonist JNJ7777120 in a murine model of acute skin inflammation. *Exp Dermatol* **21**:32-37.

Cotran RS, Kumar V, Collins T (1998) *Robbins Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia: W.B Saunders Company.

Dale HH, Laidlaw PP (1910) The physiological action of beta-iminazolylethylamine. *J Physiol* **41**:318-344.

Dartt DA (2002) Regulation of mucin and fluid secretion by conjunctional epithelial cells. *Progr Retin Eye Res* **21**:555-576.

Dávila-Borja VM, Belmont JA, Espinosa JJ, Moreno-Sánchez R, Albores A, Montero RD (2007) Induction of CYP1A1 and CYP2E1 in rat liver by histamine: binding and kinetic studies. *Arch Toxicol* **81**:697-709.

Davis JM 3rd, Matteson EL; American College of Rheumatology; European League Against Rheumatism (2012) My treatment approach to rheumatoid arthritis. *Mayo Clin Proc* **87**:659-673.

De Backer MD, Loonen I, Verhasselt P, Neefs JM, Luyten WH (1998) Structure of the histamine H_1 receptor gene. *Biochem J* **335**:663-670.

De Esch IJ, Thurmond RL, Jongejan A, Leurs R (2005) The histamine H_4 receptor as a new therapeutic target for inflammation. *Trends Pharmacol Sci* **26**:462-469.

Di GM, Ritter B, Vavitsas A, Fraser D, Arora A, Lisser B (2003) *Nelson Biology 12*. Toronto: Thomson Canada Ltd. p. 473.

Djuric DM, Andjelkovic IZ (1995) The evidence for histamine H_3 receptor-mediated endothelium-dependent relaxation in isolated rat aorta. *Mediators Inflamm* **4**:217-221.

Djuric DM, Nesic MT, Andjelkovic IZ (1996) Endothelium-dependent relaxation of rat aorta to a histamine H_3 agonist is reduced by inhibitors of nitric oxide synthase, guanylate cyclase and Na^+, K^+-ATPase. *Mediators Inflamm* **5**:69-74.

Drutel G, Peitsaro N, Karlstedt K, Wieland *K*, Smit MJ, Timmerman H, Panula P, Leurs R (2001) Identification of rat H-3 receptor isoforms with

different brain expression and signalling properties. *Mol Pharmacol* **59**:1-8.

Dunford PJ, Williams KN, Desai PJ, Karlsson L, McQueen D, Thurmond RL (2007) Histamine H_4 receptor antagonists are superior to traditional antihistamines in the attenuation of experimental pruritus. *J Allergy and Clin Immunol* **119**:176-183.

Dvorak AM (1997) Ultra structure of mast cells and basophils. Reinound, Basil. Switzerland.

Dvorak AM (2005) Ultrastructural localization of histamine in human basophils and mast cells; changes associated with anaphylactic degranulation and recovery demonstrated with a diamine oxidase-gold probe. *Allergy* **52**:12-22**.**

Dy M, Schneider E (2004) Histamine-cytokine connection in immunity and hematopoiesis. *Cytokine Growth Factor Rev* **15**:393-410.

Elrod D.W and Chou K.C (2002) A study on the correlation of G-protein-coupled receptor types with amino acid composition. *Protein Eng* **15**:713-715.

Elz S, Kramer K, Pertz HH, Detert H, ter Laak AM, Ku¨hne R, Schunack W (2000) Histaprodifens: synthesis, pharmacological in vitro evaluation and molecular modeling of a new class of highly active and selective histamine H_1-receptor agonists. *J Med Chem* **43:**1071-1084.

Emanuel MB (1999) Histamine and the antiallergic antihistamines: a history of their discoveries. *Clin Exp Allergy* **29**(S3):1-11.

Esbenshade TA, Browman KE, Bitner RS, Strakhova M, Cowart MD, Brioni JD (2008) The histamine H_3 receptor: an attractive target for the treatment of cognitive disorders. *Br J Pharmacol* **154**:1166-1181.

Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, Luscher TF (2002). Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. *Circulation* **105**:1756-1759.

Faghih R., Dwight W, Pan JB, Fox GB, Krueger KM, Esbenshade T, Mcvey JM, Marsh HK, Bennani YL, Hancock AA (2003) Synthesis and SAR of aminoalkoxy-biaryl-4-carboxamides: novel and selective histamine H_3 receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* **13**:1325-1328.

Falcone FH, Zillikens D, Gibbs BF (2006) The 21st century renaissance of the basophil? Current insights into its role in allergic responses and innate immunity. *Exp Dermatol* **15**:855-864.

Fang ZY, Fontaine J, Unger Ph, Berkenboom G (1991) Alterations of endothelial function of isolated aortae in rats with adjuvant arthritis. *Arch Int Pharmacodyn* **311**:122-130.

Ferrara N, Kerbel RS (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* **438**:967-974.

Fields HL, Rowbotham M, Baron R (1998) Postherpetic neuralgia: irritable nociceptors and deafferentation. *Neurobiol Dis* **5**:209-227.

Fishman AP (1982) Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. *Ann N. Y Acad Sci* **401**:1-8.

Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Rosser EM, Pin JP, Davenport AP, Spedding M, Harmar AJ (2005) International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol Rev* **57**:279-288.

Francis H, DeMorrow S, Venter J, Onori P, White M, Gaudio E, Francis T, Greene JF Jr, Tran S, Meininger CJ, Alpini G (2012) Inhibition of histidine decarboxylase ablates the autocrine tumorigenic effects of histamine in human cholangiocarcinoma. *Gut* **61**:753-764.

Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**:1256-1272.

Fung-Leung WP, Thurmond RL, Ling P, Karlsson L (2004) Histamine H_4 receptor antagonists: The new antihistamines. *Curr Opin In*V*est Drugs* **5**:1174-1183.

Gabriel SE, Michaud K (2009) Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* **11**:229.

Galley HF, Webster NR (2004) Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth* **93**:105-113.

Gantner F, Sakai K, Tusche MW, Cruikshank WW, Center DM, Bacon KB (2002) Histamine H_4 and H_2 receptors control histamine-induced

interleukin-16 release from human CD8(+) T cells. *J. Pharmacol Exp Ther* **303**:300-307.

Gantz I, Munzert G, Tashiro T, Schaffer M, Wang L, DelValle J, Yamada T (1991) Molecular cloning of the human histamine H_2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **178**:1386-1392.

Gantz I, Schäffer M, Del Valle J, Logsdon C, Campbell V, Uhler M, Yamada T (1991) Molecular cloning of a gene encoding the histamine H_2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:429-433.

Gbahou F, Rouleau A, Morisset S, Parmentier R, Crochet S, Lin JS, Ligneau X, Tardivel-Lacombe J, Stark H, Schunack W, Ganellin CR, Schwartz JC, Arrang JM (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:11086-11091.

Gbahou F, Vincent L, Humbert-Claude M, Tardivel-Lacombe J, Chabret C, Arrang JM (2006) Compared pharmacology of human histamine H3 and H_4 receptors: structure–activity relationships of histamine derivatives. *Br J Pharmacol* **147**:744-754.

Gemkow MJ, Danenport AJ, Harich A, Ellenbroek BA, Cesura A, Hallett D (2009) The histamine H3 receptor as a therapeutic drug target for CNS disordrs. *Drug Discovery Today* **14**:509-515.

Genta MS, Genta RM, Gabay C (2006) Systemic rheumatoid vasculitis: a review. *Semin Arthritis Rheum* **36**:88-98.

Ghiadoni L, Taddei S, Virdis A (2012) Hypertension and endothelial dysfunction: therapeutic approach. *Curr Vasc Pharmacol* **10**:42-60.

Ghosh AK, Hirasawa N, Ohuchi K (2001). Enhancement by histamine of vascular endothelial growth factor production in granulation tissue via H_2 receptors. *Br J Pharmacol* **134**:1419-1428.

Gibbons GH, Dzau VJ (1992) The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* **327**:669-677.

Gilman AG. (1987) G Proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Ann Rev Biochem* **56**:615-649.

Gimbrone MA Jr, García-Cardeña G (2012) Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol* [Epub ahead of print]

Goren N, Perez Leiros C, Sterin-Borda L, Borda E (1993) Expression of histamine H_1 receptors in autoimmune myocarditis mice. *Can J Physiol Pharmacol* **71**:639-644

Goren N, Perez Leiros C, Sterin-Borda L, Borda E (1994) Effect of histamine in autoimmune myocarditis mice. *Int J Immunopharmacol* **16**:737-745.

Graff L, Frungieri M, Zanner R, Pohlinger A, Prinz C, Gratzl M (2002). Expression of histidine decarboxylase and synthesis of histamine by human small cell lung carcinoma. *Am J Pathol* **160**:1561-1565.

Grzybowska-Kowalczyk A, Wojtecka-Lukasik E, Maslinska D, Gujski M, Maslinski S (2007) Distribution pattern of histamine H_4 receptor in human synovial tissue from patients with reumatoid arthritis. *Inflamm Res* **56**:59-60.

Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O (2008) Histamine in the nervous system. *Physiol Rev* **88**:1183-1241.

Haller H (1997) Endothelial function. General considerations. *Drugs* **53**:1-10.

Hancock AA (2006) The challenge of drug discovery of a GPCR target: analysis of preclinical pharmacology of histamine H_3 antagonists/inverse agonists. *Biochem Pharmacol* **71**:1103-1113.

Hancock AA, Esbenshade TA, Krueger KM., Yao BB (2003) Genetic and pharmacological aspects of histamine H_3 receptor heterogeneity. *Life Sci* **73**:3043-3072.

Harper EA, Shankley NP, Black JW (1999) Characterization of the binding of of [^{3}H]-clobenpropit to histamine H_3-receptors in guinea pig cerebral cortex membranes. *Br J Pharmacol* **128**:881-890.

Hekimian G, Cote S, Van Sande J, Boeynames JM (1992) H_2 receptor-mediated responses of aortic endothelial cells to histamine. *Am J Physiol* **262**:H220-H224.

Hill SJ *et al*. (2000) "Histamine receptors" in The IUPHAR compendium of receptor characterization and classification, 2nd edition, pp.227-232.

Hill SJ, Chazot P, Fukui H, Ganellin CR, Haas HL, Hills R, Levi R, Schunack W, Schwartz J-C, Shankley NP, Timmerman H, Young JM (2012) Histamine receptors. Last modified on 10/02/2012. Accessed on 03/11/2012. *IUPHAR database* (IUPHAR-DB), http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=33

Hill SJ, Ganelin CR, Timmerman H, Schartz JC, Shankey NP, Young J, Schunack W, Haas HL (1997) International Union of Pharmacology. XIII. Classification of Histamine receptors. *Pharmacol Rev* **49**:253-278.

Hirano S, Wakazono K, Agata N, Mase T, Yamamoto R, Matsufuji M, Sakata N, Abe C (1994) Effects of cytogenin, a novel anti-arthritic agent, on type II collagen-induced arthritis in DBA/J mice and adjuvant arthritis in Lewis rats. *Int J Tissue React* **16**:155-162.

Hofstra CL, Dessai PJ, Thurmond RL, Feung-Leung WP (2003) Histamine H_4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J Pharmacol Exp Ther* **305**:1212-1221.

Holmdahl R, Goldschmidt TJ, Kleinau S, Kvick C, Johnson R (1992) Arthritis induced in rats with adjuvant oli is a genetically restricted, alpha beta T-cell dependent auto immune disease. *Immunology* **76**:197-202.

Horton SC, Emery P (2012) Biological therapy for rheumatoid arthritis: where are we now? *Br J Hosp Med (Lond)* **73**:12-18.

Hough LB (2001) Genomics meets histamine receptors: new subtypes, new receptors. *Mol Pharmacol* **59**:415-419.

Hough LB, Rice FL (2011) H_3 Receptors and Pain Modulation: Peripheral, Spinal, and Brain Interactions. *J Pharmacol Exp Ther* **336**:30-37.

Hu Y, Cheng W, Cai W, Yue Y, Li J, Zhang P (2012) Advances in research on animal models of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* [Epub ahead of print]

Huang C, Huang CW, Cheng YE, Yu J (2008). Histamine metabolism influences blood vessel branching in zebrafish *reg6* mutants. *BMC Dev Biol* **8**:31-42.

Hüls A, Purand K, Stark H, Reidemeister S, Ligneau X, Arrang JM, Schwartz JC, Schunack W (1996) *Arch Pharm* (Weinheim) **329**:379-385.

Ichikawa A, Sugimoto Y, Tanaka S (2010) Molecular biology of histidine decarboxylase and prostaglandin receptors. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **86**:848-866.

Ikawa Y, Suzuki M, Shiono S, Ohki E, Moriya H, Negishi E, Ueno K (2005) Histamine H_4 receptor expression in human synovial cells obtained from patients suffering from rheumatoid arthritis. *Bio Pharm Bull* **28**:2016-2018.

Ikeda K, Utoguchi N, Makimoto H, Mizuguchi H, Nagagawa S and Mayumi T (1999) Different reactions of aortic venular endothelial cell monolayers to histamine on macromolecular permeability. *Inflammation* **23**:87-97.

Ingersoll MA, Platt AM, Potteaux S, Randolph GJ (2011) Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol* **32**:470-477.

Iwatani Y, Kosugi K, Isobe-Oku S (2008) Endothelium removal augments endothelium-independent vasodilatation in rat mesenteric vascular bed. *Brit J Pharmacol* **154**:32-40.

Jablonowski JA, Grice CA, Chai W, Dvorak CA, Venable JD, Kwok AK, Ly KS, Wei J, Baker SM, Desai PJ, Jiang W, Wilson SJ, Thurmond RL, Karlsson L, Edwards JP, Lovenberg TW, Carruthers NI (2003) The first potent and selective non-imidazole human histamine H_4 receptor antagonists. *J Med Chem* **46**:3957-3960.

Jansen-Olesen I, Ottosson A, Cantera L, Strunk S, Lassen LH, Olesen J, Mortensen A, Engel U, Edvinsson L (1997) Role of endothelium and nitric oxide in histamine-induced responses in human cranial arteries and detection of mRNA encoding H_1- and H_2-receptors by RTPCR. *Br J Pharmacol* **121**:41-48.

Jeannin P, Delneste Y, Gosset P, Molet S, Lassalle P, Hamid Q, Tsicopoulos A, Tonnel AB (1994) Histamine induces interleukin-8 secretion by endothelial cells. *Blood* **84**:2229-2233.

Jiang W, Lim HD, Zhang M, Lim HD, Zhang M, Desai P, Dai H, Colling PM, Leurs R, Thurmong RL (2008) Cloning and pharmacological characterization of the dog histamine H_4 receptor. *Eur J Pharmacol* **592**:26-32.

Jitsuoka M, Tsukahara D, Ito S, Tanaka T, Takenaga N, Tokita S, Sato N (2008) Synthesis and evaluation of a spiro-isobenzofuranone class of histamine H_3 receptor inverse agonists. *Bioorg Med Chem Lett* **18**:5101-5106.

Johnston B, Butcher EC (2002) Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Semin Immunol* **14**:83-92.

Kakavas S, Zampeli E, Papamichael K, Delitheow B, Tiligada E (2006) The mast cell pathway to inflammation and homeostasis: Pharmacological insights. *Anti-Inflamm. Anti-Allergy Agents Med Chem* **5**:323-334.

Katritch V, Cherezov V, Stevens RC (2012) Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures. *Trends Pharmacol Sci* **33**:17-27.

Kawano H, Tsuji H, Nishimura H, Kimura S, Yano S, Ukimura N, Kunieda Y, Yoshizumi M, Sugano T, Nakagawa K, Masuda H, Sawada S, Nakagawa M (2001). Serotonin induces the expression of tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 in cultured rat aortic endothelial cells. *Blood* **97**:1697-1702.

Kenne E, Lindbom L (2011) Imaging inflammatory plasma leakage in vivo. *Thromb Haemost* **105**:783-789.

Kessler RC, Sonnega A, Bromet E, Hughes M, Nelson CB (1995) Posttraumatic Stress Disorder in the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry* **52**:1048-1060.

Khan F, Galarraga B, Belch JJ (2010) The role of endothelial function and its assessment in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* **6**:253-261.

Kiss R, Kiss B, Könczöl A, Szalai F, Jelinek I, László V, Noszál B, Falus A, Keseru GM (2008) Discovery of novel human histamine H_4 receptor ligands by large-scale structure-based virtual screening. *J Med Chem* **51**: 3145-3153.

Kleinau S, Klareskog L (1993) Oil-induced arthritis in DA rats. Passive transfer by T cells but not with serum. *J Immunity* **6**:449-458.

Kobayashi K, Matsumoto S, Morishima T, Kawabe T, Okamoto T(2000). Cimetidine inhibits cancer cell adhesion to endothelial cells and prevents metastasis by blocking E-selectin expression. *Cancer Res* **60**:3978-3984.

Kobilka B. K (2007) G protein coupled receptor structure and activation. *Bioch Biophys Acta* **1768**:794-807.

Kroeze WK, Sheffler DJ, Roth BL (2003) G-protein-coupled receptors at a glance. *J Cell Sci* **116**:4867-4869.

Kuryliszyn-Moskal A, Klimiuk PA, Sierakowski S, Ciolkiewicz M (2006) A study on vascular endothelial growth factor and endothelin-1 in patients with extra-articular involvement of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* **25**:314-319.

Landete JM, De las Rivas B, Marcobal A, Muñoz R (2008) Updated molecular knowledge about histamine biosynthesis by bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr* **48**:697-714.

Landré-Beauvais AJ (1800) *La goutte asthénique primitive (doctoral thesis*) Paris (reproduced in Landré-Beauvais AJ, March 2001)

Leschke C, Elz S, Garbarg M, Schunack W (1995) Synthesis and histamine H1 receptor agonist activity of a series of 2-phenylhistamines, 2-heteroarylhistamines and analogues. *J Med Chem* **38**:1287-1294.

Lethbridge NL, Chazot PL (2010) Immunological identification of the mouse H_4 histamine receptor on spinal cord motor neurons using a novel anti-mouse H_4R antibody. *Inflamm Res* **59**(S2):S197-198.

Leurs R, Bakker R, Timmerman H, De Esch JJP (2005) The histamine H_3 receptor: from gene cloning to H_3 receptor drugs. *Nat Rev Drug Discov* **4**:107-120.

Leurs R, Chazot PL, Shenton FC, Lim HD, De Esch JJP (2009) Molecular and biochemical pharmacology of the histamine H_4 receptor. *Br J Pharmacol* **157**:14-23.

Leurs R, Smit MJ, Timmerman H (1995) Molecular Pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmacol Ther* **66**:413-463.

Leurs, R. Hoffmann M, Wieland K, Timmerman H (2000) H_3 receptor gene is cloned at last. *Trends Pharmacol Sci* **21**:11-12.

Libby P (2007) Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev* **65**:S140-146.

Ligneau X, Garbarg M, Vizuete ML, Diaz J, Purand K, Stark H, Schunack W, Schwartz JC (1994) 125I-Iodoproxyfan, a new antagonist to label and visualize cerebal histamine H3-receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **271**:452-459.

Ligneau X, Perrin D, Landais L, Camelin JC, Calmels TP, Berrebi-Bertrand I, Lecomte JM, Parmentier R, Anaclet C, Lin JS, Bertaina-Anglade V, la Rochelle CD, d'Aniello F, Rouleau A, Gbahou F, Arrang J. M, Ganellin CR, Stark H, Schunack W, Schwartz JC (2007) BF2.649 [1-{3-[3-(4-Chlorophenyl) propoxy]propyl}piperidine, hydrochloride], a nonimidazole inverse agonist/antagonist at the human histamine H_3 receptor: Preclinical pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* **320**:365-375.

Lim HD, Adami M, Guaita E, Werfel T, Smits RA, De Esch IJ, Bakker RA, Gutzmer R, Coruzzi G, Leurs R (2009) Pharmacological characterization

of the new histamine H4 receptor agonist VUF 8430. *Br J Pharmacol* **1**:34-43.

Lim HD, Istyastono EP, van de Stolpe A, Romeo G, Gobbi S, Schepers M, Lahaye R, Menge WM, Zuiderveld OP, Jongejan A, Smits RA, Bakker RA, Haaksma EE, Leurs R, de Esch IJ (2009) Clobenpropit analogs as dual activity ligands for the histamine H_3 and H_4 receptors: synthesis, pharmacological evaluation, and cross-target QSAR studies. *Bioorg Med Chem* **17**:3987-3994.

Lim HD, van Rijn RM, Ling P, Bakker RA, Thurmond RL, Leurs R (2005) Evaluation of histamine H_1-, H_2-, and H_3-receptor ligands at the human histamine H_4 receptor: identification of 4-methylhistamine as the first potent and selective H_4 receptor agonist. *J Pharmacol Exp Ther* **314**:1310-1321.

Lippert U, Artuc M, ,Grützkau A, Babina M, Guh S, Haase I, Blaschke V, Zachmann K,Knosalla M, Middel P, Krüger-Krasagakis S, Henz B (2004) Human skin mast cells express H_2 and H_4, but not H_3 receptors. *J Invest Dermat* **123**:116-123.

Liu C, Ma X, Jiang X, Wilson SJ, Hofstra CL, Blevitt J, Pyati J, Li X, Chai X, Carruthers N, Lovenberg TW (2001) Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H_4) expressed in bone marrow. *Mol Pharmacol* **59**:420-426.

Lovenberg TW, Pyati J, Chang H, Wilson S J, Erlander MG (2000) Cloning of rat histamine H_3 receptor reveals distinct species pharmacological profiles. *J Pharmacol Exp Ther* **293**:771-778.

Lovenberg TW, Roland BL, Wilson SJ, Jiang X, Pyati J, Huvar A, Jackson MR, Erlander MG (1999) Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor. *Mol Pharmacol* **55**:1101-1107.

Luscher TF, Barton M (1997) Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* **20**:II-3–II-10.

Lynch T, Price A (2007) The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Physician* **76**:391-396.

Maintz L, Novak N (2007) Histamine and histamine intolerance. *Am J Clin Nutr* **85**:1185-1196.

Majithia V, Geraci SA (2007) Rheumatoid arthritis: diagnosis and management. *Am J Med* **120**:936-939.

Malinowska B, Godlewski G, Schlicker E (1998) Histamine H_3 receptors – general characterization and their function in the cardiovascular system. J *Physiol Pharmacol* **49**:191-211.

Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L (2003) Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev* **83**:183-252.

Marone G (1997) Milestones in the biology and pharmacology of histamine H_1-receptor antagonists. *Allergy* **52**:7-13.

Marshall I (1984) Characterization and distribution of histamine H_1- and H_2-receptors in precapillary vessels. *J Cardiovasc Pharmacol* **6**:S587-597.

Matsumoto S, Imaeda Y, Umemoto S, Kobayashi K, Suzuki H, Okamoto T (2002). Cimetidine increases survival of colorectal cancer patients with high levels of sialyl Lewis-X and sialyl Lewis-A epitope expression on tumour cells. *Br J Cancer* **86**:161-167.

Maurer I, Volz HP (2001) Cell-mediated side effects of psychopharmacological treatment. *Arzneimittelforschung* **51**:785-792.

Medhurst A, Atkins A, Beresford I, Brackenborough K, Briggs M, Calver A, Cilia J, Cluderay J, Crook B, Davis J, Davis R, Davis R, Dawson L, Foley A, Gartlon J, Gonzalez M, Heslop T, Hirst W, Jennings C, Jones D, Lacroix L, Martyn A, Ociepka S, Ray A, Regan C, Roberts J, Schogger J, Southam E, Stean T, Trail B, Upton N, Wadsworth G, Wald J, White T, Witherington J, Woolley M, Worby A, Wilson D (2007) GSK189254, a novel H_3 receptor antagonist that binds to histamine H_3 receptors in Alzheimer's disease brain and improves cognitive performance in preclinical models. *J Pharmacol Exp Ther* **321**:1032-1045.

Medhurst A, Briggs M, Bruton G, Calver A, Chessell I, Crook B, Davis J, Davis R, Foley A, Heslop T, Hirst W, Medhurst S, Ociepka S, Ray A, Regan C, Sargent B, Schogger J, Stean T, Trail B, Upton N, White T, Orlek B, Wilson D (2007) Structurally novel histamine H_3 receptor antagonists GSK207040 and GSK334429 improve scopolamine-induced

memory impairment and capsaicin induced secondary allodynia in rats. *Biochem Pharmacol* **73**:1182-1194.

Medhurst A, Collins SD., Billinton A, Bingham S, Dalziel RG, Brass A, Roberts JC, Medhurst AD, Chessell IP (2008) Novel histamine H_3 receptor antagonists GSK189254 and GSK334429 are efficacious in surgically-induced and virally-induced rat models of neuropathic pain. *Pain* **138**:61-69**.**

Medzhitov R (2010) Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* **140**:771-776.

Millar RP, Newton CL (2010) The year in G protein-coupled receptor research. *Mol Endocrinol* **24**:261-174.

Morini G, Comini M, Rivara M, Rivara S, Lorenzi S, Bordi F, Mor M, Flammini L, Bertoni S, Ballabeni V, Barocelli E, Plazzi PV (2006) Dibasic non-imidazole histamine H_3 receptor antagonists with a rigid biphenyl scaffold. *Bioorg Med Chem Lett* **16**:4063-4067.

Morse KL, Behan J, Laz TM, West RE, Jr, Greenfeder SA, Anthes JC, Umland S, Wan Y, Hipkin RW, Gonsiorek W, Shin N, Gustafson EL, Qiao X, Wang S, Hedrick JA, Greene J, Bayne M and Monsma FJ, Jr. (2001) Cloning and characterization of a novel human histamine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **296**:1058-1066.

Moya-Garcia AA, Medina MA, Sanchez-Jimenez F (2005) Mammalian histidine decarboxylase: From structure to function. *Bioessays* **27**:57-63.

Murata Y, Tanimoto A, Wang KY, Tsutsui M, Sasaguri Y, De Corte F, Matsushita H (2005) Granulocyte macrophage-colony stimulating factor increases the expression of histamine and histamine receptors in monocytes/macrophages in relation to arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**:430-435.

Nakamura T, Itadani H, Hidaka Y, Ohita M, Tanaka K (2000) Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R. *Biochem Biophys Res Commun* **279**:615-620.

Napoleone E, Di Santo A, Lorenzet R (1997). Monocytes upregulate endothelial cell expression of tissue factor: a role for cell-cell contact and cross-talk. *Blood* **89**:541-549.

Nguyen T, Shapiro DA, George SR, Setola V, Lee DK, Cheng R, Rauser L, Lee SP, Lynch KR, Roth BL, O'Dowd BF (2001) Discovery of a novel member of the histamine receptor family. *Mol Pharmacol* **59**:427-433.

Nickel T, Bauer U, Schlicker E, Kathmann M, Gothert M, Sasse A, Stark H, Schunack W (2001) Novel histamine H_3-receptor antagonists and partial agonists with a nonaminergic structure. *Br J Pharmacol* **132**:1665-1672.

Nigrovic PA, Lee DM (2005) Mast cells in inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther* **1**:1-11.

Nijmeijer S, de Graaf C, Leurs R, Vischer HF (2012a) Molecular pharmacology of histamine H_4 receptors. *Front Biosci* **17**:2089-2106.

Nijmeijer S, Vischer HF, Rosethorne EM, Charlton SJ, Leurs R (2012b) Analysis of multiple histamine H_4 receptor compound classes uncovers gαi and β-arrestin2 biased ligands. *Mol Pharmacol* [Epub ahead of print].

Norrby K (1995). Evidence of a dual role of endogenous histamine in angiogenesis. *Int J Exp Pathol* **76**:87-92.

Oda T, Matsumoto S, Masuho Y, Takasaki J, Matsumoto M, Kamohara M, Saito T., Ohishi T., Soga T., Hiyama H., Matsushime H., Furuichi K (2002) cDNA cloning and characterization of porcine histamine H_4 receptor. *Biochim Biophys Acta* **1575**:135-138.

Oda T, Matsumoto S, Matsumoto M, Takasaki J, Kamohara M, Soga T, Hiyama H, Kobori M, Katoh M (2005) Molecular cloning of monkey histamine H_4 receptor. *J Pharmacol Sci* **98**:319-322.

Oda T, Morikawa N, Saito Y, Masuho Y, Matsumoto S (2000) Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem* **275**:36781-36786.

Ohki E, Suzuki M, Aoe T, Ikawa Y, Negishi E, Ueno K (2007). Expression of histamine H_4 receptor in synovial cells from rheumatoid arthritic patients. *Biol Pharm Bull* **30:** 2217-2220.

Ohtsu H (2010) Histamine synthesis and lessons learned from histidine decarboxylase deficient mice. *Adv Exp Med Biol* **709**:21-31.

O'Mahony L, Akdis M, Akdis CA (2011) Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. *J Allergy Clin Immunol* **128**:1153-1162.

Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**:739-745.

Panula P, Yang HY, Costa E (1983) Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**:2572-2576.

Papp-Jambor C, Jaschinski U, Forst H (2002) Cytochrome P450 enzymes and their role in drug interactions]. *Anaesthesist* **51**:2-15.

Parsons ME, Ganellin CR (2006) Histamine and its receptors. *Br J Pharmacol* **147**(S1):S127-135.

Pope RM (2002) Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* **2**:527-535.

Porth C (2007) *Essentials of pahtophysiology: concepts of altered health states*. Hagerstown, MD: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 270.

Prinz C, Zanner R, Gratzl M (2003) Physiology of gastric enterochromaffin-like cells. *Annu Rev Physiol* **65**:371-382.

Rafii S, Lyden D (2003). Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration**.** *Nat Med* **9:**702-712.

Raga MM, Sallares J, Guerrero M, Guglietta A, Arrang, JM, Schwartz JC, Lecomte JM, Ligneau X, Schunack W, Ganellin, CR, Stark H (2006) Ferrer International, WO 2006/084833.

Red-Horse K, Crawford Y, Shojaei F, Ferrara N (2007). Endothelium microenvironment interactions in the developing embryo and in the adult. *Dev Cell* **12**:181-194.

Ribatti D, Vacca A, Nico B, Crivellato E, Roncali L, Dammacco F (2001). The role of mast cells in tumour angiogenesis. *Br J Haematol* **115:**514-521

Riley JF, West GB (1955) Tissue mast cells: studies with a histamine-liberator of low toxicity (compound 48/80). *J Pathol Bacteriol* **69**:269-282.

Risau W (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**:671-674.

Rose NR (2002) Mechanisms of autoimmunity. *Semin Liver Dis* **22**:387-394.

Rosethorne EM, Charlton SJ (2011) Agonist-biased signaling at the histamine H_4 receptor: JNJ7777120 recruits β-arrestin without activating G proteins. *Mol Pharmacol* **79**:749-757.

Rowbotham MC, Yosipovitch G, Connolly MK, Finlay D, Forde G, Fields HL (1996) Cutaneous innervation density in the allodynia form of postherpetic neuralgia. *Neurobiol Dis* **3**:205-214.

Saito H, Shimizu H, Mita H, Maeda Y, Akiyama K (1996). Histamine augments VCAM-1 expression on IL-4- and TNF-alpha-stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* **111**:126-132.

Sander K, Kottke T, Stark H (2008) Histamine H_3 receptor antagonists go to clinics. *Biol. Pharm. Bull*. **12**:2163-2181.

Sasho S, Seishi T, Kawamura M, Hirose R, Toki S, Shimada JI (2008) Diamine derivatives containing imidazolidinylidene propanedinitrile as a new class of histamine H_3 receptor antagonists. Part I. *Bioorg Med Chem Lett* **18**:2288-2291.

Sasse A, Stark H, Reidemeister S, Hüls A, Elz S, Ligneau X, Ganellin CR, Schwartz JC, Schunack W (1999) Novel partial agonists for the histamine H_3 receptor with high *in vitro* and *in vivo* activity. *J Med Chem* **42**:4269-4274.

Schirmer M, Duftner C, Schmidt WA, Dejaco C (2011) Ultrasonography in inflammatory rheumatic disease: an overview. *Nat Rev Rheumatol* **7**:479-488.

Schwartz JC (2001) The histamine H_3 receptor: from discovery to clinical trials with pitolisant. *Brit J Pharm* **163**:675-886.

Scott A, Khan KM, Cook JL, Duronio V (2004) What is "inflammation"? Are we ready to move beyond Celsus? *Br J Sports Med* **38**:248-249.

Seifert R, Schneider EH, Dove S, Brunskole I, Neumann D, Strasser A, Buschauer A (2011) Paradoxical stimulatory effects of the "standard" histamine H_4-receptor antagonist JNJ7777120: the H_4 receptor joins the club of 7 transmembrane domain receptors exhibiting functional selectivity. *Mol Pharmacol* **79**:631-638.

Shahid M, Tripathi T, Sobia F, Moin S, Siddiqui M, Ali Khan R (2009) Histamine, histamine receptors, and their role in immunomodulation: An updated systematic review. *The Open Immunol J* **2**:9-41.

Sharma A, Hamelin BA (2003) Classic histamine receptor antagonists: a critical review of their metabolicand pharmacokinetic fate from a bird's eye view. *Curr Drug Metab* **4**:105-129.

Sharman JL, Mpamhanga CP, Spedding M, Germain P, Staels B, Dacquet C, Laudet V, Harmar AJ, and NC-IUPHAR (2011) IUPHAR-DB: new receptors and tools for easy searching and visualization of pharmacological data. *Nucl Acids Res* **39** (Database Issue): D534-D538.

Shepro D and Dunham B (1986) Endothelial cell metabolism of biogenic amines. *Ann Rev Physiol* **48**:335-345.

Shimamura T, Shiroishi M, Weyand S, Tsujimoto H, Winter G, Katritch V, Abagyan R, Cherezov V, Liu W, Han GW, Kobayashi T, Stevens RC, Iwata S (2011) Structure of the human histamine H_1 receptor complex with doxepin. *Nature* **475**:7354.

Shin N, Coates E, Murgolo NJ, Morse KL, Bayne M, Strader CD, Monsma FJ (2002) Molecular modeling and site-specific mutagenesis of the histamine-binding site of the histamine H_4 receptor. *Mol Pharmacol* **62**:38-47.

Shore PA, Burkhalter A, Cohn VH (1959) A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J Pharmacol Exp Ther* **127**:182-186.

Simons FE, Simons KJ (1994) The pharmacology and use of H-receptor-antagonist drugs. *N Eng J Med* **330**:1663-1670.

Simons FE, Simons KJ (2011) Histamine and H_1-antihistamines: celebrating a century of progress. *J Allergy Clin Immunol* **128**:1139-1150.e4.

Smits MJ, Leurs R, Alevijnse AE, *et al* (1996) Inverse agonism of histamine H_2-antagonists accounts for up-regulation of spontaneously active histamine receptors. *Proc Natl Acad Sci* USA **93**:6802-6807.

Smits RA, Leurs R, de Esch IJ (2009) Major advances in the development of histamine H_4 receptor ligands. *Drug Discov Today* **15-16**:745-753.

Stark H (2007) Histamine receptors. *Biotrends Rev* **1**:2-9.

Steffel J, Akhmedov A, Greutert H, Luscher TF, Tanner FC (2005) Histamine induces tissue factor expression: implications for acute coronary syndromes. *Circulation* **112**:341-349.

Steffel J, Hermann M, Greutert H, Gay S, Luscher TF, Ruschitzka F, Tanner FC (2005) Celecoxib decreases endothelial tissue factor expression

through inhibition of c-Jun terminal NH2 kinase phosphorylation. *Circulation* **111**:1685-1689.

Stegaev V, Sillat T, Porola P, Hänninen A, Falus A, Mieliauskaite D, Buzás E, Rotar Z, Mackiewicz Z, Stark H, Chazot PL, Konttinen YT (2012) Brief report: first identification of H_4 histamine receptor in healthy salivary glands and in focal sialadenitis in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* **64**:2663-2668.

Stephanos JJ (1996) Drug protein intervention. Two site binding of heterocyclic ligands to a monomeric hemoglobin. *J Inorg Biochem* **62**:155-169.

Su E, Yu D, Cringle S (2005) Histamine induces opposing vasoactive effects at different levels of the ocular vasculature. *Curr Eye Res* **30**:205-212.

Sun P, Jin X, Koyama T, Li S, Kitamura Y, Kawasaki H (2010) R-(-)-alpha-methylhistamine, a histamine H_3 receptor agonist, induces endothelium-dependent vasodilation in rat mesenteric resistance arteries. *Biol Pharm Bull* **33**:58-63.

Szekanecz Z, Koch AE (2004) Vascular endothelium and immune responses: implications for inflammation and angiogenesis. *Rheum Dis Clin N Am* **30**:97-114.

Szekanecz Z, Koch AE (2008) Vascular involvement in rheumatic diseases: 'vascular rheumatology'. *Arthritis Res Ther* **10**:224.

Takenaga M, Kawasaki H, Wada A, Eto T (1995) Calcitonin gene-related peptide mediates acetylcholine-induced endothelium-independent vasodilation in mesenteric resistance blood vessels of the rat. *Circ Res* **76**:935-941.

Takeshita K, Bacon KB, Gantner F (2004) Critical role of L-selectin and histamine H4 receptor in zymosan-induced neutrophil recruitment from the bone marrow: comparison with carrageenan. *J Pharmacol Exp Ther* **310**:272-280.

Takeshita K, Sakai K, Bacon KB, Gantner F (2003) Critical role of histamine H4 receptor in leukotriene B4 production and mast cell dependent neutrophil recruitment induced by zymosan in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **307**:1072-1078.

Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**:805-820.

Tanaka KA, Key NS, Levy JH (2009) Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. *Anesth Analg* **108**:1433-1446.

Tanasescu C, Jurcut C, Jurcut R, Ginghina C (2009) Vascular disease in rheumatoid arthritis: from subclinical lesions to cardiovascular risk. *Eur J Intern Med* **20**:348-354.

Tanimoto A, Wang KY, Murata Y, Kimura S, Nomaguchi M, Nakata S, Tsutsui M, Sasaguri Y (2007) Histamine upregulates the expression of inducible nitric oxide synthase in human intimal smooth muscle cells via histamine H_1 receptor and NF-kappaB signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**:1556-1561.

Tepetes K, Asprodini EK, Christodoulidis G, Spyridakis M, Kouvaras E, Hatzitheofilou K (2009) Prevention of postoperative adhesion formation by individual and combined administration of 4 per cent icodextrin and dimetindene maleate. *Brit J Surg* **96**:1476-1483.

Tetlow LC, Woolley DE (2005) Histamine, histamine receptors (H_1 and H_2), and histidine decarboxylase expression by chondrocytes of osteoarthritic cartilage: an immunohistochemical study. *Rheumatol Int* **26**:173-178.

Thompson WD, Brown FI (1987). Quantitation of histamine-induced angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane: mode of action of histamine is indirect. *Int J Microcirc Clin Exp* **6**:343-357.

Thurmond RL, Desai PJ, Dunford PJ, Fung-Leung WP, Hofstra CL, Jiang W, Nguyen S, Riley JP, Sun S, Williams KN, Edwardss JP, Karlson L (2004) A potent and selective Histamine H_4 receptor antagonist with anti-inflammmatory properties. *J Pharmacol Exp Ther* **309**:404-413.

Thurmond RL, Gelfand EW, Dunford PJ (2008) The role of the histamine H_1 and H4 receptors in allergic inflammation: The search for new antihistamines. *Nat Rev Drug Discov* **1**:41-53.

Tiligada E (2012) Editorial: is histamine the missing link in chronic inflammation? *J Leukoc Biol* **92**:4-6.

Tiligada E, Aslanis D, Delitheos A, Varonos D (2000) Changes in histamine content following pharmacologically-induced mast cell degranulation in the rat conjunctiva. *Pharmacol Res* **41**:667-670.

Tiligada E, Zampeli E, Sander K, Stark H (2009) Histamine H_3 and H_4 receptors as novel drug targets. *Expert Opin Investig Drugs* **18**:1519-1531

Tippens AS, Gruetter CA (2004) Detection of histidine decarboxylase mRNA in human vascular smooth muscle and endothelial cells. *Inflamm Res* **53**:215-216.

Togias A (2003) H1 receptors: localization and role in airway physiology and in immune functions. *J Allergy Clin Immunol* **112**:S60-S68.

Tønnesen H, Knigge U, Bülow S, Damm P, Fischerman K, Hesselfeldt P, Hjortrup A, Pedersen IK, Pedersen VM, Siemssen OJ (1988). Effect of cimetidine on survival after gastric cancer. *Lancet* **2**:990-992.

Tse D, Stan RV (2010) Morphological heterogeneity of endothelium. *Semin Thromb Hemost* **36**:236-245.

Ucuzian AA, Gassman AA, East AT, Greisler HP (2010) Molecular mediators of angiogenesis. *J Burn Care Res* **31**:158-175.

Wang CI, Lewis RJ (2012) Emerging opportunities for allosteric modulation of G-protein coupled receptors. *Biochem Pharmacol* [Epub ahead of print]

Watanabe T, Taguchi Y, Shiosaka S, Tanaka J, Kubota H, Terano Y, Tohyama M, Wada H (1984) Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats: a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain Res* **295**:13-25.

Werner T, Sander K, Tanrikulu Y, Kottke T, Proschak E, Stark H, Schneider G (2010) In silico characterization of ligand binding modes in the human histamine H_4 receptor and their impact on receptor activation. *ChemBioChem* **11**:1850-1855.

Wettschureck N, Offermanns S (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* **85**:1159-1204.

Wijtmans M, Leurs R, De Esch I (2007) Histamine H_3 receptor ligands break ground in a remarkable plethora of therapeutic areas. *Expert Opin Investig Drugs* **16**:967-985.

Windaus A, Vogt W (1907) Synthese des imidazolyl-äthylamins. *Ber Dtsch Chem Ges* **40:** 3691-3695.

Wong CH, Heit B, Kubes P (2010) Molecular regulators of leucocyte chemotaxis during inflammation. *Cardiovasc Res* **86**:183-191.

Xynas R, Capon RJ (1989) Two New Bromotyrosine-Derived Metabolites From an Australian Marine Sponge, *Aplysina* sp. *Aust J Chem* **42**:1427-1433.

Yamashita M, Fukui H, Sugama K, Horio Y, Ito S, Mizuguchi H, Wada H (1991) Expression cloning of a cDNA encoding the bovine histamine H_1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:11515-11519.

Ζαμπέλη Ε (2009) Ανοσοφαρμακολογική διερεύνηση της αλληλεπίδρασης ισταμίνης και κυτοκινών σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Διδακτορική διατριβή, Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Zampeli E, Thurmond RI, Tiligada E (2009) The histamine H_4 receptor antagonist JNJ7777120 induces increases in the histamine content of the rat conjunctiva. *Inflamm Res* **58**:1-9.

Zampeli E, Thurmond RL, Tiligada E (2008) Effect of the H_4R antagonist JNJ7777120 on the cartilage histamine content in rats with adjuvant arthritis. *Fund Clin Pharmacol* **22**:S10.

Zampeli E, Tiligada E (2009) The role of histamine H_4 receptor in immune and inflammatory disorders. *Br J Pharmacol* 157:24-33.

Zhang M, Venable JD, Thurmond RL (2006) The histamine H_4 receptor in autoimmune disease. *Expert Opin Investig Drugs* **15**:1443-1452.

Zhao CM, Chen D, Yamada H, Dornonville de la Cour C, Lindström E, Persson L, Håkanson *R* (2003) Rat stomach ECL cells: mode of activation of histidine decarboxylase. *Regul Pept* **114**:21-27.

Zhu Y, Michalovich D, Wu H, Tan KB, Dytko GM, Mannan IJ, Boyce R, Alston J, Tierney LA, Li X, Herrity NC, Vawter L, Sarau HM, Ames RS, Davenport CM, Hieble JP, Wilson S, Bergsma DJ, Fitzgerald LR (2001) Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor *Mol Pharmacol* **59**:434-441.

Zingel V, Leschke C, Schunack W (1995) Developments in histamine H_1-receptor agonists. *Prog Drug Res* **44**:49-85.

Zipfel PF, Skerka C (2009) Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* **9**:729-740.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι: Στατιστική Επεξεργασία των Αποτελεσμάτων

* P < 0.05, ** P < 0.01, AA: κοιλιακή αορτή (abdominal aorta), DF: βαθμοί ελευθερίας (degrees of freedom), MD: μέση διαφορά (mean difference), MO: μέσος όρος (mean), N: αριθμός ανεξάρτητων παρατηρήσεων, CFA: πειραματική αρθρίτιδα, CTR: φυσιολογικοί επίμυες, IVC: κάτω κοίλη φλέβα (inferior vena cava), *r*: συντελεστής συσχέτισης, SEM: σταθερό μέσο σφάλμα (standard error of the mean), SD: σταθερή απόκκλιση (standard deviation)

Π.Ι.1. *Σύγκριση επιπέδων ισταμίνης μεταξύ κοιλιακής αορτής και κάτω κοίλης φλέβας σε φυσιολογικούς επίμυες (CTR) και σε πειραματοζώα με πειραματική αρθρίτιδα (CFA)*

Paired Samples Test	MO	SD	SEM	t	DF	P (2-tailed)
CTR	-,17462	,31582	,08759	-1,993	12	,069
CFA	-,25810	1,26525	,27610	-,935	20	,361

Π.Ι.2. *Σύγκριση των επιπέδων ισταμίνης στην κοιλιακή αορτή (AA) και την κάτω κοίλη φλέβα (IVC) μεταξύ φυσιολογικών επίμυων (CTR) και πειραματοζώων με πειραματική αρθρίτιδα (CFA)*

ANOVA	Άθροισμα τετραγώνων	DF	Τετράγωνο του MO	F	*P*
Μεταξύ των ομάδων	1,481	3	,494	6,499	**,001**
Εντός των ομάδων	3,114	41	,076		
Σύνολο	4,595	44			

Dunnett T3		MD	SEM	*P*	95% διάστημα εμπιστοσύνης	
vs					Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο
CTR AA	CFA AA	-0.432**	0.109	**0.005**	-0.750	-0.115
CTR IVC	CFA IVC	-0.369*	0.113	**0.022**	-0.697	-0.041
CTR AA	CTR IVC	-0.633	0.111	0.992	-0.394	0.268
CFA AA	CFA IVC	-0.893	0.114	0.964	-0.236	0.415

Π.Ι.3. *Συσχέτιση δόσης διμεθινδένης-επιπέδων ισταμίνης στα αγγεία φυσιολογικών επίμυων (CTR) και πειραματοζώων με πειραματική αρθρίτιδα (CFA)*

Δόση διμεθινδένης vs επίπεδα ισταμίνης	AA		IVC	
	CTR	CFA	CTR	CFA
Spearman's r	0,316	-0,571**	0,170	-0,619**
P (2-tailed)	0,217	**0,006**	0,579	**0,008**
N	17	22	13	17

Π.Ι.4. *Επίδραση της διμεθινδένης (DIM) στα επιπέδα ισταμίνης της κοιλιακής αορτής (AA) και της κάτω κοίλης φλέβας (IVC) σε φυσιολογικούς επίμυες (CTR) και σε πειραματοζώα με πειραματική αρθρίτιδα (CFA)*

ANOVA

CTR AA	Άθροισμα τετραγώνων	DF	Τετράγωνο του ΜΟ	F	*P*
Μεταξύ των ομάδων	,239	2	,119	1,440	,270
Εντός των ομάδων	1,160	14	,083		
Σύνολο	1,398	16			
CTR IVC					
Μεταξύ των ομάδων	,180	2	,090	1,594	,229
Εντός των ομάδων	1,073	19	,056		
Σύνολο	1,253	21			
CFA AA					
Μεταξύ των ομάδων	,026	2	,013	,094	,911
Εντός των ομάδων	1,370	10	,137		
Σύνολο	1,395	12			
CFA IVC					
Μεταξύ των ομάδων	,351	2	,175	2,913	**,050**
Εντός των ομάδων	,843	14	,060		
Σύνολο	1,194	16			

vs		MD	SEM	*P*	95% διάστημα εμπιστοσύνης	
					Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο
CTR AA (Scheffe)						
DIM 0	DIM 50mg/kg	-,164	,148	,559	-,571	,243
	DIM 100mg/kg	-,356	,227	,323	-,978	,266
DIM 50mg/kg	DIM 100mg/kg	-,192	,230	,713	-,823	,438
CTR IVC	**(Scheffe)**					
DIM 0	DIM 50mg/kg	-,033	,231	,989	-,698	,630
	DIM 100mg/kg	-,033	,320	,913	-1,05	,780
DIM 50mg/kg	DIM 100mg/kg	-,103	,296	,941	-,953	,745
CFA AA (Scheffe)						
DIM 0	DIM 50mg/kg	-,192	,125	,327	-,139	,524
	DIM 100mg/kg	-,172	,135	,463	-,188	,532
DIM 50mg/kg	DIM 100mg/kg	-,020	,159	,992	-,443	,402
CFA IVC	**(Dunnett T3)**					
DIM 0	DIM 50mg/kg	-,053	,186	,987	-,682	,574
	DIM 100mg/kg	-,313*	,065	**,005**	,117	,509
DIM 50mg/kg	DIM 100mg/kg	-,367	,175	,240	-,285	1,02

Π.Ι.5. *Συσχέτιση δόσης GSK334429-επιπέδων ισταμίνης στα αγγεία φυσιολογικών επίμυων (CTR) & πειραματοζώων με πειραματική αρθρίτιδα (CFA)*

Δόση διμεθινδένης vs επίπεδα ισταμίνης	AA		IVC	
	CTR	CFA	CTR	CFA
Spearman's r	,953**	-,953**	,850*	-,371
P (2-tailed)	**,001**	**,009**	**,015**	,062
N	7	27	7	26

Π.Ι.6. *Επίδραση του GSK334429 (GSK) στα επιπέδα ισταμίνης της κοιλιακής αορτής (AA) και της κάτω κοίλης φλέβας (IVC) σε φυσιολογικούς επίμυες (CTR) και σε πειραματοζώα με πειραματική αρθρίτιδα (CFA)*

ANOVA

CTR AA	Άθροισμα τετραγώνων	DF	Τετράγωνο του ΜΟ	F	*P*
Μεταξύ των ομάδων	,938	2	,469	20,162	**,008**
Εντός των ομάδων	,093	4	,023		
Σύνολο	1,031	6			
CTR IVC					
Μεταξύ των ομάδων	1,792	2	2,680	84,086	**,001**
Εντός των ομάδων	,127	4	,032		
Σύνολο	5,487	6			
CFA AA					
Μεταξύ των ομάδων	1,792	2	,896	4,366	**,024**
Εντός των ομάδων	4,926	24	,205		
Σύνολο	6,718	26			
CFA IVC					
Μεταξύ των ομάδων	,135	2	,068	,423	,660
Εντός των ομάδων	3,673	23	,160		
Σύνολο	3,808	25			

vs		MD	SEM	*P*	95% διάστημα εμπιστοσύνης	
					Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο
CTR AA (Dunnett T3)						
GSK 0	GSK 1mg/kg	-,403	,139	,104	-,922	,115
	GSK 3mg/kg	-,882*	,139	**,008**	-1,40	-,363
GSK 1mg/kg	GSK 3mg/kg	-,478	,152	,083	-1,04	,089
CTR IVC	**(Dunnett T3)**					
GSK 0	GSK 1mg/kg	-,363	,198	,422	-1,85	1,12
	GSK 3mg/kg	-2,05*	,118	**,001**	-2,58	-1,51
GSK 1mg/kg	GSK 3mg/kg	-1,69	,180	,074	-4,01	,639
CFA AA (Dunnett T3)						
GSK 0	GSK 1mg/kg	,015	,267	1,000	-1,31	1,34
	GSK 3mg/kg	,530	,297	,339	-,604	1,66
GSK 1mg/kg	GSK 3mg/kg	,515*	,185	**,037**	,028	1,00
CFA IVC	**(Scheffe)**					
GSK 0	GSK 1mg/kg	-,185	,305	,832	-,970	,244
	GSK 3mg/kg	-,050	,305	,986	-1,66	-,446
GSK 1mg/kg	GSK 3mg/kg	-,135	,163	,714	-,024	1,35

***Π.Ι.7**. Συσχέτιση δόσης JNJ7777120-επιπέδων ισταμίνης στα αγγεία φυσιολογικών επίμυων (CTR) & επίμυων με πειραματική αρθρίτιδα (CFA)*

Δόση διμεθινδένης vs επίπεδα ισταμίνης	AA		IVC	
	CTR	CFA	CTR	CFA
Spearman's r	,857**	-,155	,795**	-,080
P (2-tailed)	**,000**	,597	**,003**	,795
N	12	14	11	13

***Π.Ι.8**. Επίδραση του JNJ7777120 (JNJ) στα επιπέδα ισταμίνης της κοιλιακής αορτής (AA) και της κάτω κοίλης φλέβας (IVC) σε φυσιολογικούς επίμυες (CTR) και σε πειραματοζώα με πειραματική αρθρίτιδα (CFA)*

ANOVA

CTR AA	Άθροισμα τετραγώνων	DF	Τετράγωνο του ΜΟ	F	*P*
Μεταξύ των ομάδων	2,631	2	1,315	13,693	**,002**
Εντός των ομάδων	,864	9	,096		
Σύνολο	3,495	11			
CTR IVC					
Μεταξύ των ομάδων	2,584	2	1,292	18,607	**,001**
Εντός των ομάδων	,555	8	,069		
Σύνολο	3,139	10			
CFA AA					
Μεταξύ των ομάδων	,088	2	,044	,372	,697
Εντός των ομάδων	1,296	11	,118		
Σύνολο	1,383	13			
CFA IVC					
Μεταξύ των ομάδων	,272	2	,136	,835	,462
Εντός των ομάδων	1,632	10	,163		
Σύνολο	1,905	12			

vs		MD	SEM	*P*	95% διάστημα εμπιστοσύνης	
					Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο
CTR AA (Dunnett T3)						
JNJ 0	JNJ 10mg/kg	-,3250	,226	,460	-1,08	,433
	JNJ 30mg/kg	-1,110*	,190	**,003**	-1,72	-,502
JNJ 10mg/kg	JNJ 30mg/kg	-,790*	,219	**,018**	-1,42	-,150
CTR IVC	**(Dunnett T3)**					
JNJ 0	JNJ 10mg/kg	-,165	,143	,612	-,645	,315
	JNJ 30mg/kg	-1,15	,240	**,047**	-2,38	,066
JNJ 10mg/kg	JNJ 30mg/kg	-,994	,256	**,047**	-2,10	,115
CFA AA (Scheffe)						
JNJ 0	JNJ 10mg/kg	,030	,242	,992	-,654	,714
	JNJ 30mg/kg	,173	,221	,742	-,451	,798
JNJ 10mg/kg	JNJ 30mg/kg	,143	,221	,814	-,481	,768
CFA IVC	**(Scheffe)**					
JNJ 0	JNJ 10mg/kg	,380	,308	,492	-,503	1,26
	JNJ 30mg/kg	,131	,285	,900	-,686	,950
JNJ 10mg/kg	JNJ 30mg/kg	-,249	,260	,646	-,996	,497