

KESKUSHERMOSTON HISTAMIININ JA DOPAMIININ  
YHTEISVAIKUTUKSET JA NIIDEN MERKITYS RIIPPUVUUDESSA

Marja Kinnunen  
Helsingin yliopisto  
Farmasian tiedekunta  
Farmakologian ja lääkehoidon  
osasto

Lokakuu 2014



Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Farmasian tiedekunta		Laitos – Institution – Department Farmakologian ja lääkehoidon osasto	
Tekijä – Författare – Author Marja Kinnunen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Keskushermoston histamiinin ja dopamiinin yhteisvaikutukset ja niiden merkitys riippuvuudessa			
Oppiaine – Läroämne – Subject Farmakologia			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu		Aika – Datum – Month and year 6.10.2014	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 123
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Histamiini on monoamiinirakenteinen signaalimolekyyl, joka on osallisena useissa elimistön toiminnoissa. Aivoista histamiinia löydettiin ensimmäisen kerran noin 70 vuotta sitten. Hermoston histamiini osallistuu muun muassa biologisten rytmien, energiametabolian sekä lämmöntuotannon säätelyyn. H<sub>3</sub>-reseptori löydettiin keskushermostosta 1980-luvulla. Hermoston histamiinin on osoitettu säätelevän muun muassa gamma-aminovoihapon, glutamaatin, asetyyli-koliinin, noradrenaliinin ja dopamiinin vapautumista hermosolujen päätteistä. Histamiinin dopaminergista hermovälittäjäainejärjestelmää säätelevä vaikutus ei ole vielä kovin hyvin tunnettu. Histamiinisäikeiden tiedetään kuitenkin hermottavan lähes kaikkia aivojen dopaminergisiä alueita ja H<sub>3</sub>-reseptoreita sijaitsee runsaasti muun muassa striatumissa ja limbisessä järjestelmässä, joissa dopamiinin tiedetään toimivan muun muassa mielihyvää lisäävänä hermovälittäjäaineena.</p> <p>Erikoistyön kokeellisen osuuden tarkoitus oli selvittää immunohistokemiallisesti histaminergisen ja dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän sijainti C57BL/6J -kannan hiiren aivoissa. Tutkimuksessa käytettiin primaarisia kaniinissa tuotettua anti-histamiini(HA) ja hiiressä tuotettua anti-tyrosiinihydroksylaasi(TH) vasta-aineita sekä sekundaarisia vuohessa tuotettuja fluoresoivia anti-kaniini ja anti-hiiri vasta-aineita. Kuvat muodostettiin konfokaalimikroskopian avulla. Ensisijaisesti selvitettiin millä riippuvuuden kannalta oleellisilla aivoalueilla histamiini- ja dopamiinisoluja ja hermosäikeitä sijaitsee ja miten nämä kaksi välittäjäainejärjestelmää sijaitsevat suhteessa toisiinsa. H<sub>3</sub>-reseptorien antagonistien on eläinmalleissa osoitettu vähentävän alkoholin kulutusta sekä estävän alkoholin tuottamaa mielihyvää. Yksi erikoistyön tavoitteista oli selvittää estääkö ei-imidatsolirakenteinen H<sub>3</sub>-reseptorin antagonisti myös amfetamiinin mielihyvää tuottavan ja liikeaktiivisuutta lisäävän vaikutuksen. Tutkimuksissa käytettiin H<sub>3</sub>-reseptorin neutraalia antagonistia JNJ-39220675:sta ja tutkimusmenetelmänä pavlovilasta ehdollistetun paikkahakuisuuden menetelmää. Samalla menetelmällä selvitettiin myös aiheuttaako D<sub>2</sub>-reseptorin agonisti kvinpiroli mielihyvää vai aversiota sekä tutkittiin JNJ-39220675:n vaikutusta kvinpirolin aiheuttamaan paikkahakuisuuteen sekä liikeaktiivisuuden muutokseen. Lisäksi näiden kahden farmakologisen ligandin yhteisvaikutuksia tarkasteltiin erillisessä liikeaktiivisuuden tutkimuksessa. Kaikissa käyttäytymiskokeissa käytettiin C57BL/6J -kannan hiiriä.</p> <p>Hiiren aivoissa havaittiin histaminergisen ja dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän mahdollisia synaptisia yhteyksiä muun muassa mustatumakkeessa, supramammillaarisessa tumakkeessa, dorsomedialisen hypotalamuksen alueella sekä ventraalisessa periaqueductalisessa harmaassa aineessa. Tulokset osoittivat histaminergisten hermosäikeiden hermottavan vahvasti myös dorsaalista liikeaktiivisuutta säätelevää sekä ventraalista mielihyvää säätelevää striatumia. On siis mahdollista, että histamiini säätelee dopamiinin vaikutuksia näillä aivoalueilla. Käyttäytymiskokeissa H<sub>3</sub>-reseptorin antagonisti JNJ-39220675 esti amfetamiinin aiheuttamaa liikeaktiivisuuden lisääntymistä akustisesti sekä hillitsi kvinpirolin toistettujen antojen aikaansaamaa liikeaktiivisuuden vähenemisen desensitisaatiota. Nämä tutkimustulokset viittaavat histaminergisen ja dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän reseptoritason yhteisvaikutuksiin. JNJ-39220675 ei kuitenkaan vaikuttanut voimakkaasti herkistävän amfetamiinin mielihyväväikutukseen eikä kvinpirolin aversiiviseen vaikutukseen. Nähtäväksi jää, onko H<sub>3</sub>-reseptorissa tulevaisuudessa potentiaalia uusien lääkeainekandidaattien vaikutuskohteeksi eri keskushermostosairauksien sekä riippuvuuksien hoidossa.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords histamiini, dopamiini, immunohistokemiallinen värjäys, ehdollistettu paikkahakuisuus, H <sub>3</sub> -reseptorin antagonisti, amfetamiini, kvinpiroli, riippuvuus			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Farmakologian ja lääkehoidon osasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Ohjaajat: Pertti Panula, Maria Sundvik ja Jenni Kononoff (os. Vanhanen)			



HELSINGIN YLIOPISTO  
HELSINGFORS UNIVERSITET  
UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of Pharmacy		Laitos – Institution – Department Division of Pharmacology and Pharmacotherapy	
Tekijä – Författare – Author Marja Kinnunen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Histamine and dopamine in central nervous system- their interactions and significance in addiction			
Oppiaine – Läroämne – Subject Pharmacology			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu	Aika – Datum – Month and year 6.10.2014	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 123	
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Histamine is a monoamine structured signal molecule, which takes part in many functions of living organisms. It was first found in brain approximately 70 years ago. Neuronal histamine regulates for example biological rhythms, energy metabolism and thermoregulation. In the 1980's, H<sub>3</sub>-receptor was recognized in the brain. Neuronal histamine regulates functions of other transmitters for example gamma-aminobutyric acid, glutamate, acetylcholine, noradrenaline and dopamine. Currently, the interactions of histamine and dopamine are not well characterized. Though, it is known that histaminergic fibers innervate almost every dopaminergic area of the brain. There are also several H<sub>3</sub>-receptors in the striatum and in the limbic system. These brain areas are important for the rewarding effect of dopamine.</p> <p>The aim of the experimental part of this Master's thesis was to examine the location of histaminergic and dopaminergic nervous systems in mouse brain by using immunohistochemistry. Primary antibodies that were produced in rabbit (anti-histamine (HA)) and in mouse (anti-tyrosine hydroxylase (TH)), and secondary anti-rabbit and anti-mouse antibodies, that were produced in goat and conjugated with fluorophores, were used in the study. The samples were imaged with a confocal microscope. The primary aim was to find out, in which addiction related brain areas, histamine and dopamine cells and fibers are located and how they are situated in relation to each other. H<sub>3</sub>-receptor antagonists have been shown to decrease the consumption and rewarding effect of alcohol in animal models. Therefore, it was examined if non-imidazole structured H<sub>3</sub>-receptor antagonist also inhibits the rewarding effect of amphetamine, and if it decreases the locomotor activity induced by amphetamine. JNJ-39220675, a neutral antagonist of H<sub>3</sub>-receptor, and behavioral paradigm of conditioned place preference (CPP) were used in the experiment. CPP was also used to find out if D<sub>2</sub>-receptor agonist quinpirole cause reward or aversion. The effect of JNJ-39220675 on quinpirole's place preference and change in locomotor activity was also investigated. The interactions of these two pharmacological ligands were also examined in a separate locomotor activity experiment. C57BL/6J mice were used in all experiments.</p> <p>The results show that there are possible synaptic connections of histaminergic and dopaminergic system in substantia nigra, supramammillary nucleus, dorsomedial hypothalamic area and ventral periaqueductal grey area. Also, histaminergic nerve fibers innervate to the dorsal striatum, which regulates motor functions, and to the ventral striatum, which is a part of the rewarding system of the brain. Hence, it is possible that histamine regulates the actions of dopamine in these brain areas. The behavioral experiments showed that JNJ-39220675 inhibits acutely increased locomotor activity caused by amphetamine, and decreases desensitization of decreased locomotor action caused by repeated dose of quinpirole. However, JNJ-39220675 did not have any effect on the rewarding effect of amphetamine, which causes strong sensitization. Also, JNJ-39220675 did not have an effect on quinpirole's aversive action. It remains to be seen, if H<sub>3</sub>-receptor is a potential target for new medicines in the treatment of different brain diseases and addiction in the future.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords histamine, dopamine, immunohistochemical staining, conditioned place preference, H <sub>3</sub> -receptor antagonist, amphetamine, quinpirole, addiction			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Division of Pharmacology and Pharmacotherapy			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Supervisors: Pertti Panula, Maria Sundvik ja Jenni Kononoff (nee Vanhanen)			

# SISÄLLYSLUETTELO

## KIRJALLISUUSKATSAUS

1	JOHDANTO.....	1
2	HERMOVÄLITTÄJÄAINEJÄRJESTELMÄT.....	2
2.1	Histaminerginen hermovälittäjäainejärjestelmä.....	3
2.1.1	Hermoston histamiini.....	3
2.1.2	Histamiinisolut ja hermosäikeet.....	4
2.1.3	Histamiinireseptorit H <sub>1</sub> , H <sub>2</sub> ja H <sub>4</sub> .....	6
2.1.4	Histamiinireseptori H <sub>3</sub> .....	8
2.1.5	Histamiinin merkitys elimistön fysiologiassa.....	11
2.1.6	Histamiinin merkitys eri keskushermostosairauksien patofysiologiassa.....	12
2.2	Dopaminerginen hermovälittäjäainejärjestelmä.....	16
2.2.1	Dopamiini.....	16
2.2.2	Dopamiinisolut ja hermosäikeet.....	18
2.2.3	Dopamiinireseptorit.....	20
2.2.4	Dopamiinin merkitys elimistön fysiologiassa.....	23
2.2.5	Dopamiinin merkitys eri keskushermostosairauksien patofysiologiassa.....	25
2.3	Histamiinin ja dopamiinin yhteysvaikutukset keskushermostossa.....	28
2.3.1	Histaminergisen ja dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän anatominen sijainti aivoissa.....	28
2.3.2	Reseptoritason yhteisvaikutukset.....	29
3	RIIPPUVUUS.....	31
3.1	Dopamiini ja riippuvuus.....	32
3.2	Lääkehoito.....	32
3.2.1	Nykyinen lääkehoito.....	33
3.2.2	Histaminergisten yhdisteiden potentiaali riippuvuuden hoidossa.....	34
4	YHTEENVETO.....	36

# SISÄLLYSLUETTELO

## KOKEELLINEN OSUUS

1	TYÖN TARKOITUS.....	38
2	MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	40
2.1	Eläimet ja lääkeaineet.....	40
2.2	Immunohistokemiallinen värjäys.....	41
2.2.1	Perfusointi ja aivojen poistaminen.....	41
2.2.2	Aivojen fiksaus ja leikkeiden teko.....	42
2.2.3	Värjäykset, pesut ja inkubaatiot.....	42
2.2.4	Kontrollit ja ristireaktiivisuus.....	43
2.2.5	Leikkeiden kuvantaminen konfokaalimikroskoopilla.....	44
2.3	Ehdollistetun paikkahakuisuuden tutkimus.....	45
2.3.1	H <sub>3</sub> -reseptorin antagonisti ja amfetamiini.....	45
2.3.2	H <sub>3</sub> -reseptorin antagonisti ja D <sub>2</sub> -reseptorin agonisti.....	48
2.4	Liikeaktiivisuuden tutkimus.....	49
2.5	Tilastolliset menetelmät.....	50
3	TULOKSET.....	50
3.1	Immunohistokemiallinen värjäys.....	50
3.1.1	Striatum, etuaivojen pohjaosa ja hypotalamus.....	52
3.1.2	Keskiaivot.....	60
3.1.3	Histaminergiset ja dopaminergiset hermosäikeet sagitaalisessa rakennekuvassa.....	63
3.2	Ehdollistettu paikkahakuisuus.....	64
3.2.1	JNJ-39220675 ja amfetamiini.....	64
3.2.2	JNJ-39220675 ja kvinpiroli.....	67
3.3	Liikeaktiivisuus.....	69
4	TULOSTEN TARKASTELU.....	70
4.1	Immunohistokemiallinen värjäys.....	70
4.1.1	Histaminergisen ja dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän sijainti suhteessa toisiinsa sekä mahdolliset synaptiset yhteydet.....	71
4.1.2	Merkitys riippuvuudessa.....	74
4.2	Ehdollistettu paikkahakuisuus.....	77
4.2.1	H <sub>3</sub> -reseptorivasteet.....	77
4.2.2	Amfetamiinin mielihyvää ja liikeaktiivisuutta lisäävä vaikutus.....	78
4.2.3	JNJ-39220675 ei estä amfetamiinin aiheuttamaa mielihyvää, mutta vähentää amfetamiinin liikeaktiivisuuden stimulaatiota.....	81
4.2.4	JNJ-39220675 ei vaikuta kvinpirolin aiheuttamaan aversioon ja liikeaktiivisuuden vähenemiseen.....	86
4.3	JNJ-39220675 estää kvinpirolin toistettujen antojen aiheuttamaa liikeaktiivisuuden vähenemisen desensitisaatiota.....	89
4.4	Pohdintaa neuroanatomian ja käyttäytymiskokeiden tuloksista.....	91
5	JOHTOPÄÄTÖKSET.....	93
6	KIITOKSET.....	94
	KIRJALLISUUSLUETTELO.....	95

## KIRJALLISUUSKATSAUS

### 1 JOHDANTO

Histamiini on monoamiinirakenteinen signaalimolekyyli, joka on osallisena monissa elimistön toiminnoissa, kuten sileän lihaksen supistumisessa (Dale ja Laidlaw 1910), ruoansulatuskanavan suolahapon erityksessä sekä allergisten reaktioiden synnyssä. Histamiinin  $H_1$ - ja  $H_2$ -reseptoriin sitoutuvia lääkkeitä on ollut markkinoilla jo vuosikymmenten ajan.  $H_2$ -reseptorin salpaajat estävät liiallista vatsahapon eritystä ja  $H_1$ -reseptorin salpaajat puolestaan estävät histamiinivälitteistä allergista yliherkkyysoireita. Aivoista histamiinia löydettiin ensimmäisen kerran noin 70 vuotta sitten (Kwiatkowski 1941; Kwiatkowski 1943). White (1959) tutkimusryhmineen selvitti hieman myöhemmin histamiinin synteesin ja metabolian keskushermostossa. Hermoston histamiini osallistuu muun muassa biologisten rytmien (Mochizuki ym. 1992; Takahashi ym. 2006), painon (Jorgensen ym. 2007), energiametabolian (Sakata ym. 1997) sekä lämmöntuotannon ja nestetasapainon säätelyyn (Gerald ym. 1972). Histamiini säätelee myös korkeampia aivotoimintoja, kuten sensorisia ja motorisia toimintoja (Onodera ym. 1994), mielialaa (Brown ym. 2001), mielihyvää (Torrealba ym. 2012) sekä oppimista ja muistia (Passani ym. 2004).

1960-luvulla elimistön biogeenisten amiinien sijaintia aivoissa tutkittiin kattavasti histokemiallisin menetelmin (Carlsson ym. 1961). Histamiinin neuroanatomian tutkimus ei kuitenkaan käynnistynyt tuolloin vielä yhtä laajasti kuin muiden amiinirakenteisten hermovälittäjäaineiden tutkimus, sillä menetelmässä käytetty aldehydireagenssi sitoutui epäspesifisesti myös kaikkialla aivoissa sijaitsevaan endogeeniseen spermiiniin. Kun histamiinin ja histamiinia syntetisoivan entsyymin histidiinidekarboksylaasin immunohistokemialliseen havaitsemiseen kehitettiin uusia spesifisempiä vasta-aineita, histaminergisten hermosäikeiden osoitettiin lähtevän posteriorisen hypotalamuksen tuberomammillaarisen tumakkeen histamiinisoluista (Watanabe ym. 1983; Panula ym. 1984; Watanabe ym. 1984). Tuberomammillaarisessa tumakkeessa ja sen lähialueilla sijaitsee unilateraalaisesti ihmisen aivoissa noin 64 000 histamiinisolua (Airaksinen ym. 1991) ja rotan aivoissa noin 2400 histamiinisolua (Ericson ym. 1987).

H<sub>3</sub>-reseptorin löytyminen keskushermostosta 1980-luvulla vahvisti histamiinilla olevan tärkeä merkitys erilaisten keskushermostotoimintojen säätelyssä (Arrang ym. 1983). Hermoston histamiinin onkin osoitettu säätelevän muun muassa gamma-aminovoihapon (Yamamoto ym. 1997), glutamaatin (Garduno-Torres ym. 2007), asetyylikoliinin (Blandina ym. 1996), noradrenaliinin (Schlicker ym. 1994) ja dopamiinin (Schlicker ym. 1993) vapautumista hermosolujen päätteistä. Histamiinin dopaminergista hermovälittäjäainejärjestelmää säätelevä vaikutus ei ole vielä kovin hyvin tunnettu. Histamiinisäikeiden tiedetään kuitenkin hermottavan lähes kaikkia aivojen dopaminergisiä alueita (Panula ym. 1989) ja H<sub>3</sub>-reseptoreita on runsaasti muun muassa striatumissa ja limbisessä järjestelmässä (Pollard ym. 1993), joissa dopamiinin tiedetään toimivan muun muassa mielihyvää lisäävänä hermovälittäjäaineena (Hyman ym. 2006). Lisäksi *in vitro* -tutkimukset ovat osoittaneet postsynaptisen H<sub>3</sub>-reseptorin muodostavan heterodimeerejä dopamiiniin D<sub>1</sub>- (Ferrada ym. 2009) ja D<sub>2</sub>-reseptorien (Ferrada ym. 2008) kanssa. Näiden heterodimeerien on havaittu muuttavan dopamiinivälitteistä solusignalointia.

Erikoistyön kirjallisuuskatsauksessa keskitytään histamiinin ja dopamiinin merkitykseen ja yhteisvaikutuksiin keskushermostossa sekä solu- että reseptoritasolla. Lisäksi tarkastellaan dopamiinin osuutta riippuvuudessa, riippuvuuden nykyisiä lääkkeitä sekä histaminergisten yhdisteiden potentiaalia riippuvuuden lääkkehoidossa. Kokeellisessa osuudessa tutkitaan näiden hermovälittäjäainejärjestelmien neuroanatomiaa sekä H<sub>3</sub>-reseptorin ja dopamiinin yhteisvaikutuksia sekä merkitystä riippuvuudessa.

## 2 HERMOVÄLITTÄJÄAINEJÄRJESTELMÄT

Tässä kappaleessa tarkastellaan histamiinin ja dopamiinin synteesiä, varastoitumista, vapautumista, tunnettuja soluvasteita ja merkitystä elimistön fysiologiassa sekä eri keskushermostosairauksien: Parkinsonin taudin, skitsofrenian, tarkkaavaisuus-yliaktiivisuushäiriön (engl. attention deficit and hyperactivity disorder, ADHD), Touretten syndrooman ja narkolepsian patofysiologiassa. Riippuvuuden patofysiologiaa tarkastellaan kappaleessa 3.

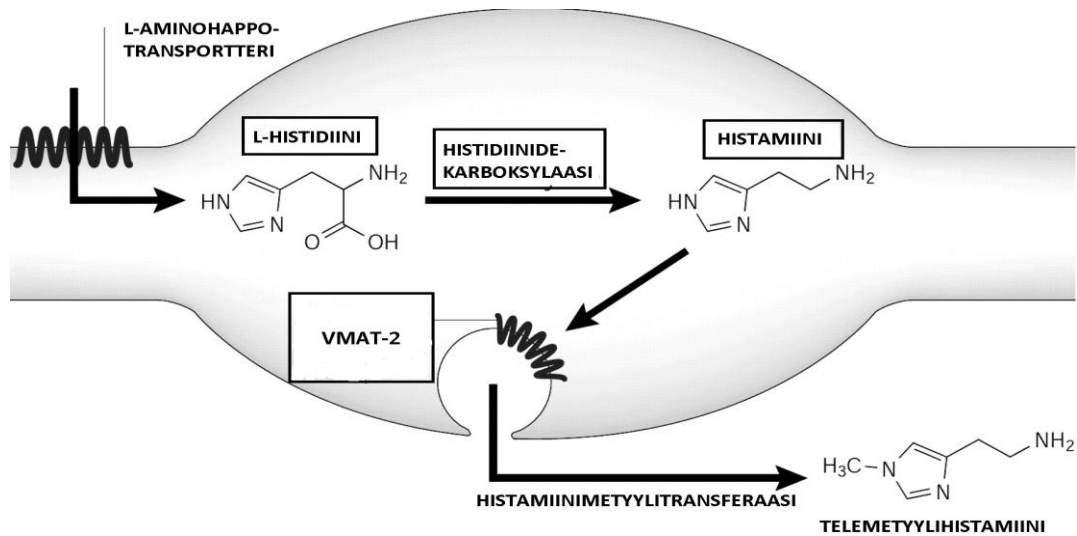
## 2.1 Histaminerginen hermovälittäjäainejärjestelmä

### 2.1.1 Hermoston histamiini

Histamiini on monoamiinirakenteinen keskushermoston välittäjäaine, jota syntetisoidaan aivoissa tuberomammillaarisen tumakkeen (engl. tuberomammillary nucleus, TMN) histaminergisissä hermosoluissa sekä syöttösoluissa (White 1959; Panula ym. 1984). Keskushermoston ulkopuolinen histamiini ei pääse veri-aivoesteen läpi, joten aivojen histamiinituotanto on edellämainittujen solujen varassa (Neame 1964). Histidiinidekarboksylaasi (engl. histidine decarboxylase, HDC) muodostaa histamiinia aminohappo L-histidiinistä, joka toimii synteesiä rajoittavana tekijänä (Taylor ja Snyder 1971) (kuva 1). HDC:n toiminta on aktiivisinta posteriorisen hypotalamuksen TMN:ssä sekä sen lähialueilla, mutta kyseistä entsyymiä ilmenee myös hermosolujen päätteissä (Watanabe ym. 1983). Vesikulaarinen monoamiinitransportteri-2 (VMAT-2) varastoi histamiinia hermosolujen soomaosan sekä aksonivarikoosien vesirakkuloihin, mistä sitä vapautuu kalsiumista riippuvaisen aktiopotentiaalın seurauksesta solunulkoiseen tilaan (Hayashi ym. 1984; Panula ym. 1990; Haas ja Panula 2003). H<sub>3</sub>-reseptorivälitteinen negatiivinen palautevaikutus säätelee histamiinin synteesiä ja vapautumista (Arrang ym. 1983).

Solunulkoinen histamiini metaboloituu aivoissa pääasiassa histamiini-N-metyylitransferaasin (HNMT) vaikutuksesta N-metylaatiolla telemetyylihistamiiniksi (kuva 1) (Reilly ja Schayer 1970), jonka puolestaan monoamiinioksidaasi B (MAO-B) ja aldehyddehydrogenaasi hapettaa N-telemetyyli-imidatsolietikkahapoksi (Hough ja Domino 1979; Lin ym. 1991; Schwartz ym. 1991). Tutkimukset ovat osoittaneet, että HDC:tä esiintyy erityisesti posteriorisessa hypotalamuksessa, kun taas HNMT:tä on löydetty lähes kaikkialta keskushermostosta (Watanabe ym. 1983). Tämä viittaa siihen, että aivojen histamiinituotanto on keskittynyt hypotalamukseen, mutta histamiinin vaikutukset leviävät laajalle alueelle koko aivoissa.





Kuva 1. Histamiinin synteesi, vapautuminen hermosolusta ja metabolia keskushermostossa. Histamiinin esiaste, L-histidiini, kulkeutuu hermosolun sisälle L-aminohappotransportterin avulla. Histamiinia muodostuu L-histidiinistä histidiinidekarboksylaasientsyymin vaikutuksesta. Valmiit histamiinimolekyylit pakataan vesikulaarisen monoamiinitransportteri-2:n (VMAT-2) avulla solulimasta vesirakkulaan, josta ne kulkeutuvat solun ulkopuolelle vesirakkulan sulautuessa solukalvoon. Solunulkoinen histamiini metaboloituu histamiinimetyylitransferaasi entsyymin vaikutuksesta inaktiiviseksi tele-metyylihistamiiksi. L-histidiinin ja histamiinin molekyylirakenteessa esiintyy heterosyklinen, aromaattinen imidatsolirengas (Muokattu Haasin ja Panulan (2003) kuvasta).

Muut monoaminergiset hermovälittäjäaineet voivat säädellä histamiinin vapautumista hermopäätteistä. Dopaminergisten, noradrenergisten ja serotonergisten hermosäikeiden on osoitettu hermottavan tuberomammillaarista tumaketta ja muodostavan mahdollisesti synaptisia yhteyksiä histamiinisolujen tuojahaarakkeiden kanssa (Ericson ym. 1989). Esimerkiksi dopamiinin on havaittu vaikuttavan histamiinin vapautumista lisäten  $D_2$ -reseptorin välityksellä ja vähentäen  $D_3$ -reseptorin kautta (Prast ym. 1993). Noradrenaliinin arvellaan puolestaan vähentävän histamiinin vapautumista  $\alpha_2$ -reseptorin kautta (Prast ym. 1991).

### 2.1.2 Histamiinisolut ja hermosäikeet

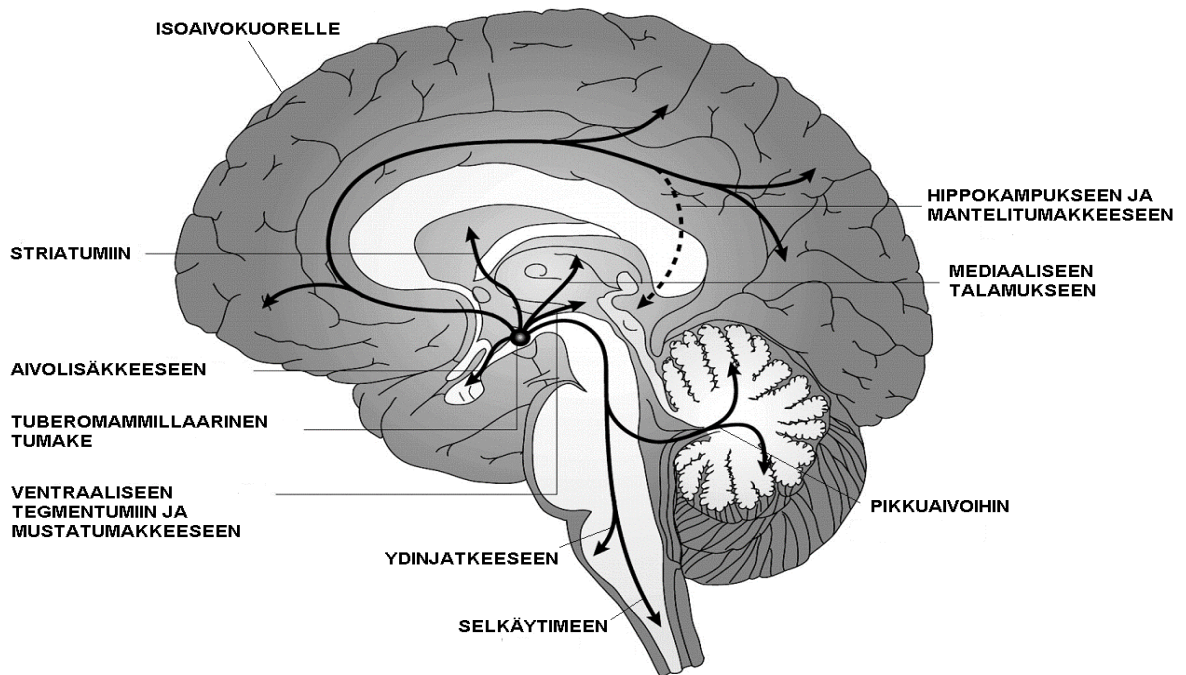
Histamiinia tuottavien hermosolujen soomaosat sijaitsevat posteriorisen hypotalamuksen alaosassa TMN:ssä (Panula ym. 1984; Watanabe ym. 1984). Syöttösoluja esiintyy aivoissa lähinnä talamuksessa (Goldschmidt ym. 1984). Niiden histamiinin tuotannon on

arveltu olevan tärkeää aikaisessa yksilön kehitysvaiheessa, mutta täysikasvuisella nisäkällä TMN:n histamiinisolut ovat merkittävimpiä histamiinin tuottajia (Auvinen ja Panula 1988).

Histamiinisolujen on arveltu olevan toiminnaltaan erilaisia. Mikrodialyysitutkimuksessa on muun muassa havaittu, että H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistin tioperamidin ja gamma-aminovoihapporeseptori A:n (engl. gamma-aminobutyric acid, GABA<sub>A</sub>) antagonistin bikukulliinin paikallinen infuusio TMN:seen lisää histamiinin vapautumista eri aivoalueilla (Giannoni ym. 2009). Tioperamidi salpaa presynaptista H<sub>3</sub>-autoreseptoria ja lisäsi tutkimuksessa histamiinin vapautumista isoivokuorella, kun taas bikukulliini estää GABA<sub>A</sub>-gista, histamiinisoluja hillitsevää vaikutusta ja lisäsi tutkimuksessa histamiinin vapautumista accumbens-tumakkeessa.

Rotan sikiönkehityksen päivinä 14-16 histamiinisoluja esiintyy erityisen runsaasti serotonergisiä hermosoluja sisältävässä raphe-tumakkeessa (Auvinen ja Panula 1988). Nämä histamiinisolut ovat kuitenkin hävinneet jo sikiön kehityksen päivään 18 mennessä ja päivänä 20 histamiinisoluja alkaa ilmestyä TMN:een. 2-viikkoisilla rotilla on TMN:ssä histamiinisoluja jo saman verran kuin aikuisilla rotilla. Histamiinin merkitystä yksilökehityksessä ei vielä täysin tunneta, mutta sen arvellaan vaikuttavan hermoyhteyksien plastiisuuteen (Panula ym. 2014).

TMN:n histamiinisolujen myelinisoitumattomat histaminergiset hermosäikeet hermottavat lähes kaikkia aivoalueita (kuva 2) (Panula ym. 1989; Airaksinen ym. 1991). Histamiinisäikeiden kartoituksessa rotan aivoista histaminergisiä hermoratoja löydettiin yhteensä kolme: kaksi nousevaa ja yksi laskeva. Tiheintä hermostus on hypotalamuksessa, mediaalisessa preoptisessa, periventrikulaarisessa, supraoptisessa sekä suprakiasmaattisessa tumakkeessa. Hieman harvempaa hermostus on muun muassa ventraalisessa tegmentumissa, mustatumakkeessa, locus coeruleuksessa, raphe-tumakkeessa, hajukäämissä ja mantelitumakkeessa. Dorsaalissa striatumissa, accumbens-tumakkeessa ja talamuksen mediaalisessa osassa hermosäikeitä on havaittu kohtalaisen runsaasti. Talamuksen lateraalissa osassa histaminerginen hermostus on puolestaan vähäistä.



Kuva 2. Histaminergiset hermosäikeet ihmisen aivoissa. Histaminergiset hermosäikeet suuntautuvat tuberomammillaarisesta tumakkeesta muun muassa ventraaliseen tegmentumiin, mustatumakkeeseen, aivolisäkkeeseen, striatumiin, isoivokuorelle, hippokampukseen, mantelitumakkeeseen, talamukseen, pikkuaivoihin, ydinjatkeeseen sekä selkäyttimeen (Muokattu Haasin ja Panulan (2003) kuvasta)

### 2.1.3 Histamiinireseptorit $H_1$ , $H_2$ ja $H_4$

Histamiinin tiedetään aktivoivan keskushermostossa ainakin neljää 7-transmembraanista G-proteiinivälitteistä histamiinireseptoria:  $H_1$ -,  $H_2$ -,  $H_3$ - ja  $H_4$ -reseptoria (Hill ym. 1997). Histamiinireseptorit eroavat toisistaan huomattavasti muun muassa sijaintinsa sekä toimintansa puolesta. Lisäksi  $H_3$ - ja  $H_4$ -reseptorit ovat rakenteeltaan samankaltaisia, mutta eroavat rakenteellisesti merkittävästi  $H_1$ - ja  $H_2$ -reseptoreista.  $H_3$ -reseptorin toimintaa tarkastellaan myöhemmin tarkemmin, sillä toistaiseksi tämän histamiinireseptorin toiminnan liittymisestä dopaminergiseen solusignointiin on eniten tutkimusnäyttöä (Schlicker ym. 1993; Molina-Hernandez ym. 2000; Ferrada ym. 2008; Ferrada ym. 2009; Moreno ym. 2011; González-Sepúlveda ym. 2013).

Postsynaptisia  $H_1$ -reseptoreita sijaitsee runsaasti esimerkiksi uni- ja valvetilaa säätelevillä talamuksen ja isoivokuoren alueilla sekä riippuvuuden kannalta oleellisilla aivoalueilla: mantelitumakkeessa, limbisessä järjestelmässä ja accumbens-tumakkeessa (Chang ym. 1979; Bouthenet ym. 1988).  $H_1$ -reseptori (56 kDA) on 488-491 aminohaposta koostuva

transmembraaninen proteiini (Yamashita ym. 1991; Traiffort ym. 1994). Histamiinin tai muun agonistin sitoutuessa  $H_1$ -reseptoriin  $G_{q/11}$ -proteiini aktivoituu. Tämä aiheuttaa solunsisäisen fosfolipaasi C:n aktivoitumisen, jonka seurauksena muodostuu pääsääntöisesti kahta toisiolähetettä, 1,2-diasyyliglyserolia (DAG) ja inositoli-1,4,5-trifosfaattia ( $IP_3$ ). Nämä toisiolähetit aikaansaavat kalsiumvälitteisen hermosolun aktivoitumisen.  $H_1$ -reseptorin välittämät soluvasteet voivat välittyä myös syklisen adenosiinimonofosfaatin (cAMP), syklisen guanosiinimonofosfaatin (GMP) ja typpioksidin (NO) kautta (Leurs ym. 1994).

$H_2$ -reseptori (40 kDa) on 359 aminohaposta koostuva solukalvon proteiini (Kobayashi ym. 1996). Postsynaptisia  $H_2$ -reseptoreita sijaitsee aivoissa esimerkiksi isoaiivokuorella, muun muassa motorisia toimintoja säätelevissä mustatumakkeessa ja striatumissa, muistitoimintoja koordinoivassa hippokampuksessa sekä homeostaasia ylläpitävässä hypotalamuksessa (Traiffort ym. 1992a; Traiffort ym. 1992b; Haas ja Panula 2003). Histamiinin tai  $H_2$ -reseptorin farmakologisen agonistin sitoutuminen  $H_2$ -reseptoriin aikaansaa  $G_s$ -proteiinin aktivaation, joka johtaa adenylyylisyklaasin tuotannon lisääntymiseen, mikä puolestaan lisää cAMP:n solunsisäistä pitoisuutta (Baudry ym. 1975; Hegstrand ym. 1976). Tämä johtaa proteiinkinaasi A:n (PKA) aktivoitumiseen ja solulimassa ja solukalvolla olevien kohdeproteiinien fosforylaatioon. Aktivoitunut PKA voi kulkeutua myös tuumaan, jolloin useita solunsisäisiä tapahtumia säätelevä CREB-transkriptiotekijä (engl. cAMP response element-binding protein, CREB) aktivoituu.

$H_4$ -reseptorin identtisyys  $H_3$ -reseptorin transmembraanisten alueisen osalta on noin 58 % ja aminohappokoostumuksen osalta noin 31 % (Nguyen ym. 2001; Zhu ym. 2001). Nämä kaksi reseptoria poikkeavat toisistaan kuitenkin sijainniltaan sekä toiminnaltaan.  $H_4$ -reseptoreita on löydetty lähinnä luuytimestä ja keskushermoston ulkopuolisista leukosyyteistä (Morse ym. 2001; Liu ym. 2001). Ihmisen  $H_4$ -reseptorin mRNA:ta ilmentää myös esimerkiksi keuhkojen ja pernan solut sekä syöttösolut, dendriittisolut ja eosinofiilit (Zhu ym. 2001; Liu ym. 2001).  $H_4$ -reseptoreita on havaittu myös ihmisen isoaiivokuorella sekä hiiren talamuksessa, hippokampuksessa sekä isoaiivokuorella (Connelly ym. 2009). Hiiren isoaiivokuoren somatosensoriselle alueelle annosteltu  $H_4$ -reseptorin agonisti 4-metyy-

lihistamiini hyperpolarisoi hermosoluja. Lisäksi 4-metyylihistamiinin vaikutus on kumotavissa H<sub>4</sub>-reseptorin antagonistilla JNJ-10191584:lla. Nämä tutkimustulokset viittaavat siihen, että H<sub>4</sub>-reseptori voi olla mielenkiintoinen uusi lääkevaikutusten kohde keskushermostossa. H<sub>4</sub>-reseptorin keskushermostotoimintojen ja tarkemman sijainnin selvittäminen aivoissa vaatii kuitenkin kattavia lisätutkimuksia. H<sub>4</sub>-reseptorien aktivaation on ehdotettu käynnistävän G<sub>i/o</sub>-välitteisen signalointiketjun, joka johtaa solunsisäisen cAMP:in laskuun (Morse ym. 2001; Nguyen ym. 2001).

Kaikki histamiinireseptorit on myös konstitutiivisesti aktiivisia (Alewijjnse ym. 1997; Bakker ym. 2000; Morisset ym. 2000; Schneider ym. 2009). Konstitutiivisesti aktiivinen reseptori voi ilman ulkopuolista farmakologista ligandia sitoutua G-proteiiniin ja aktivoitua sen. Tämän aikaansaa spontaani allosteerinen muutos reseptorin konformaatioissa. H<sub>3</sub>-reseptorien on osoitettu olevan konstitutiivisesti aktiivisia myös *in vivo* (Morisset ym. 2000; Gbahou ym. 2003; Takahashi ym. 2003). Reseptorien konstitutiivinen aktiivisuus on melko yleistä *in vitro*, mutta *in vivo* se lienee harvinaista ja vaikeammin todennettävissä. Histamiinireseptorien konstitutiivinen aktiivisuus voi säädellä histamiinin synteesiä sekä vapautumista. Tämä on tärkeä ottaa huomioon uusien potentiaalisten lääkeaineiden kehityksessä. Useat kehitteillä olevat H<sub>3</sub>-reseptorien toimintaa estävät lääkekandidaatit ovatkin tämän reseptorin käänteisagonisteja eikä neutraaleja antagonisteja, jotta ne voivat kumota myös reseptorin konstitutiivisen aktiivisuuden (Morisset ym. 2000).

#### 2.1.4 Histamiinireseptori H<sub>3</sub>

Presynaptisten H<sub>3</sub>-autoreseptorien olemassaolo havaittiin ensimmäisen kerran, kun histamiinin osoitettiin estävän histamiinin vapautumista rotan isoaivokuoren L-histidiinillä esikäsitellyissä leikkeissä (Arrang ym. 1983). Myöhemmin havaittiin sekä *in vitro* että *in vivo*, että spesifisillä H<sub>3</sub>-reseptorin farmakologisilla ligandeilla pystytään vaikuttamaan myös histamiinin synteesiin sekä muiden välittäjäaineiden vapautumiseen (Arrang ym. 1987a; Arrang ym. 1987b; Prast ym. 1994; Schlicker ym. 1994). H<sub>3</sub>-reseptorien postsynaptinen sijainti havaittiin pian *in situ* hybridisaatio -menetelmällä (Pollard ym. 1993). Presynaptisia H<sub>3</sub>-reseptoreita esiintyy histamiiniermosolujen soomissa sekä viejä- ja

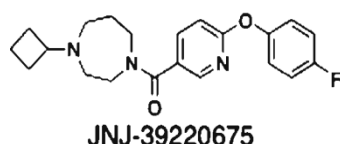
tuojahaarakkeissa (Arrang ym. 1983). H<sub>3</sub>-reseptorit ovat jakautuneet lähes kaikkialle aivoihin, myös niille aivoalueille, joita histaminergiset solut eivät hermota (Pollard ym. 1993). Tämä tarkoittaa sitä, että H<sub>3</sub>-reseptoreita sijaitsee heteroreseptoreina muita välittäjäaineita sisältävien hermosolujen päätteissä.

Histamiinireseptorien suhteelliset osuudet eri aivoalueilla vaihtelevat huomattavasti (Pollard ym. 1993; Pillot ym. 2002a). H<sub>3</sub>-reseptoreita on runsaasti muun muassa isoaivokuorella, hippokampuksessa, manteliumakkeen sentraalisessa ja lateraaliosassa, striatumissa, hajukäämissä, globus palliduksen alueella, mustatumakkeessa ja sentraalisessa harmaassa aineessa. Striatumissa H<sub>3</sub>-reseptoreita sijaitsee runsaasti GABAergisten hermosolujen postsynaptisilla solukalvoilla (Pollard ym. 1993; Ryu ym. 1994; Pillot ym. 2002a), ja mahdollisesti myös glutamatergisten ja dopaminergisten hermosolujen presynaptisissa hermopäätteissä (Schlicker ym. 1993; Doreulee ym. 2001; Molina-Hernandez ym. 2000). H<sub>3</sub>-reseptoreita on huomattavasti vähemmän selkäytimessä, aivolisäkkeessä ja pikkuaivoissa (Pollard ym. 1993).

Transmembraanisen, noin 445 aminohappoa sisältävän, H<sub>3</sub>-reseptorin (70 kDa) aktivaation välittämä solusignaalintietäjä on kytkeytynyt G<sub>i/o</sub>-proteiiniin (Clark ja Hill 1996). Tämä on tyypillistä monille presynaptisille reseptoreille. G<sub>i/o</sub>-proteiini on kytkeytynyt solukalvon kalsiumkanaviin sekä adenylaattisyklaasiin. H<sub>3</sub>-reseptorin aktivaatio johtaa muun muassa adenylaattisyklaasin solunsisäisen aktivaation vähenemiseen, mikä puolestaan laskee cAMP:n määrää solun sisällä (Lovenberg ym. 2000), ja näin ollen vähentää esimerkiksi CREB-traskriptiotekijän välittämää geenitraskriptiota. Kalsiumkanavien toimintaan H<sub>3</sub>-reseptorin aktivaatiolla on salpaava vaikutus (Takeshita ym. 1998). G<sub>i/o</sub>-proteiinin stimulaation on todettu myös aktivoivan fosfatidyli-inositoli-3-kinaasi (PI3K), mitogeenin aktivoiman proteiinikinaasi (MAPK)- (Drutel ym. 2001) sekä akt/glykogeenisyntaasikinaasi-3-beeta (GSK-3beta)- (Bongers ym. 2007) toisiolähettijäketjun. Lisäksi G<sub>i/o</sub>-proteiinin stimulaatio voi aiheuttaa fosfolipaasi A2:n (PLA2) aktivaation, mikä myös osaltaan johtaa muun muassa solunsisäisen kalsiumpitoisuuden alenemiseen (Levi ym. 2007).

H<sub>3</sub>-reseptorille on löydetty toistaiseksi noin 20 alamuotoa, jotka vaihtelevat muun muassa proteiinin aminohappoketjun pituuden, kolmannen solunsisäisen silmukan ja N- sekä C-päänteen suhteen (Hancock ym. 2003). Rotan aivoista on löydetty polymeraasiketjureaktion avulla H<sub>3</sub>-reseptorin alamuotoja, joiden aminohappokoostumukset (aminohappojen määrä ilmoitettu suluissa) poikkeavat huomattavasti toisistaan: H<sub>3</sub>(445), H<sub>3</sub>(413), H<sub>3</sub>(410) ja H<sub>3</sub>(397) (Gbahou ym. 2012). H<sub>3</sub>(413)-reseptorin on arveltu toimivan presynaptisena autoreseptorina. Eri H<sub>3</sub>-reseptorin alamuodot ovat jakautuneet aivojen eri alueille ja aktivoivat erilaisia solusignalointireittejä (Drutel ym. 2001). Lisäksi samojen ligandien affiniteetti eri alamuodoissa vaihtelee. Coge (2001) tutkimusryhmineen löysi ihmisen talamuksesta kloonatusta H<sub>3</sub>-reseptorista 6 erilaista alamuotoa. Yleisin löydettyistä alamuodoista oli H<sub>3</sub>(445aa)-reseptori, jonka Lovenbergin tutkimusryhmä löysi ensimmäisen kerran vuonna 1999. Kaikki löydettyt alamuodot ovat peräisin samasta kromosomissa 20 sijaitsevasta H<sub>3</sub>-reseptoria koodaavasta geenistä.

Lovenberg (1999) tutkimusryhmineen kloonasi ensimmäisinä ihmisen H<sub>3</sub>-reseptorin cDNA:n. Tutkijoiden kloonattua eri lajien H<sub>3</sub>-reseptoreita on havaittu, että ne ovat rakenteeltaan samankaltaisia. Esimerkiksi hiiren H<sub>3</sub>-reseptorin (Chen ym. 2003) aminohapposekvenssin identtisyys on 98 % rotan H<sub>3</sub>-reseptorin kanssa (Lovenberg ym. 2000), 95 % marsun H<sub>3</sub>-reseptorin kanssa (Tardivel-Lacombe ym. 2000) ja 94 % ihmisen H<sub>3</sub>-reseptorin kanssa (Lovenberg ym. 1999). Eri lajien H<sub>3</sub>-reseptoreilla voi olla kuitenkin huomattavan erilaiset farmakologiset ominaisuudet. Niin kutsuttujen vanhempien imidatsolirakenteisten H<sub>3</sub>-reseptorien antagonistien siproksifaanin ja tioperamidin on muun muassa osoitettu olevan hiiren H<sub>3</sub>-reseptorissa 40-100 kertaa potentimpia kuin ihmisen H<sub>3</sub>-reseptorissa (Rouleau ym. 2004). Tämän erikoistyon kokeellisessa osuudessa käytetyllä niin kutsutulla uudemmallalla ei-imidatsolirakenteisella H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistilla, aryloksipyridiinirakenteisella JNJ-39220675:lla (kuva 3), on korkea affiniteetti sekä selektiivisyys rotan ja ihmisen H<sub>3</sub>-reseptoriin (Letavic ym. 2010). Koska hiiren ja rotan H<sub>3</sub>-reseptorit ovat lähes homologisia keskenään, JNJ-39220675 sitoutuu luultavasti korkealla affiniteetilla ja selektiivisyydellä myös hiiren H<sub>3</sub>-reseptoriin.



*Ihmisen  
H<sub>3</sub>-reseptori*      *Rotan H<sub>3</sub>-reseptori*

<i>K<sub>i</sub></i> (nM)	<b>1,4 ± 0,1</b>	<b>23 ± 8</b>
---------------------------	------------------	---------------

Kuva 3. Ei-imidatsolirakenteisen H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistin JNJ-39220675 rakennekaava ja affiniteettivakiot (K<sub>i</sub>) ihmisen ja rotan H<sub>3</sub>-reseptoreissa. Aromattisen heterosyklisen imidatsolirenkkaan sijaan JNJ-39220675:ssa on aromaattinen heterosyklinen pyridiinirengas (Letavic ym. 2010).

### 2.1.5 Histamiinin merkitys elimistön fysiologiassa

Histamiinin yksi tunnetuimmista fysiologisista ominaisuuksista on sen vireystilaa ylläpitävä vaikutus (Mochizuki ym. 1992). Alunperin tämä histamiinin vaikutus havaittiin ensimmäisen polven H<sub>1</sub>-reseptoria salpaavien antihistamiinien väsyttävän vaikutuksen vuoksi (Monnier ym. 1967). Myöhemmin osoitettiin, että H<sub>1</sub>-reseptorin suhteen poistogeenisten eläinten vireystila on alentunut sekä muisti ja oppiminen heikentynyt (Dai ym. 2007; Zlomuzica ym. 2008; Zlomuzica ym. 2009). H<sub>3</sub>-reseptorien antagonisteilla on puolestaan havaittu kognitiivisia ja motorisia toimintoja kohentava vaikutus useissa eri tutkimuksissa (Vohora ja Bhowmik 2012). Lisäksi EEG-mittausten avulla on todettu TMN:n histamiinisolujen olevan aktiivisimmillaan valvetilassa (Takahashi ym. 2006). Preoptisen alueen aktivoituneista GABAergisistä ja galaninergisistä hermosoluista lähtevät posterioriseen hypotalamukseen ulottuvat hermosäikeet puolestaan tuottavat unta salpaamalla TMN:n histamiinisoluja (Sherin ym. 1998).

Keskushermoston histamiini on osallisena myös motivaation synnyssä sekä mielihyvähätkuisessä käytöksessä (Torrealba ym. 2012). Rotilla TMN:n histamiinisolujen on muun muassa osoitettu aktivoituvan ennen opetettua ateria-aikaa eläinmallissa, jossa eläinten ruoan saantia on rajoitettu (Meynard ym. 2005). Lisäksi Valdes (2010) tutkimusryhmiin havaitsi TMN:n leesiodien vähentävän rottien ruokahakuista käytöstä. Tämä eläimien käytös voi toki johtua myös histamiinisolujen vaurioitumisen aiheuttamasta vireystilan laskusta. H<sub>1</sub>-reseptorin suhteen poistogeenisillä hiirillä on kuitenkin havaittu vähäisempää kiinnostusta uusiin esineisiin tai ympäristöihin kuin villityypin lajitovereillaan, mikä voidaan tulkita alhaisempana motivaationa ja apatiana (Inoue ym. 1996; Zlomuzica ym. 2008).



Histaminerginen hermovälittäjäainejärjestelmä on osallisena myös elimistön lämmöntuotannossa (Green ym. 1976). Paikallinen histamiini-injektio preoptiselle alueelle lisää koe-eläinten lämmöntuotantoa (Lundius ym. 2010). Tämän vaikutuksen uskotaan välittyvän H<sub>1</sub>- ja H<sub>3</sub>-reseptorien kautta. Preoptisen alueen GABAergisistä hermosoluissa sijaitsee postsynaptisia H<sub>3</sub>-reseptoreita, joiden aktivaation arvellaan hillitsevän GABAergistä TMN:n kohdistuvaa estävää vaikutusta. Myös hypotalamuksen solujen tuottaman neuropeptidin, oreksiinin eli hypokretiinin, on havaittu aktivoivan TMN:n histaminergisiä lämmöntuotantoon osallistuvia hermosoluja (Yasuda ym. 2005). Aktivoiduttuaan nämä histamiinisolut voivat stimuloida ruskean rasvakudoksen sympaattisia hermosäikeitä (Yasuda ym. 2004).

Histamiinin on todettu vaikuttavan elimistön energiametaboliaan ja aiheuttavan painon alenemista, mutta näiden vaikutusten mekanismit eivät ole selviä (Ookuma ym. 1989; Ookuma ym. 1993). Sethi (2012) tutkimusryhmineen tutki histamiinin vaikutusta energiametaboliassa normaali- ja ylipainoisilla hiirillä. Preoptisen alueen histamiinireseptorien aktivaatio vähensi normaalipainoisten hiirien ravinnon kulutusta. Ylipainoisilla hiirillä ruoan kulutus ei vähentynyt. Preoptisen alueen H<sub>1</sub>-reseptorin mRNA:n ilmentyminen oli myös alhaisempi ylipainoisilla hiirillä. Tämä viittaa siihen, että histamiinilla on tärkeä osuus normaalipainoisten hiirien painon säätelyssä, mutta ylipainoisilla hiirillä säätelymekanismin toiminta on heikentynyt. Histamiinin merkitystä painonsäätelyssä puoltaa myös radioligandisitoutumiskokeiden tulokset, jotka ovat osoittaneet painonnousua haittavaikutuksena aiheuttavien tyypillisten ja epätyypillisten antipsykoottien sitoutuvan korkealla affiniteetilla H<sub>1</sub>-reseptoriin (Kroeze ym. 2003). Lisäksi H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistien on havaittu useissa eläinmalleissa alentavan painoa sekä plasman triglyseridipitoisuuksia (Hancock ja Brune 2005; Malmlof ym. 2005).

#### 2.1.6 Histamiinin merkitys eri keskushermostosairauksien patofysiologiassa

Minkään keskushermostosairauden ei ole varsinaisesti pystytty osoittamaan liittyvän suoraan pelkästään histaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän epätoiminnallisuuteen. Monissa keskushermostosairauksissa on kuitenkin havaittu toiminnallisia poikkeavuuksia.

sia muiden hermovälittäjäainejärjestelmien lisäksi myös histaminergisessä hermovälittäjäainejärjestelmässä (Haas ym. 2008; Panula ja Nuutinen 2013). Lisäksi histamiinireseptorien farmakologisilla ligandeilla, erityisesti H<sub>3</sub>-reseptorien antagonisteilla, on havaittu prekliinisissä kokeissa monien keskushermostosairauksien oireita lieviä vaikutuksia (Sander ym. 2008).

Parkinsonin taudissa mustatumakkeen dopaminergiset hermosolut ovat vaurioituneet, ja näin ollen dopamiinin vapautuminen striatumissa on vähentynyt (Agid ja Blin 1987). Tämä aiheuttaa taudille tyypillisinä oireina vapinaa, vaikeuksia liikkeen aloittamisessa sekä kognitiivisia häiriöitä. Potilaiden TMN:n histamiinisolut eivät näytä anatomisesti poikkeavilta (Nakamura ym. 1996) eikä HDC:n aktiivisuus ole muuttunut (Garbarg ym. 1983). Histamiinia on kuitenkin Parkinsonin tautia sairastavien aivoissa normaalia enemmän selektiivisesti mustatumakkeessa, globus palliduksessa sekä putamenin alueella (Rinne ym. 2002). Lisäksi histaminergisiä hermosäikeitä on normaalia runsaammin mustatumakkeen vaurioituneiden dopamiinisolujen ympärillä. On kuitenkin mahdollista, että hermopäätteiden sisältämä histamiini ei pääse vapautumaan normaalisti esimerkiksi saturoituneen VMAT-2:n toiminnan seurauksena, sillä tele-metyylihistamiinin pitoisuudet eivät ole koholla. Radioaktiivisen ligandin sitoutuminen mustatumakkeen H<sub>3</sub>-reseptoreihin on myös Parkinson potilailla poikkeuksellisen korkea (Anichtchik ym. 2001). Tämä ilmiö on havaittavissa myös rotilla, joiden mustatumakkeen dopamiinihermosoluja on vaurioitettu aivojen sisäisellä 6-hydroksydopamiini (6-OHDA) injektioilla (Ryu ym. 1994). H<sub>3</sub>-reseptorien antagonistien annostelun on havaittu vähentävän myös rottien stereotyyppistä pyörimiskäyttäytymistä apomorfiini-injektion jälkeen 6-OHDA eläinmallissa (Nowak ym. 2009). On siis mahdollista, että H<sub>3</sub>-reseptorin salpaus voi elvyttää dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän toimintaa Parkinsonin taudissa vielä toistaiseksi tuntemattoman mekanismin kautta.

Skitsofrenia on monimutkainen keskushermoston sairaus, jonka patofysiologiaan arvelaan liittyvän muun muassa dopamiinin, glutamaatin, GABA:n ja asetyylikoliinin signaalointireittien epätoiminnallisuus (Brisch ym. 2014). Myös histaminergisessä järjestelmässä on havaittu muutoksia. Skitsofreniapotilaiden selkäydinnesteestä on löydetty nor-

maalia enemmän tele-metylihistamiinia (Prell ym. 1995). Tämä on havaittavissa erityisesti niillä potilailla, joilla negatiiviset oireet, kuten puheen köyhtyminen, tunteiden latis-tuminen ja apatia, näyttävät vallitsevina oireina. Lisäksi isoaivokuoren H<sub>1</sub>-reseptorien määrä on normaalia alhaisempi ja H<sub>3</sub>-reseptorien määrä normaalia korkeampi skitsofreniaa sairastavilla potilailla (Nakai ym. 1991; Jin ym. 2009). Histamiinin mahdollinen kompensatorinen lisääntynyt vapautuminen voi johtua esimerkiksi H<sub>1</sub>-reseptorivälitteisen signaaliketjun puutteellisesta toiminnasta. Toisaalta korkea histamiinipitoisuus voi aiheuttaa H<sub>1</sub>-reseptorien määrän vähenemisen postsynaptisilla solukalvoilla (engl. down-regulation). Koska skitsofrenian hoitoon käytetyt antipsykootit aiheuttavat kuitenkin H<sub>1</sub>-reseptoreita salpaamalla painonnousua, psykoottisilla potilailla on kuitenkin todennäköisesti edelleen toiminnallisia H<sub>1</sub>-reseptoreita. Eläinmalleissa H<sub>3</sub>-antagonistien on havaittu parantavan skitsofreniassa tyypillisesti häiriintyneitä kognitiivisia toimintoja, mahdollisesti muun muassa asetyylikoliinin vapautumista lisäämällä (Galici ym. 2009; Griebel ym. 2012). Lisäksi useat H<sub>3</sub>-antagonistit parantavat heikentynyttä PPI-refleksiä (engl. prepulse inhibition) eläinmallissa, jota käytetään mallintamaan muun muassa skitsofrenian taudinkuvaa (Fox ym. 2002; Ligneau ym. 2007a). Dopamiiniteorian mukaan skitsofreniassa mesokortikaalisen dopaminergisen hermoradan toiminta on vähentynyt (negatiiviset oireet) ja mesolimbisen dopaminerginen hermorata on yliaktiivinen (positiiviset oireet) (Brisch ym. 2014). Yleisessä käytössä olevat antipsykootit salpaavat näiden molempien ratojen D<sub>2</sub>-reseptoreita ja voivat näin ollen aiheuttaa haittavaikutuksina muun muassa negatiivisten oireiden pahenemista (Stone ja Pilowsky 2007). H<sub>3</sub>-antagonistit puolestaan lisäävät dopamiinin vapautumista isoaivokuorella ja voisivat siksi olla haittavaikutusprofiililtaan suotuisampia kliinisessä käytössä (Fox ym. 2005; Ligneau ym. 2007a). D<sub>2</sub>-reseptorin salpaajista haloperidolin ja risperidonin samanaikaisen annostelun imidatsolirakenteisten H<sub>3</sub>-reseptorien salpaajien kanssa on kuitenkin havaittu lisäävän kataleptisten kohtausten riskiä, mikä viittaa voimistuneisiin motorisiin haittavaikutuksiin (Pillot ym. 2002b). Ei-imidatsolirakenteisten H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistien ABT-239:n ja A-43104:n ei ole kuitenkaan havaittu lisäävän kataleptisiä kohtauksia (Zhang ym. 2005).

ADHD:n tyypillisinä oireina esiintyy tarkkaavaisuuden sekä kognitiivisten ja motoristen toimintojen häiriöitä (Piek ym. 1999; Bental ja Tirosh 2007). Potilailla on havaittu mag-

neettikuvauksissa aivojen rakenteellisia muutoksia ja heikentynyt kortikostriataalinen dopaminerginen toiminta (Dickstein ym. 2006; Emond ym. 2009). Positroniemissiotomografia (PET) on paljastanut potilailla myös striatumin vähentyneen dopamiinin metabolian, mikä viittaa dopamiinin vapautumisen vähenemiseen. Striatumissa on myös runsaasti histamiinireseptoreita (Pollard ym. 1993). Doreulee (2001) tutkimusryhmineen havaitsi rotan aivoleikkeissä, että histamiini sekä H<sub>3</sub>-reseptorin agonisti R- $\alpha$ -metyylihistamiini lamaavat kortikostriataalisen radan toimintaa ja tämä vaikutus on kumottavissa H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistilla. H<sub>3</sub>-antagonistit ovat myös vähentäneet ADHD:lle tyypillisiä tarkkaavaisuuden häiriöitä ADHD:n eläinmalleissa (Fox ym. 2002; Komater ym. 2003). Paraikaa useita H<sub>3</sub>-reseptorin antagonisteja tutkitaankin kliinisissä kokeissa mahdollisina uusina kognitiivisia toimintoja kohentavina lääkkeinä ADHD:n hoidossa (Kuhne ym. 2011).

Touretten syndrooman patofysiologiaan on arveltu kuuluvan poikkeavuudet basaalisena etuaivon kortikostriataalisessa hermoradassa sekä erityisesti dopaminergisessä hermovälittäjäainejärjestelmässä (Rampello ym. 2006). Syndroomaan kuuluvat nykäysmäiset pakkoliikkeet sekä äännähdykset, jotka toistuvat samalla tavalla lyhyiden jaksojen ajan (Martino ym. 2013). Muutama vuosi sitten julkaistussa tutkimuksessa havaittiin, että pienellä osalla Touretten syndroomaa sairastavilla on geneetinen nonsense-mutaatio histamiinin synteessin kannalta oleellista HDC entsyymiä koodaavassa geenissä (Ercan-Sencicek ym. 2010). Castellan Baldan (2014) tutkimusryhmineen havaitsi myös HDC-entsyymin suhteen poistogeenisillä hiirillä Touretten syndroomassa esiintyvien äkillisten pakkoliikkeiden kaltaisia motorisia häiriöitä, jotka olivat kumottavissa D<sub>2</sub>-reseptorin antagonistilla sekä intrastriataalisella histamiini-infuusiolla. Nämä löydökset viittaavat siihen, että histamiinilla voi olla tärkeä merkitys perinnöllisen Touretten syndrooman synnyssä. Sekä histamiini että dopamiini säätelevät hermosolujen toimintaa striatumin ja isoaiivo-kuoren alueella. Onkin arveltu, että näiden kahden välittäjäaineen toiminnan epätasapaino striatumin alueella voisi olla osasy Touretten syndrooman synnyssä (Panula ja Nuutinen 2013).

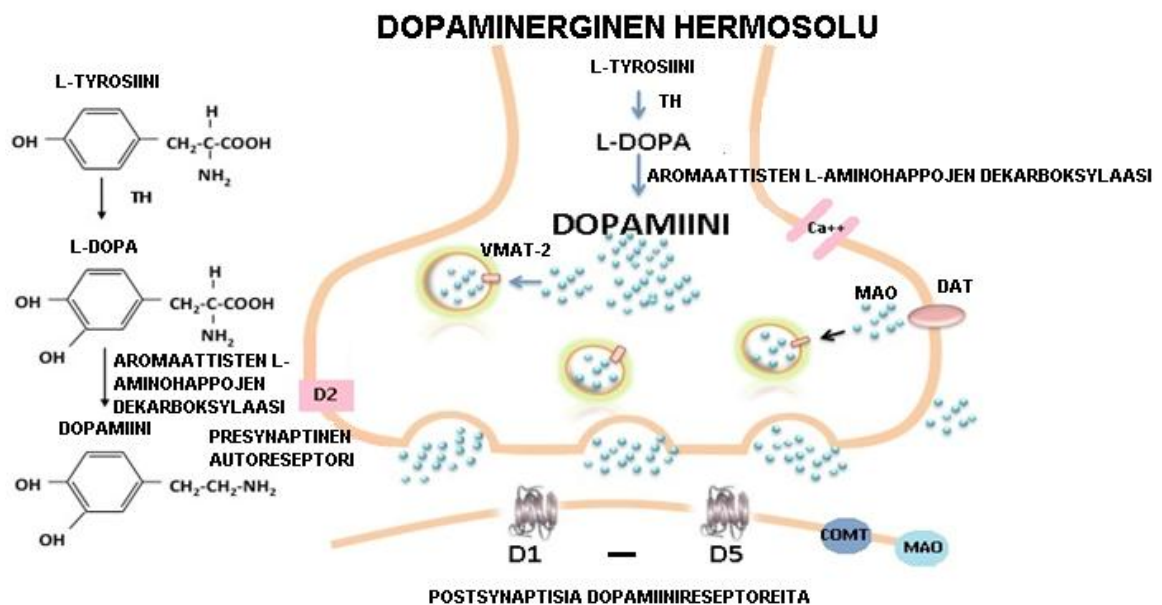
Narkolepsia on unihäiriö, jolle tyypillisiä oireita ovat voimakas päiväaikainen sedaatio sekä kataplektiset kohtaukset (Burgess ja Scammell 2012). Aivojen toimintoja kiihdyttävän hypokretiinijärjestelmän epätoiminnallisuuden arvellaan liittyvän narkolepsian patofysiologiaan (de Lecea ym. 1998; Nishino ym. 2009). Hypotalamuksen hypokretiinisoluista suuntautuu hermosäikeitä aivojen vireystilaa sääteleviin osiin, muun muassa locus coeruleuksen noradrenergisiin hermosoluihin, raphe-tumakkeen serotonergisiin hermosoluihin ja basaalisen etuaivon kolinergisiin hermosoluihin (Peyron ym. 1998; Eggermann ym. 2001). Hypokretiinisoluista suuntautuu hermosäikeitä myös TMN:n histamiinisoluihin, joissa hypokretiini stimuloi histamiinin vapautumista (Eriksson ym. 2001). Narkolepsiasta kärsivien potilaiden selkäydinnesteessä onkin todettu normaalia matalampi histamiinipitoisuus (Kanbayashi ym. 2009; Nishino ym. 2009), mikä tukee narkolepsian hypokretiiniteoriaa. Lisäksi hypokretiinin suhteen poistogeenisten eläinten vireystilan on havaittu lisääntyvän histamiinin vapautumista stimuloivan H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistin annon jälkeen (Lin ym. 2008). H<sub>3</sub>-reseptorin käänteisagonistia, pitolisanttia, sisältävä Wakix<sup>®</sup> on ensimmäinen keskushermoston histaminergiseen hermovälittäjäainejärjestelmään vaikuttava lasten narkolepsian hoitoon kehitetty lääkevalmiste, jonka myyntilupahakemusta käsitellään paraikaa EMA:ssa (European Medicines Agency: [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu); EMA/465005/2014).

## 2.2 Dopaminerginen hermovälittäjäainejärjestelmä

### 2.2.1 Dopamiini

Dopamiini on monoamiinirakenteinen hermovälittäjäaine, jonka luultiin 1950-luvulle asti olevan vain noradrenaliinin ja adrenaliinin synteesin välituote (Yeragani ym. 2010). Carlsson (1959) kollegoineen löysi ensimmäisinä dopamiinia aivoista. Samalla havaittiin, että dopamiini ja keskushermoston toinen katekoliamiinirakenteinen hermovälittäjäaine, noradrenaliini ovat jakautuneet eri aivoalueille. Nykyään dopamiinin tiedetään säätelevän lukuisia elimistön toimintoja kuten motoriikkaa (Hosp ja Luft 2013), mielihyvävaikutusta (Yokel ja Wise 1975), motivaatiota (Baik 2013) sekä muistia ja tarkkaavaisuutta (Clark ja Noudoost 2014).

Dopamiinia syntetisoidaan dopaminergisten hermosolujen soomaosassa L-tyrosiinista kahden välivaiheen kautta (Elsworth ja Roth 1997; Daubner ym. 2011) (kuva 4). Hermoimpulssin kulkeutuessa hermopäätteeseen solukalvon kalsiumkanavat aukeavat. Solunsisäisen kalsiumpitoisuuden kasvu sekä cAMP toisiolähetin aktivoituminen stimuloivat tyrosiinihydroksylaasin (TH) toimintaa. Ensin TH muuttaa L-tyrosiinin L-3,4-dihydroksyfenyylialaniiniksi (engl. L-3,4-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA), jonka aromaattisten L-aminohappojen dekarboksylaasientsyymi muuttaa lähes välittömästi dopamiiniksi. Synteesiä rajoittava tekijä on TH:n aktivaatio. Solunsisäinen dopamiini puolestaan estää TH:n toimintaa kilpailemalla TH:ta aktivoivan kofaktorin tetrahydrobiopterinin (BH4) kanssa samasta TH:n pinnassa olevasta sitoutumispaikasta. Solunsisäinen dopamiini kulkeutuu VMAT-2:n avulla vesirakkulaan, joka voi sulautua solukalvoon ja vapauttaa dopamiinin synapsirakoon tai varastoitua dopaminergisen hermosolun sileään endoplasmakalvostoon tai tuojahaarakkeisiin (Cuello ym. 1973; Mercer ym. 1979; Nirenberg ym. 1996).



Kuva 4. Dopamiinin synteesi, vapautuminen, soluunotto ja metabolia. Solunsisäisen kalsiumin aktivoima tyrosiinihydroksylaasi (TH) muuttaa L-tyrosiinin L-dopaksi, jonka aromaattisten L-aminohappojen dekarboksylaasi muuttaa dopamiiniksi. Dopamiini kulkeutuu vesikulaarisen monoamiinitransportteri-2:n (VMAT-2) avulla vesirakkulaan, jonka sulautuessa solukalvoon dopamiini vapautuu synapsirakoon. Dopamiini aktivoi postsynaptisia dopamiinireseptoreita (D<sub>1</sub>-D<sub>5</sub>) sekä presynaptisia dopamiinin autoreseptoreita (pääasiallisesti D<sub>2</sub>). Se otetaan takaisin soluun dopamiinitransportterin (DAT) avulla tai metaboloidaan inaktiiviseksi postsynaptisella kalvolla olevan katekoli-o-metyylitransferaasin (COMT) tai monoamiinioksidiaasin (MAO) välityksellä. MAO entsyymiä sijaitsee myös hermosolun sisällä mitokondrion ulkopinnoilla (Muokattu Bravo ym. (2014) kuvasta).

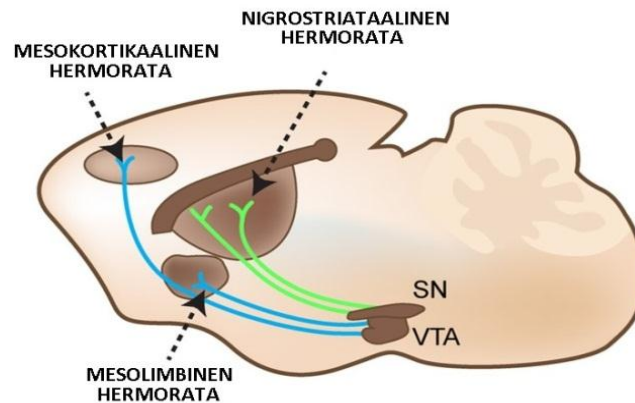
Synapsiraossa dopamiini voi sitoutua postsynaptisiin D<sub>1</sub>-, D<sub>2</sub>-, D<sub>3</sub>-, D<sub>4</sub>- tai D<sub>5</sub>-reseptoreihin tai presynaptisiin dopamiinin vapautumista ja synteesiä sääteleviin dopamiinin D<sub>2</sub>-autoreseptoreihin (kuva 4) (Missale ym. 1998; Ford 2014). Dopamiinivälitteinen signaalinvälitys päättyy, kun dopamiini otetaan takaisin soluun dopamiinitransportterin (DAT) avulla (Reith ym. 1997). Vaihtoehtoisesti reseptoreihin sitoutumaton dopamiini voi metaboloitua katekoli-o-metyylitransferaasin (COMT) vaikutuksesta 3-metoksytyramiiniksi (MTA) tai monoamiinioksidaasin (MAO) vaikutuksesta ensin 3,4-dehydroksifenyyliaasetaldehydiksi ja edelleen aldehydidehydrogenaasin vaikutuksesta 3,4-dihydroksifenyylitikkahapoksi (engl. 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC) ja lopulta COMT:in vaikutuksesta homovanilliinihapoksi (engl. homovanillic acid, HVA) (Neff ja Goridis 1972; Bertocci ym. 1991; Gesi ym. 2001).

Ihmisillä dopamiinin yleisin metaboliitti keskushermostossa on HVA (Kopin ym. 1988), kun taas hiiren ja rottien päämetaboliitit ovat DOPAC ja HVA (Uutela ym. 2009). Dopamiinin inaktivaatioreitti vaihtelee myös eri aivoalueilla. Esimerkiksi COMT-entsyymi on aktiivisin isoaiivokuorella, kun taas DAT-proteiinia esiintyy runsaammin striatumissa, ventraalisessa tegmentumissa ja mustatumakkeessa (Shimada ym. 1991; Matsumoto ym. 2003).

### 2.2.2 Dopamiinisolut ja hermosäikeet

Dopamiinia syntetisoivat hermosolurungot sijaitsevat keskiaivojen ventraalisen tegmentumin alueella (VTA) sekä mustatumakkeessa (engl. substantia nigra reticular, SNR) (Dahlström ja Fuxe 1964). Suurin osa dopaminergisistä hermosoluista sijaitsee keskiaivojen alueella, mutta osa soluista sijaitsee myös talamuksessa, hypotalamuksessa, hajukäämissä ja silmän verkkokalvolla. Keskushermoston dopamiinisolut on jaettu keskiaivoissa sijaitseviin A8-A10 soluihin, väliaivoissa sijaitseviin A11-A14 soluihin, hajukäämissä sijaitseviin A16 soluihin ja silmän verkkokalvolla sijaitseviin A17 soluihin (Dahlström ja Fuxe 1964; Lindvall ja Björklund 1979). VTA:sta ja SNR:stä alkunsa saavat dopaminergiset hermosäikeet hermottavat muun muassa striatumia, isoaiivokuorta, limbistä järjestelmää ja hypotalamusta.

Dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän neuroanatomiaa kartoitettiin ensimmäisenä rotan aivoista (Dahlström ja Fuxe 1964; Thierry ym. 1973). Pian havaittiin, että keskiaivojen dopaminergiset hermosolut A8, A9 ja A10 ovat heterogeenisiä soluryhmiä, joiden hermosäikeet hermottavat aivojen eri alueita, joskin niiden hermottavat aivoalueet ovat osittain päällekkäisiä (Ungerstedt 1971; Domesick 1988). Pitkiä dopaminergisiä hermosäikeitä suuntautuu mustatumakkeen A9 dopamiinisoluista dorsaaliseen striatumiin, erityisesti caudate-tumakkeen ja putamenin aivoalueille (nigrostriataalinen hermorata) (kuva 5). VTA:n A8 ja A10 dopamiinisoluista lähtee puolestaan pitkiä hermosäikeitä accumbens-tumakkeeseen, hajukäämiin, mantelitumakkeeseen ja muihin aivojen limbisen järjestelmän rakenteisiin (mesolimbinen hermorata). A10 dopamiinisoluista suuntautuu pitkiä hermosäikeitä myös isoivokuorelle (mesokortikaalinen hermorata). Lyhyempiä hermosäikeitä suuntautuu A8 ja A10 dopamiinisoluista muun muassa keskiaivojen, periakveduktaalisin harmaan aineen, hippokampuksen sekä locus coeruleuksen alueille (Hokfelt ym. 1984; Deutch ym. 1988).



Kuva 5. Dopaminergiset hermoradat hiiren aivojen sagitaalisessa rakennekuvassa. Nigrostriataalinen hermorata alkaa mustatumakkeesta (engl. substantia nigra, SN) ja suuntautuu striatumin GABAergisiin hermosoluihin. Kaksi dopaminergistä hermorataa lähtee ventraalisen tegmentumin alueelta (VTA): isoivokuorta hermottava mesokortikaalinen hermorata ja aivojen limbistä aluetta hermottava mesolimbinen hermorata. Aivoissa on myös neljäs dopaminerginen hermorata, tuberoinfundibulaarinen hermorata, joka alkaa hypotalamuksesta ja päättyy aivolisäkkeeseen. Tämä hermorata säätelee prolaktiinin vapautumista (Muokattu Moneyn ja Stanwoodin (2013) kuvasta).

Ventraalisen periakveduktaalisin harmaan aineen (VPAG) alueella sekä raphe-tumakkeen lineaarisessa osassa (RLi) sijaitsee myös dopamiinisoluja, joiden hermosäikeet her-



mottavat keskiaivojen ventraalista osaa (Lu ym. 2006). Dopaminerginen tuberoinfundibulaarinen hermorata alkaa puolestaan hypothalamuksen arcuate-tumakkeen hermosoluista ja päättyy aivolisäkkeeseen, missä dopamiini säätelee prolaktiinin vapautumista (Fuxe ja Hokfelt 1966). Lyhyitä paikallisia dopaminergisiä hermosäikeitä sijaitsee myös hajukäämissä sekä verkkokalvolla (Dahlström ja Fuxe 1964). Myös selkäyttimeen suuntautuu dopaminergisiä hermosäikeitä hypothalamuksen A11 dopamiinisoluista (Skagerberg ja Lindvall 1985).

Ihmisen dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän rakenne on pääpiirteittäin samanlainen, mutta monimutkaisempi kuin muilla nisäkkäillä (Gaspar ym. 1989). Lajikohtaisia eroja esiintyy muun muassa dopamiinisolujen määrässä (German ja Manaye 1993). Ihmisen aivoissa on suhteellisesti 3 – 7 -kertainen määrä dopamiinisoluja verrattuna rotan aivojen dopaminergisten solujen määrään. Ihmisen ja rotan aivojen dopaminerginen hermovälittäjäainejärjestelmä poikkeaa myös solujen jakautumisen ja hermosäikeiden hermottamien eri aivoalueiden suhteen (Lewis ym. 1998; Gaspar ym. 1989; Berger ym. 1991). Esimerkiksi dopamiinisolut A8, A9 ja A10 eivät ole jakaantuneet ihmisen aivoissa yhtä tarkoilte heterogeenisille alueille kuin rotan aivoissa. Ihmisen aivojen mesokortikaalisen radan hermosäikeet eivät myöskään lähde pelkästään A10 dopamiinisoluista vaan kaikista edellämainituista mustatumakkeen ja VTA:n dopamiinisoluista (A8-A10). Mesokortikaalisen radan dopaminerginen hermotus on myös huomattavasti tiheämpi ihmisen kuin rotan isoaivokuorella.

### 2.2.3 Dopamiinireseptorit

Dopamiini aktivoi keskushermostossa ainakin viittä eri 7-transmembraanista G-proteiinivälitteistä dopamiinireseptoria (D<sub>1</sub>-D<sub>5</sub>) (Missale ym. 1998). D<sub>1</sub>- ja D<sub>5</sub>-reseptorit on luokiteltu D<sub>1</sub>-reseptorityyppiin ja D<sub>2</sub>-, D<sub>3</sub>- ja D<sub>4</sub>-reseptorit D<sub>2</sub>-reseptorityyppiin. Reseptorit on jaettu eri reseptorityyppeihin samankaltaisen rakenteen ja solusignaloinnin perusteella (Kebabian ja Calne 1979; Civelli ym. 1993). Ensimmäiset viitteet dopamiinireseptoreista havaittiin, kun dopamiinin osoitettiin stimuloivan solukalvon G-proteiinin toimintaan kytkeytynyttä adenylaattisyklaasia, jonka aktivaatio puolestaan lisää solunsisäistä cAMP

pitoisuutta (Kebabian ym. 1972). Myöhemmin havaittiin, että dopamiini estää prolaktiinin eritystä aivolisäkkeestä, mutta tämä vaste ei ole linkittynyt solunsisäisen cAMP pitoisuuden nousuun (Caron ym. 1978). Dopamiinireseptorit jaettiin adenylaattisyklaasiin toimintaan kytkeytyneiksi D<sub>1</sub>-reseptoreiksi ja muihin signaalinvälitysketjuihin linkittyneiksi D<sub>2</sub>-reseptoreiksi (Kebabian ja Calne 1979). Tämä jako on säilynyt nykypäivään saakka. 1990-luvulla geenien kloonaustekniikoiden kehittymisen myötä pystyttiin tunnistamaan kolme uutta dopamiinireseptoria: D<sub>3</sub>-, D<sub>4</sub> ja D<sub>5</sub>-reseptorit (Sokoloff ym. 1990; Sunahara ym. 1991; Van Tol ym. 1991).

D<sub>1</sub>-reseptori on aivojen yleisin dopamiinireseptori (Deary ym. 1990; Fremeau ym. 1991). Sen mRNA:ta on löydetty muun muassa striatumista, accumbens-tumakkeesta, hajukäämistä, hypotalamuksesta ja talamuksesta. Striatumissa D<sub>1</sub>-reseptoreita on erityisesti GABAergisissä MS (engl. medium spiny) -hermosoluissa (Le Moine ja Bloch 1995). Samaan reseptorityyppiin kuuluvan D<sub>5</sub>-reseptorin mRNA:ta on löydetty puolestaan hippokampuksesta, lateraalista mammilaarisesta tumakkeesta, talamuksesta, etuaivoista, diagonaalisen hermokimpun alueelta, striatumista sekä mustatumakkeesta (Huntley ym. 1992; Rappaport ym. 1993). D<sub>5</sub>-reseptorin mRNA:n ilmeneminen aivokudoksessa on kuitenkin huomattavasti alhaisempi kuin D<sub>1</sub>-reseptorin. D<sub>1</sub>-reseptorityypin dopamiinireseptorit sijaitsevat pääasiallisesti postsynaptisilla solukalvoilla (Huang ym. 1992; Smiley ym. 1994; Bergson ym. 1995).

D<sub>1</sub>-kaltaisten reseptorien aktivaatio voi käynnistää lukuisia eri solusignaalintietoketjuja (Missale ym. 1998). D<sub>1</sub>-reseptorit ovat kytkeytyneet G<sub>s</sub>-proteiinin, jonka aktivaatio lisää solunsisäisen cAMP:n pitoisuutta ja aktivoi PKA:n toimintaa (Deary ym. 1990; Monsma ym. 1990). Useiden PKA:n substraattien, kuten CREB-transkriptiotekijän ja DARPP-32-proteiinin (engl. dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein), sekä glutamaattireseptorien (AMPA ja NMDA) ja kalsium- ja kaliumkanavien toiminnassa on myös havaittu muutoksia dopamiinin tai farmakologisten ligandien sitoutuessa D<sub>1</sub>-kaltaisiin reseptoreihin (Greengard 2001; Svenningsson ym. 2004). Näiden reseptorien aktivaatio voi lisäksi vaikuttaa muun muassa MAPK -välitteisiin soluvasteisiin (Zhen ym. 1998; Chen ym. 2004).

D<sub>2</sub>-reseptoreita on löydetty lähinnä striatumista, hajukäämistä, isoaiivokuorelta, manteliumakkeesta, hypotalamuksesta, mustatumakkeesta, ventraalisesta tegmentumista, accumbens-tumakkeesta sekä aivolisäkkeestä, missä ne säätelevät prolaktiinin eritystä (Meador-Woodruff ym. 1989; Bouthenet ym. 1991; Diaz ym. 1994). Kuten D<sub>1</sub>-reseptorit, D<sub>2</sub>-reseptorit ovat keskittyneet striatumissa erityisesti GABAergisiin MS-hermosoluihin (Le Moine ja Bloch 1995). D<sub>2</sub>-reseptorien on havaittu myös kolokalisoituvan D<sub>1</sub>-reseptorien kanssa MS-hermosolujen soomaosissa ja presynaptisissa hermopäätteissä (Perreault ym. 2010). Kolokalisaatiolla tarkoitetaan kahden eri substanssin, esimerkiksi reseptorin, sijaintia samassa paikassa esimerkiksi samassa hermosolussa. D<sub>3</sub>-reseptoreita on löydetty puolestaan erityisesti aivojen limbisen järjestelmän alueelta (Landwehrmeyer ym. 1993). Accumbens-tumakkeessa D<sub>3</sub>-reseptoreita sijaitsee substanssi B:tä ja neurotensiiniä sisältävissä hermosoluissa (Bouthenet ym. 1991). D<sub>3</sub>-reseptoreita on löydetty myös pieninä määrinä mustatumakkeen, VTA:n ja hippokampuksen hermosoluista. D<sub>4</sub>-reseptori on aivoissa dopamiinireseptoreista harvinaisin (Missale ym. 1998). Sitä on kuitenkin löydetty muun muassa isoaiivokuorelta, striatumista, manteliumakkeesta, hippokampuksesta ja hypotalamuksesta (Van Tol ym. 1991; O'Malley ym. 1992; Mrzljak ym. 1996).

Myös D<sub>2</sub>-reseptoriperheen dopamiinireseptorit voivat muuttaa soluvasteita usean eri toisiohjausjärjestelmän kautta (Missale ym. 1998). G<sub>i</sub>-proteiinivälitteisen adenyylaattisyklaasin eston on arveltu olevan yksi tämän reseptoriperheen yleisimmistä signaalintireiteistä. D<sub>2</sub>-reseptorin aktivaation havaittiin ensin estävän adenyylaattisyklaasia aivolisäkkeessä ja myöhemmin myös muualla keskushermostossa (De Camilli ym. 1979; Onali ym. 1985). Adenyylaattisyklaasin esto johtaa solunsisäisen cAMP:n pitoisuuden alenemiseen. Myös D<sub>3</sub>- ja D<sub>4</sub>-reseptorien aktivaation on todettu alentavan solunsisäisen cAMP:n määrää soluviljelmissä (Tang ym. 1994).

D<sub>2</sub>-kaltaiset reseptorit voivat myös yhtälailla vaikuttaa hermosolun kalsium- ja kaliumkanaviin, ionipumppuihin ja MAPK-signaalintireitin aktivaatioon (Missale ym. 1998; Beaulieu ja Gainetdinov 2011). Näitä toisiohjausjärjestelmiä on tutkittu kattavasti, mutta tulokset ovat olleet ristiriitaisia. Esimerkiksi toisissa soluviljelmissä D<sub>2</sub>-reseptorin aktivaation on todettu alentavan solunsisäistä kalsiumpitoisuutta ja toisissa lisäävän (Vallar ym. 1990; Seabrook ym. 1994b). D<sub>3</sub>- ja D<sub>4</sub>-reseptorin aktivaation on kuitenkin havaittu

ainoastaan alentavan solujen kalsiumpitoisuutta (Seabrook ym. 1994b; Seabrook ym. 1994a). D<sub>2</sub>-kaltaisten reseptorien on osoitettu myös lisäävän solunsisäistä kaliumpitoisuutta, mikä johtaa solun hyperpolarisaatioon (Williams ym. 1989; Greif ym. 1995). Tämän mekanismin on arveltu olevan yleisin presynaptisissa autoreseptoreissa, joiden aktivaatio estää dopamiinin synteesiä ja vapautumista hermopäätteestä. D<sub>2</sub>-reseptoriperheen reseptorien on havaittu myös lisäävän solunsisäisen arakidonihapon pitoisuutta mahdollisesti proteiinikinaasi C:n (PKC) aktivaation seurauksena (Di Marzo ym. 1993).

Dopamiinireseptorien signaalintireittien monimuotoisuutta lisää reseptorien alamuodot, joihin linkittyneet toisiolähettijärjestelmät voivat poiketa toisistaan (Missale ym. 1998; Beaulieu ja Gainetdinov 2011). Esimerkiksi D<sub>2</sub>-reseptorilla on kaksi alamuotoa: D<sub>2S</sub> ja D<sub>2L</sub> (Dal Toso ym. 1989; Giros ym. 1989). Näillä kahdella alamuodolla on lähes sama farmakologinen profiili, mutta D<sub>2S</sub>-reseptori on arveltu olevan esimerkiksi päävastuussa solunsisäisen PKC:n aktivaatiosta. Myös D<sub>3</sub>- ja D<sub>4</sub>-reseptoreilla on alamuotoja (Fishburn ym. 1993; Seeman ym. 1994). Näiden alamuotojen affiniteetissa eri ligandeille ja jakautumisessa aivokudokseen on havaittu pieniä eroavaisuuksia, joiden kliinistä merkitystä ei kuitenkaan vielä tunneta.

#### 2.2.4 Dopamiinin merkitys elimistön fysiologiassa

Dopamiini osallistuu keskushermostossa lukuisien korkeampien aivotoimintojen säätelyyn. Se säätelee muun muassa liikeaktiivisuutta (Anden ym. 1971), mielihyvävaikutusta (Yokel ja Wise 1975), tarkkaavaisuutta (Clark ja Noudoost 2014), impulsiivisuutta (Basar ym. 2010), muistia (Costa ym. 2012) ja oppimista (Creed ym. 2014). Useiden päihteiden tiedetään vaikuttavan dopaminergiseen hermovälittäjäainejärjestelmään, ja tämän vuoksi dopamiini on liitetty myös riippuvuuden syntymekanismeihin (Baik 2013).

Nigrostriataalinen dopaminerginen hermorata on tärkein liikeaktiivisuutta säätelevä hermovälittäjäainejärjestelmä (Anden ym. 1971). Tämän hermovälittäjäainejärjestelmän eri dopamiinireseptorien aktivaatio vaikuttaa liikeaktiivisuuteen eri tavalla. Esimerkiksi striatumissa presynaptisten D<sub>2</sub>-autoreseptorien aktivaatio vähentää dopamiinin pitoisuutta synapsiraossa, ja näin ollen vähentää liikeaktiivisuutta, kun taas postsynaptisten

D<sub>1</sub>-reseptorien aktivaatio lisää liikeaktiivisuutta (Hoffman ja Beninger 1985; Wolf ja Roth 1990; Missale ym. 1998; Beaulieu ja Gainetdinov 2011). D<sub>2</sub>-reseptori, tarkemmin sen alamuoto D<sub>2S</sub>, on yleisin presynaptinen dopaminerginen autoreseptori aivoissa (Uziel ym. 2000; De Mei ym. 2009). D<sub>2L</sub>-reseptoreita on puolestaan havaittu lähinnä postsynaptisilla solukalvoilla. Dopamiinireseptorien agonistit voivat sitoutua matalammilla pitoisuuksilla autoreseptoreihin ja suuremmilla pitoisuuksilla postsynaptisiin dopamiinireseptoreihin (Wolf ja Roth 1990; Missale ym. 1998; Beaulieu ja Gainetdinov 2011). Muun muassa tämän vuoksi samalla dopamiiniagonistilla voi olla liikeaktiivisuuden positiivinen tai negatiivinen vaikutus. Myös D<sub>3</sub>-reseptorin aktivaatiolla voi olla lievä liikeaktiivisuutta vähentävä vaikutus, sillä D<sub>3</sub>-reseptorin suhteen poistogeenisillä hiirillä on havaittu lievää liikeaktiivisuuden lisääntymistä sekä kohonnut dopamiinipitoisuus striatumissa *in vivo* villityypin hiiriin verrattuna (Joseph ym. 2002). D<sub>4</sub>- ja D<sub>5</sub>-reseptorien ei puolestaan ole pystytty osoittamaan olevan yhtä merkityksellisiä liikeaktiivisuuden säätelyssä (Missale ym. 1998).

Dopamiini välittää mielihyvää tuottavan sekä motivaatiota ja tarkkaavaisuutta lisäävän vaikutuksensa pääasiallisesti mesolimbisen hermoran kautta (Hyman ym. 2006; Baik 2013). VTA:n dopamiinisolujen aktivaatio aikaansaa dopamiinin vapautumisen accumbens-tumakkeessa ja muissa aivojen limbisen järjestelmän osissa, kuten mantelitulmakkeessa. Mesolimbinen hermorata aktivoituu luonnollisista käyttäytymistä vahvista ärsykkeistä, kuten ruoasta, juomasta ja seksuaalisista virikkeistä. Se aktivoituu myös useiden päihdyttävien aineiden vaikutuksesta. Erityisesti postsynaptisten D<sub>1</sub>- ja D<sub>2</sub>-reseptorien, sekä vähemmissä määrin D<sub>3</sub>-reseptorin, on havaittu säätelevän mielihyvää ja motivaatiota (Beaulieu ja Gainetdinov 2011).

Dopamiinin osuutta isoaivokuoren ja hippokampuksen kognitiivisissa toiminnoissa on tutkittu laajasti. Sillä on todettu olevan tärkeä merkitys muun muassa hermosolujen synaptisessa plastisuudessa, ja sen on todettu lisäävän etuaivoissa pitkäkestoista potentiaatiota (engl. long-term potentiation, LTP), joka on tärkeä ilmiö muun muassa muistitoiminnoissa (Lovinger 2010). D<sub>1</sub>-reseptorin aktivaatio on LTP:ssä oleellinen, ja D<sub>1</sub>-reseptorien antagonistien onkin muun muassa havaittu estävän LTP:tä striatumissa *in vitro*

(Kerr ja Wickens 2001). Kortikostriataalisen hermoradan synaptisen plastisuuden on puolestaan osoitettu olevan tärkeä oppimisessa (Calabresi ym. 1996). Mustatumakkeesta alkunsa saavat dopaminergiset hermosäikeet synapsoivat kortikostriataalisen hermoradan kanssa (Smith ym. 1994). Dopamiini voi siis säädellä tämän hermoradan toimintaa yhdessä muiden hermovälittäjäaineiden kanssa. Myös accumbens-tumakkeen arvellaan olevan osallisena muistin ja oppimisen säätelyssä (Setlow 1997). Lisäksi on havaittu, että accumbens-tumakkeen leesiot aiheuttavat eläinten impulsiivisuuden vähenemistä, mikä viittaa tämän aivoalueen dopaminergisen aktiivisuuden tärkeyteen merkitykseen myös impulsiivisuuden säätelyssä (Basar ym. 2010).

### 2.2.5 Dopamiinin merkitys eri keskushermostosairauksien patofysiologiassa

Dopamiinin laajojen fysiologisten vaikutusten vuoksi on loogista, että se on osallisena myös useiden keskushermostosairauksien patofysiologiassa. Tässä kappaleessa tarkastellaan samoja keskushermostosairauksia, joita käsiteltiin kappaleessa 2.1.6 (Histamiinin merkitys eri keskushermostosairauksien patofysiologiassa). Dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän vauriot ja toiminnalliset muutokset ovat kuitenkin osana myös lukuisten muiden, tässä kirjallisuuskatsauksessa mainitsemattomien, keskushermostosairauksien patofysiologiassa.

Mustatumakkeeseen kertyvien pääasiallisesti  $\alpha$ -synukleiiniproteiineista koostuvien dopamiinisoluja vaurioittavien Lewyn kappaleiden arvellaan olevan yksi tärkeimpiä patofysiologisia muutoksia Parkinsonin taudissa (Goldman ym. 2014). Tarkkaa syytä Lewyn kappaleiden muodostumiseen ei tunneta. Useiden eri geenien (esim. PINK1, LRRK2, GBA) mutaatioiden osuutta on tutkittu Parkinsonin taudin synnyssä (Dehay ym. 2013; Koyano ym. 2013). Esimerkiksi arviolta noin 5-10 % Parkinsonin tautia sairastavista kantaa mutaatiota  $\beta$ -glukoserebrosidaasia (GBA) koodaavassa geenissä, mikä voi aiheuttaa solun lysosomaattisen järjestelmän toimintahäiriötä ja tämän seurauksena proteiiniaggregaattien solunsisäisen kertymisen mustatumakkeen dopaminergisiin hermosoluihin (Beavan ja Schapira 2013). Parkinsonin taudin nykyinen lääkehoito perustuu striatumin dopamiinireseptorien aktivoimiseen dopamiinin prekursorilla L-dopalla, ja sen aivoihin kulkeutuvan osuuden määrän lisäämiseen maksan dopadekarboksylaasin estäjillä (Connolly

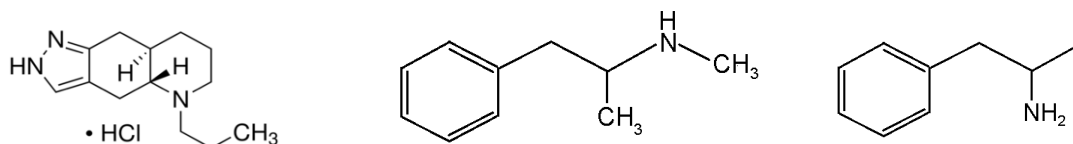
ja Lang 2014). Aivojen dopaminergistä aktiivisuutta voidaan lisätä myös COMT ja MAO-B entsyymien estäjillä sekä dopamiinireseptorien agonisteilla.

Dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän hyperaktiivisuus on todennäköisesti edelleen kaikista tunnetuin skitsofrenian patofysiologian vallitsevista hypoteeseista (Brisch ym. 2014). Nykyinen skitsofrenian lääkehoito D<sub>2</sub>-reseptoreita salpaavilla antipsykooteilla pohjautuu vahvasti dopamiiniteoriaan (Chien ja Yip 2013). Tarkkaa tietoa siitä, mikä on aiheuttanut dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän epätoiminnallisuuden, ei kuitenkaan tiedetä. Syynä voi olla esimerkiksi dopamiinin synteessin tai vapautumisen lisääntyminen, dopamiinireseptorien lukumäärän tai affiniteettien muutokset, postsynaptisten dopamiinireseptorien signaalintiketjujen muutokset tai metaboliareittien epätoiminnallisuus. *Post mortem* -tutkimukset ovat osoittaneet skitsofreniapotilailla heikentyneen dopaminergisen hermotuksen isoaivokuorella (Akil ym. 1999). Lisäksi skitsofreniaa sairastavilla isoaivokuoren D<sub>2</sub>-reseptorien määrän on havaittu olevan normaalia alhaisempi, kun taas striatumin D<sub>2</sub>-reseptorien määrä on normaalia suurempi (Kessler ym. 2009). Nämä löydökset tukevat hypoteesia dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän aivoaluespesifisestä epätoiminnallisuudesta skitsofrenian patofysiologiassa.

Dopaminergisen aktiivisuuden vähenemistä striatumissa ja isoaivokuorella on ehdotettu yhdeksi ADHD:n patofysiologisista muutoksista (Viggiano ym. 2004). Taudin tyypilliset oireet sekä se, että niitä voidaan helpottaa dopamiinin pitoisuutta striatumin ja isoaivokuoren alueella lisäävillä lääkehoidoilla, tukevat dopaminergisen hypoaktiivisuuden teoriaa. ADHD:n lääkehoitona käytetty psykostimulantti metyylyfenidaatti nostaa dopamiinin pitoisuutta synapsiraossa estämällä DAT-proteiinia sekä stimuloimalla postsynaptisiä D<sub>1</sub>-reseptoreita (Wilens 2008). Mahdollisten mutaatioiden vaikutusta ADHD:n synnyssä on tutkittu muun muassa D<sub>4</sub>- ja D<sub>5</sub>-reseptoreita sekä DAT ja COMT proteiineja koodaavissa geeneissä (Faraone ja Mick 2010). Esimerkiksi hiirillä, joiden DAT-proteiinia koodaavan geenin toiminta on estetty, on havaittu esiintyvän hyperaktiivisuutta (Gainetdinov ym. 1999). Lisäksi tämän liikeaktiivisuuden lisääntymisen on havaittu olevan paradoksaalisesti kumottavissa dopaminergistä aktiivisuutta lisäävillä psykostimulanteilla. Tarkkaa mekanismia tälle ilmiölle ei tunneta.

Isoaivokuorelta limbiseen järjestelmään kulkevan, normaalisti negatiivista palautevaikutusta säättävän, hermoran toiminnan on arveltu heikentyneen Touretten syndroomaa sairastavilla (Ziemann ym. 1997). Tätä hypoteesia tukee myös tutkimus, jossa potilailla havaittiin motorisia häiriöitä silmien isoaivokuoren säätelmissä sakkadisissa liikkeissa (Straube ym. 1997). Osalla potilaista on havaittu myös lisääntynyt D<sub>2</sub>-reseptorien määrä striatumissa ja isoaivokuorella (Minzer ym. 2004). D<sub>2</sub>-reseptorien antagonistien, esimerkiksi haloperidolin, on havaittu vähentävän huomattavasti Touretten syndroomassa esiintyviä pakkoliikkeitä, ja ne ovatkin potilaiden nykyisen lääkehoidon kulmakivi (Malaty ja Akbar 2014).

Dopamiinin merkitys narkolepsian taudinkuvalle tyypillisessä kataplexiassa ja voimakkaassa päiväaikaisessa sedaatioissa on toistaiseksi epäselvä. DAT-proteiinia koodaavan geenin suhteen poistogeenisillä hiirillä on kuitenkin havaittu NREM (engl. non-rapid eye movement) -unijaksojen vähentyvän ja vireystilan kasvavan, mikä viittaa dopamiinin osuuteen valvetilan säätelyssä (Wisor ym. 2001). Lisäksi näiden hiirien vireystila ei lisäännä valvetilaa yleensä stimuloivan metamfetamiinin (kuva 6) vaikutuksesta. Narkolepsiaan on liitetty hypokretiinijärjestelmän epätoiminnallisuus (de Lecea ym. 1998; Nishino ym. 2009). Sen patofysiologian tutkimuksessa onkin ollut laajassa käytössä narkoleptiset koirat, joilla on mutaatio hypokretiinin reseptoria 2 koodaavassa hcrr2-geenissä (Mitler ym. 1976; Lin ym. 1999). Näillä koirilla dopamiinin sekä sen metaboliittien pitoisuudet ovat selkäydinnesteessä normaalia alhaisemmat ja D<sub>2</sub>-reseptorien määrä accumbens-, caudate- ja manteliumakkeessa normaalia korkeampi (Bowersox ym. 1987). Lisäksi D<sub>2</sub>-reseptorin agonistin kvinpirolin (kuva 6) annostelu VTA:n alueelle lisää kataplexiataipumusta näillä koirilla (Reid ym. 1996). On siis mahdollista, että nimenomaan presynaptisten D<sub>2</sub>-reseptorien määrä on koholla narkolepsiassa, sillä niiden aktivaation tiedetään vähentävän dopamiinin synteesiä ja vapautumista.



Kuva 6. Kvinpirolin (vasemmalla), metamfetamiinin (keskellä) ja amfetamiinin (oikealla) rakennekaavat. Kvinpirolin rakennekaava on esitetty kaupallisesti saatavana hydrokloridisuolana (Sigma-Aldrich® 2014) ja metamfetamiinin ja amfetamiinin rakennekaavat (DrugBank 4.1) on esitetty vapaan emäksen muodossa. Metamfetamiini eroaa amfetamiinin rakenteesta siten, että sen tyypin (N) on liittynyt metyyliiryhmä (-CH<sub>3</sub>).



## 2.3 Histamiinin ja dopamiinin yhteisvaikutukset keskushermostossa

### 2.3.1 Histaminergisen ja dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän anatominen sijainti aivoissa

Vaikka histaminergisen ja dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän neuroanatomiaa on kartoitettu erikseen laajasti eri lajien muun muassa ihmisen (Gaspar ym. 1989; Airaksinen ym. 1991) ja rotan (Dahlström ja Fuxe 1964; Panula ym. 1984; Watanabe ym. 1984; Panula ym. 1989) aivoista, niiden anatomista sijaintia suhteessa toisiinsa on toistaiseksi tutkittu vähän.

Kaslin ja Panula (2001) tutkivat immunohistokemiallisella värjäyksellä histaminergisen ja dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän neuroanatomista sijaintia seeprakalan (*Danio rerio*) aivoissa. Histamiinia tuottavien hermosolujen ja dopamiinin synteesistä vastuussa olevien TH:ta sisältävien hermosolujen havaittiin olevan lähimpinä toisiaan hypotalamuksen kaudaaliosassa. Sieltä lähtevien, lähes kaikkia aivoalueita hermottavien, histaminergisten hermosäikeiden osoitettiin suuntautuvan hypotalamuksessa TH-solujen läheisyyteen erityisesti vireystilaa säätelevillä mediaalisen preoptisen ja posteriorisen tuberculumin aivoalueilla sekä paraventrikulaarisen tumakkeessa ja sen lähialueilla. Histamiini- ja TH-positiivisten solujen synaptisista yhteyksistä havaittiin viitteitä, mutta varsinaista kolokalisaatiota seeprakalan aivoissa ei osoitettu. Histamiini- ja TH-positiivisten hermosolujen ja säikeiden kolokalisaatiota ei havaittu myöskään rotan sikiön aivojen immunohistokemiallisessa värjäyksessä (Vanhala ym. 1994). Kolokalisaatiolla tarkoitetaan tässä tapauksessa histamiinin ja TH:n sijaintia samassa paikassa esimerkiksi samassa hermosolussa.

Histamiinisäikeet hermottavat kaikkia dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän tärkeimpiä aivoalueita, kuten VTA:ta, mustatumaketta, accumbens-tumaketta ja hajukäämiä (Panula ym. 1989). Histamiinisäikeet hermottavat myös hypotalamuksen valvetilaa sääteleviä osia, missä histamiinin on havaittu lisäävän  $H_1$ -reseptorivälitteisesti dopaminergistä aktiivisuutta muun muassa suprakiasmaattisessa ja paraventrikulaarisessa tumakkeessa (Fleckenstein ym. 1994). Lisätutkimukset histaminergisen ja dopaminergisen her-

movälittäjäainejärjestelmän neuroanomiasta ovat tarpeen, sillä ne auttavat ymmärtämään näiden kahden monoamiinin elimistön fysiologisten toimintojen yhteenlinkittyntä säätelyä. Tämän erikoistyon kokeellisessa osuudessa tutkitaan histaminergisen ja dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän sijaintia suhteessa toisiinsa hiiren aivoissa.

### 2.3.2 Reseptoritason yhteisvaikutukset

*In situ* hybridisaatio -menetelmä on mahdollistanut aivojen dopamiini- ja histamiinireseptorien sijainnin selvittämisen. Tässä kappaleessa keskitytään histamiinin H<sub>3</sub>-reseptoriin, sillä tämän reseptorin linkittymisestä dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän kanssa on toistaiseksi eniten viitteitä (Schlicker ym. 1993; Molina-Hernandez ym. 2000; Ferrada ym. 2008; Ferrada ym. 2009; Moreno ym. 2011; González-Sepúlveda ym. 2013).

Pollard (1993) työryhmineen löysi rotan aivoista H<sub>3</sub>-reseptoreita laajasti muun muassa striatumista ja limbisistä järjestelmästä, joissa dopamiini säätelee esimerkiksi mielihyvää. Myöhemmin Pillot (2002a) kollegoineen kartoitti H<sub>3</sub>-reseptorien sijaintia hiiren aivoissa ja vahvisti edelleen H<sub>3</sub>-reseptorin sijainnin edellämmainituilla aivoalueilla. H<sub>3</sub>-reseptoria koodaavan geenin mRNA:ta on vastikään löydetty laajalti myös VTA:n, mustatumakkeen ja accumbens-tumakkeen dopaminergisistä hermosoluista (González-Sepúlveda ym. 2013). Alun perin Pillot kollegoineen ei havainnut tutkimuksissaan H<sub>3</sub>-reseptoreita VTA:n alueella, minkä arvellaan johtuvan menetelmän epäherkkyydestä. González-Sepúlveda työryhmineen käytti tutkimuksissaan samaa *in situ* koetinta, mutta heillä oli käytössä signaalinvahvistin, joka havaitsi H<sub>3</sub>-reseptorien mRNA:n ekspressiosignaalin herkemmin.

Histamiini on itse H<sub>3</sub>-autoreseptorin aktiivinen agonisti ja vähentää histamiinin vapautumista histamiinisolun hermopäätteestä (Arrang ym. 1983). H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistien, kuten tioperamidin, on puolestaan havaittu lisäävän histamiinin vapautumista synapsirakoon (Schlicker ym. 1993). Kun histamiinia vapautuu synapsirakoon enemmän, dopamiinin vapautuminen hermopäätteestä vähenee. Syyksi on arveltu histamiinin sitoutumista mahdollisiin dopaminergisissä hermopäätteissä sijaitseviin H<sub>3</sub>-heteroreseptoreihin, jotka

säätävät dopamiinin vapautumista. H<sub>3</sub>-reseptorin agonistin immapipin on puolestaan havaittu vähentävän dopamiinin synteesiä ja vapautumista synapsirakoon todennäköisesti myös sitoutumalla suoraan mahdollisiin dopamiinisolun H<sub>3</sub>-heteroreseptoreihin (Molina-Hernandez ym. 2000). Toisaalta tämän teorian mukaan H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistin sitoutuminen suoraan dopaminergisen hermopäätteen H<sub>3</sub>-reseptoreihin lisää dopamiinin vapautumista (Schlicker ym. 1993). Tioperamidin lisäämän histamiinin vapautumisen on havaittu aktivoivan myös GABAergisiä hermosoluja postsynaptisten H<sub>3</sub>-heteroreseptorien välityksellä (Korotkova ym. 2002). GABAergisten hermosolujen aktivaatio puolestaan estää dopamiinin vapautumista hermopäätteistä.

Striatum on osallisena muun muassa mielihyvävasteen ja liikeaktiivisuuden säätelyssä. Se on havaittu myös potentiaalisesti aivoalueeksi histamiinin ja dopamiinin yhteisvaikutuksille. Striatumin hermosoluista suurin osa on GABAergisiä MS-hermosoluja (Gerfen ym. 1990; Le Moine ja Bloch 1995). Nämä hermosolut kuuluvat kahteen eri hermorataan: 1) striatumista globus palliduksen sisäosan kautta mustatumakkeeseen kulkevaan suoraan hermorataan ja 2) striatumista globus palliduksen ulko-osaan kulkevaan epäsuoraan hermorataan. Suoran hermoradan GABAergisen solut sisältävät muun muassa dynorfiinia ja substanssi P:tä, ja niiden solukalvoilla on D<sub>1</sub>-reseptoreita. Epäsuoran hermoradan GABAergiset solut sisältävät puolestaan muun muassa enkefaliineja, ja niiden solukalvoilla on D<sub>2</sub>-reseptoreita. Lisäksi striatumissa on vähäisemmässä määrin GABAergisiä ja kolinergisiä interneuroneita.

Striatumissa on runsaasti myös H<sub>3</sub>-reseptoreita, ja niiden sijainnin on havaittu olevan tällä aivoalueella pääasiallisesti postsynaptinen (Pollard ym. 1993). Näiden postsynaptisten H<sub>3</sub>-reseptorien on osoitettu heterodimerisoituvan striatumin MS-hermosoluissa D<sub>1</sub>- ja D<sub>2</sub>-reseptorien kanssa *in vitro* (Ferrada ym. 2008; Ferrada ym. 2009). H<sub>3</sub>-D<sub>1</sub>-heterodimeerien sijaintia lisäksi aivojen striatumissa tukee myös tutkimus, jossa Moreno (2011) tutkimusryhmineen havaitsi H<sub>3</sub>-reseptorien agonistien stimuloivan MAPK-signaali-*ketjua* (1/2 ERK) striatumin D<sub>1</sub>-reseptoreita, mutta ei D<sub>2</sub>-reseptoreita ilmentävissä soluissa. Lisäksi on havaittu, että sekä D<sub>1</sub>-reseptorin että H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistit kumoaa MAPK-signaali-*ketjun* aktivaation. On siis mahdollista, että histamiini säätlee striatumin suoraa

hermorataa postsynaptisten H<sub>3</sub>-D<sub>1</sub>-heterodimeerien ja epäsuoraa hermorataa H<sub>3</sub>-D<sub>2</sub>-heterodimeerien välityksellä. Näillä hermoradoilla on arveltu olevan tärkeä osuus mielihyvän ja aversion sekä liikeaktiivisuuden solumekanismeissa (Nakanishi ym. 2014).

*In vivo* -tutkimuksissa H<sub>3</sub>-reseptorien farmakologisten ligandien on havaittu muuttavan D<sub>1</sub>- ja D<sub>2</sub>-reseptorien agonistien ja antagonistien vasteita, minkä on arveltu johtuvan muun muassa H<sub>3</sub>-D<sub>1</sub>- ja H<sub>3</sub>-D<sub>2</sub>-heterodimeerien toiminnasta. H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistin tioperamidin esikäsitellyn on muun muassa havaittu lisäävän D<sub>1</sub>-reseptorin agonistin SKF-38393:n ja D<sub>2</sub>-reseptorin agonistin kvinpirolin aiheuttamaa liikeaktiivisuuden kasvua hiirillä, joiden presynaptisen dopamiinin vapautuminen oli estetty VMAT-2:n toimintaa estävällä reserpiinillä (Ferrada ym. 2008). Lisäksi H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistin siproksifaanin on osoitettu muun muassa lisäävän D<sub>2</sub>-reseptorin antagonistin haloperidolin aiheuttamaa striatumin hermosolujen säätelemää liikeaktiivisuuden laskua sekä katalepsiaa (Pillot ym. 2002b). Tämän on arveltu johtuvan H<sub>3</sub>- ja D<sub>2</sub>-reseptorin välittämästä histamiinin ja dopamiinin yhteisvaikutuksesta, joka johtaa liikeaktiivisuutta hillitsevän GABAergisen epäsuoran hermoradan aktiivisuuden lisääntymiseen.

Histaminergisen ja dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän reseptoritason yhteisvaikutukset eivät ole yksiselitteisiä. Esimerkiksi H<sub>3</sub>-, D<sub>1</sub>- ja D<sub>2</sub>-reseptorien alamuotojen jakautuminen eri aivoalueille, affiniteetit eri yhdisteitä kohtaan sekä erilaiset soluvasteet vaikeuttavat farmakologisten ligandien vaikutusten tulkintaa. Lisäksi histamiini- ja dopamiinireseptorien sekä pre- että postsynaptinen sijainti hankaloittaa yhteisvaikutusten tutkimista *in vitro* ja *in vivo* nisäkkäiden aivoissa (Missale ym. 1998; Haas ym. 2008).

### 3 RIIPPUVUUS

Riippuvuus on krooninen tila, jolle on tyypillistä nautintoa tuottavien aineiden tai tapahtumien tavoittelu (engl. drug seeking behavior tai craving), päihteiden kontrolloimaton käyttö sekä negatiivisten tunteiden esimerkiksi ahdistuneisuuden ja ärtyneisyyden kokeminen nautintoa tuottavien aineiden tai tapahtumien vaikutusten loputtua (Koob ja Le Moal 1997). Riippuvuuden kehittymiseen on havaittu liittyvän muutoksia muun muassa

keskushermoston dopaminergisessä, serotonergisessä, GABAergisessä ja glutamatergisessä hermovälittäjäainejärjestelmässä sekä endogeenisessä opioidijärjestelmässä (Koob ja Nestler 1997). Riippuvuuteen on liitetty pysyviä hermosolujen plastisia muutoksia muun muassa accumbens-tumakkeessa.

Tässä kappaleessa keskitytään dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän osuuteen riippuvuudessa. Lisäksi tarkastellaan riippuvuuden nykyisen lääkehoidon eri vaihtoehtoja sekä histaminergiseen hermovälittäjäainejärjestelmään vaikuttavien mahdollisten uusien lääkeaineiden käyttöpotentiaalia riippuvuuden hoidossa.

### 3.1 Dopamiini ja riippuvuus

Dopaminergiseen hermovälittäjäainejärjestelmään kuuluvia ja riippuvuutta aiheuttavien päihteiden mielihyvävaikutukseen liittyviä aivoalueita ovat muun muassa accumbens- ja manteliumake, hippokampus ja isoivokuori (Gardner 2011). VTA:n dopamiinisolujen aktivoituessa dopamiinin vapautuminen lisääntyy näillä aivoalueilla. Aivojen dopamiinijärjestelmään vaikuttavat päihdyttävät aineet tuottavat mielihyvää (engl. reward) ja positiivista vahvistumista (engl. positive reinforcement) joko lisäämällä dopamiinin pitoisuutta synapsiraossa tai vaikuttamalla endogeenisen dopamiinin tasoon (Baik 2013). Dopamiinin vapautumisen lisääntyminen limbisessä järjestelmässä sekä isoivokuorella on liitetty mielihyvää tuottavien aineiden tai tapahtumien vaikutuksien positiiviseen vahvistumiseen (Salamone ym. 2007) sekä näiden aineiden tai tapahtumien tavoittelun motivaation ja motoristen toimintojen säätelyyn (Schultz ym. 2000; Everitt ja Robbins 2005). Ihmisen aivojen kuvantamistutkimukset ovat myös osoittaneet dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän rakennemuutoksia riippuvuudessa. Esimerkiksi D<sub>2</sub>-reseptorien määrä striatumissa on päihderiippuvaisilla normaalia alhaisempi (Volkow 2004).

### 3.2 Lääkehoito

Riippuvuuden lääkehoidon tavoitteena on tukea pidättäytymistä riippuvuuden aiheuttajasta ja estää päihteiden käytön uudelleen aloittaminen (Kreek ym. 2002). Toistaiseksi riippuvuuden hoidossa käytettyjen lääkkeiden teho on kuitenkin hyvin rajallinen. Niiden

pääasiallisena tarkoituksena on lievittää päihdyttävän aineen lopettamista seuraavia vieroitusoireita. Riski päihteiden käytön uudelleen aloittamiselle eli retkahdukselle on kuitenkin olemassa vielä vieroitusoireiden hävittyä, mikä vaikeuttaa riippuvuuden täydellistä paranemista.

### 3.2.1 Nykyinen lääkehoito

Toistaiseksi markkinoilla ei ole lääkeainetta, jonka käyttöindikaationa olisi psykostimulanttien, kuten amfetamiinin (kuva 6) ja kokaiinin, aiheuttaman riippuvuuden hoito. Psykostimulanttien käytön lopettaminen ei aiheuta varsinaisia fyysisiä vieroitusoireita, mutta se voi aiheuttaa anhedoniaa ja dysforiaa, jotka altistavat retkahduksille (Ciccarone 2011). Antidepressanteista muun muassa MAO-estäjiä ja selektiivisesti serotonergistä aktiivisuutta lisääviä lääkkeitä on tutkittu psykostimulanttiriippuvuuden hoidossa (Lima ym. 2003). Nämä lääkkeet voivat lievittää vieroitusoireita, mutta eivät ole kuitenkaan osoittautuneet kovin tehokkaiksi retkahduksien ehkäisyssä. Myös dopaminergistä aktiivisuutta lisääviä lääkkeitä, kuten DAT-proteiinia estävää metyyylifenidaattia on käytetty psykostimulanttiriippuvuuden substituutioterapiana (Mariani ja Levin 2012).

Opioidien väärinkäytön aiheuttaman riippuvuuden hoidossa voidaan käyttää substituutioterapiana  $\mu$ -opioidireseptorin osittaisagonistia buprenorfiinia tai agonistia metadonia (Stotts ym. 2009). Eräs hoitovaihtoehto on myös opioidireseptoreita salpaava naltreksoni ja nalmefeeni, jotka estävät opioidien sitoutumisen vaikutuskohtaansa. Naltreksoni ja nalmefeeni estävät opioidien mielihyvävaikutuksen sekä vähentävät mahdollisesti retkahduksen riskiä. Toisaalta ne voivat aiheuttaa haittavaikutuksenaan dysforiaa. Potilaiden huono hoitomyöntyvyys sekä vajaavainen teho ovatkin osoittautuneet näiden lääkkeiden käytön ongelmiksi.

Alkoholiriippuvuuden lääkehoitona käytetään yleisesti vieroitusoireita lievittäviä bentso-diatsepiineja, jotka voimistavat aivoissa GABA:n vaikutuksia (Lejoyeux ym. 1998). Disulfiraamia voidaan käyttää retkahdusten ehkäisyssä (Garbutt 2009). Se estää irreversiibelisti etanolin metaboliittia asetaldehydiä metaboloivaa aldehydidehydrogenaasia. Mikäli disulfiraamia käyttävä potilas nauttii alkoholia, elimistöön kertyvä asetaldehydi

aiheuttaa pahoinvointisuutta, huimausta ja oksentelua (antabusreaktio). Myös naltreksonia on käytetty alkoholiriippuvuuden hoidossa (Franck ja Jayaram-Lindström 2013), sillä osa alkoholin mielihyvävaikutuksista välittyy elimistön opioidijärjestelmän kautta (Herz 1997). Lisäksi NMDA-glutamaattireseptorin salpaajalla akamprosaatilla on havaittu raittiutta tukeva vaikutus, ja sitä käytetäänkin usein yhdistelmähoitona naltreksonin kanssa (Franck ja Jayaram-Lindström 2013).

### 3.2.2 Histaminergisten yhdisteiden potentiaali riippuvuuden hoidossa

Histamiinisäikeet hermottavat kaikkia riippuvuuden kannalta oleellisia aivoalueita, kuten isoaiivokuorta, dorsaalista striatumia, accumbens-tumaketta, ventraalista tegmentumia ja mustatumaketta (Panula ym. 1989). Lisäksi näillä aivoalueilla on runsaasti histamiinireseptoreita (Pollard ym. 1993; González-Sepúlveda ym. 2013). Histamiini voikin siis mahdollisesti säädellä riippuvuuden kehittymiseen osallistuvien VTA:n ja accumbens-tumakkeen dopaminergisiä hermosoluja.

Histaminergiseen hermovälittäjäainejärjestelmään vaikuttavia potentiaalisia uusia riippuvuuden hoitoon tarkoitettuja lääkeaineita on tutkittu prekliinisissä tutkimuksissa laajasti (Sander ym. 2008). Suurin osa näistä lääkekandidaateista välittää vaikutuksensa H<sub>3</sub>-reseptorin kautta, osittain siksi, että histaminergisen aktiivisuuden lisääminen/vähentäminen postsynaptisten H<sub>1</sub>- ja H<sub>2</sub>-reseptoreiden agonisteilla/antagonisteilla voi aiheuttaa vakavia haittavaikutuksia keskushermoston ulkopuolella (Ligneau ym. 2007a). H<sub>3</sub>-reseptoreita sijaitsee kuitenkin pääasiallisesti vain keskushermostossa (Pollard ym. 1993), joten H<sub>3</sub>-reseptorien antagonistit lienevät vaikutuksiltaan spesifisempiä ja haittavaikutusprofiililtaan turvallisempia. On kuitenkin huomioitava, että H<sub>3</sub>-reseptorivälitteiset soluvasteet liittyvät myös monen muun keskushermoston välittäjäaineen signalointiin (Arrang ym. 1987a; Arrang ym. 1987b; Prast ym. 1994; Schlicker ym. 1994).

H<sub>3</sub>-reseptorien antagonistin siproksifaanin on havaittu vähentävän alkoholin kulutusta DID-mallissa (engl. drinking in the dark) ja kahdenpullon valintatestissä (engl. two-bottle choice test) DBA/2J -kannan hiirillä (Nuutinen ym. 2011a). DID-mallin menetelmä perustuu siihen, että eläimet ovat aktiivisimmillaan pimeään aikaan ja ne kuluttavat alkoholia

eniten vuorokauden aktiivisimman ajan ensimmäisten tuntien aikana (Goldstein ja Kaki-hana 1977). Kahdenpullon valintatestissä eläimet saavat puolestaan vapaasti valita juovatko ne nestettä alkoholia vai vettä sisältävästä juomapullosta tietyllä aikavälillä (Green ja Grahame 2008). Uudemman H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistin JNJ-39220675:n ja naltreksonin on puolestaan havaittu vähentävän alkoholin kulutusta yhtä tehokkaasti kahdenpullon valintatestissä alkoholia preferoivilla (P) rotilla (Galici ym. 2011). Lisäksi H<sub>3</sub>-reseptorin antagonisteista siproksifaanin, JNJ-39220675:n ja JNJ-10181457:n on myös havaittu estävän alkoholin tuottamaa mielihyvää ehdollistetun paikkahakuisuuden kokeessa DBA/2J-kannan hiirillä (Nuutinen ym. 2011b; Vanhanen ym. 2013). On tärkeää huomata, että H<sub>3</sub>-reseptorien antagonistien ei ole osoitettu itsessään aiheuttavan paikkahakuisuutta tai paikka-aversiota (Munzar ym. 2004; Nuutinen ym. 2010), joten kyse on todennäköisesti nimenomaan alkoholin ja H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistien välittämästä yhteisvaikutuksesta.

H<sub>3</sub>-reseptorien antagonistien vaikutusta psykostimulanttien, kuten amfetamiinin ja kokaaiinin mielihyväväikutukseen on myös tutkittu, mutta tutkimustulokset ovat olleet ristiriitaisia (Ellenbroek 2013). Esimerkiksi imidatsolirakenteisen H<sub>3</sub>-antagonistin tioperamidin on havaittu voimistavan kokaiinin vaikutuksia ja aiheuttavan ehdollistettua paikkahakuisuutta eli mielihyvää kokaiiniannoksella, joka ei yksistään annettuna aiheuta paikkahakuisuutta (Brabant ym. 2005). Myöhemmin kuitenkin havaittiin, että tioperamidi estää maksan sytokromi 450 (CYP 450) -entsyymijärjestelmän toimintaa ja siten kokaiinin metaboliaa (Brabant ym. 2009). Myös amfetamiini metaboloituu CYP 450 -entsyymien kautta. Tämä farmakokineettinen yhteisvaikutus selittänee, miksi imidatsolirakenteiset H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistit tioperamidi ja klobenpropit lisäävät amfetamiinin itseannostelua rotilla (Munzar ym. 2004). Toisaalta useiden sekä imidatsolirakenteisten että ei-imidatsolirakenteisten H<sub>3</sub>-antagonistien on havaittu vähentävän metamfetamiinin ja amfetamiinin aiheuttamaa liikeaktiivisuuden kasvua (Fox ym. 2005; Akhtar ym. 2006; Ligneau ym. 2007a). Tulevaisuudessa on tärkeää tutkia tarkemmin ei-imidatsolirakenteisten H<sub>3</sub>-reseptorien antagonistien vaikutuksia psykostimulanttien riippuvuuden kannalta tärkeään mielihyväväikutukseen ja positiiviseen vahvistumiseen. Tämän erikoistyön kokeellisessa osuudessa tutkitaan ei-imidatsolirakenteisen H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistin JNJ-39220675:n vaikutusta amfetamiinin mielihyväväikutukseen.



H<sub>3</sub>-reseptorin käänteisagonisti pitolisantti (Wakix<sup>®</sup>) on ensimmäinen keskushermoston histaminergiseen hermovälittäjäainejärjestelmään vaikuttava lääkeainekandidaatti, joka eteni kliinisiin tutkimuksiin (Schwartz 2011). Paraikaa kliinisissä tutkimuksissa ovat myös muun muassa H<sub>3</sub>-reseptorin käänteisagonistit/antagonistit GSK239512, MK-0249 ja ABT-288. Näiden lääkeainekandidaattien käyttöpotentiaalia on tutkittu lähinnä vireystilaa ja kognitiivisia toimintoja kohentavina yhdisteinä muun muassa narkolepsian ja Alzheimerin taudin hoidossa. Esimerkiksi pitolisantti lisää dopamiinin vapautumista isoaiivokuorella, mutta ei striatumissa (Ligneau ym. 2007a; Ligneau ym. 2007b). Tämä farmakologinen vaikutusprofiili puoltaa sen spesifistä vireystilaa lisäävää ominaisuutta. Pitolisantti vähentää myös metamfetamiinin aiheuttamaa liikeaktiivisuuden lisääntymistä hiirillä, joten sitä voitaisiin tulevaisuudessa mahdollisesti käyttää myös riippuvuuden lääkehoidossa estämään nautintoa tuottavien aineiden tai tapahtumien tavoittelua sekä parantamaan heikentyneitä kognitiivisia toimintoja.

#### 4 YHTEENVETO

Histamiini ja dopamiini ovat keskushermoston välittäjäaineita, jotka säätelevät laajasti elimistön fysiologisia toimintoja, kuten vireystilaa, motivaatiota, muistia sekä mielihyvää (Missale ym. 1998; Haas ym. 2008). Nämä molemmat monoamiinit ovat osallisina myös eri keskushermostosairauksien, kuten Parkinsonin taudin, skitsofrenian ja ADHD:n patofysiologiassa (Kienast ja Heinz 2006; Panula ja Nuutinen 2013).

Immunohistokemiallisten (Watanabe ym. 1983; Panula ym. 1984) ja *in situ* hybridisaatio-menetelmien (Bouthenet ym. 1991; Pillot ym. 2002a) sekä kloonausteknikoiden (Sokoloff ym. 1990; Van Tol ym. 1991; Lovenberg ym. 1999) kehittyminen on mahdollistanut histaminergisen ja dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän neuroanatomian tutkimuksen sekä solu- että reseptoritasolla. Nämä kaksi hermovälittäjäainejärjestelmää sijaitsevat nisäkkään aivoissa useilla samoilla alueilla, kuten VTA:ssa, accumbens-tumakkeessa sekä isoaiivokuorella (Dahlström ja Fuxe 1964; Panula ym. 1989; Ryu ym. 1994). VTA:n dopamiinia syntetisoivien hermosolujen aktivaation ja accumbens-tumakkeen dopamiinin vapautumisen lisääntymisen tärkeä merkitys riippuvuuden mekanismeissa on

tunnettu jo vuosikymmenten ajan (Schultz 1998). Histamiinin on puolestaan havaittu säätelevän aivojen dopaminergistä aktiivisuutta ja tämän vaikutuksen on arveltu olevan pääsääntöisesti estävä (Schlicker ym. 1993; Molina-Hernandez ym. 2000).

Histamiinireseptoreista erityisesti H<sub>3</sub>-reseptoria on tutkittu uutena potentiaalisena lääkevaikutusten kohteena (Sander ym. 2008). Pääasiallisesti keskushermostoon rajoittuva H<sub>3</sub>-reseptori löydettiin rotan aivoista ensimmäisen kerran vuonna 1983 (Arrang ym. 1983). Noin 15 vuotta vuotta myöhemmin kloonattiin ihmisen H<sub>3</sub>-reseptorin cDNA (Lovenberg ym. 1999). H<sub>3</sub>-reseptorin farmakologisten ligandien, lähinnä antagonistien, potentiaalia riippuvuuden hoidossa on tutkittu laajasti prekliinisissä tutkimuksissa (Sander ym. 2008). Tutkimustulokset ovat olleet lupaavia ja H<sub>3</sub>-reseptorien antagonistien käyttömahdollisuuksia riippuvuuden lääkehoidossa tutkitaankin tulevaisuudessa mahdollisesti myös kliinisissä kokeissa.

## KOKEELLINEN OSUUS

### 1 TYÖN TARKOITUS

Tämän erikoistyön kokeellisen osuuden tarkoituksena oli tutkia histaminergisen ja dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän solu- ja reseptoritason yhteisvaikutuksia sisäsiittoisen C57BL/6J -kannan villityypin hiirillä ja pohtia niiden merkitystä riippuvuuden molekulaarisissa mekanismeissa. Histamiinin ja dopamiinin yhteisvaikutukset ovat hyvin monimutkaisia ja vaihtelevat aivoaluekohtaisesti. Tämän vuoksi halusimme tutkia tarkemmin histaminergisen ja dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän neuroanatomiaa sekä dopamiini- ja histamiinireseptorien välisiä yhteisvaikutuksia.

Erikoistyön kokeellisen osuuden kolme päätavoitetta oli:

- 1) Tutkia millä eri mielihyvävaikutuksen ja riippuvuuden kannalta oleellisilla aivoalueilla histamiini- ja dopamiinisoluja sekä hermosäikeitä sijaitsee ja miten nämä kaksi hermovälittäjäainejärjestelmää sijaitsevat suhteessa toisiinsa.
- 2) Selvittää voiko H<sub>3</sub>-reseptorin antagonisti JNJ-39220675 estää amfetamiinin mielihyvää tuottavan ja liikeaktiivisuutta lisäävän vaikutuksen.
- 3) Tutkia voiko JNJ-39220675 välittää vasteensa osittain D<sub>2</sub>-reseptorin kautta selvittämällä onko JNJ-39220675:lla vaikutusta D<sub>2</sub>-reseptorin agonistin kvinpirolin käyttäytymisvasteisiin.

Yksi erikoistyön tavoitteista oli syventää histaminergisen ja dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän neuroanatomian tietämystä selvittämällä niiden sijainti C57BL/6J -kannan hiirien aivoissa immunohistokemiallisella värjäyksellä. Hermovälittäjäainejärjestelmien anatomiaa tutkittiin sekä horisontaalisista että koronaalisista aivoleikkeistä laajemman kolmiulotteisen rakenteen hahmottamiseksi. Erikoistyössä keskityttiin kartoittamaan näiden hermojärjestelmien sijainti ensisijaisesti striatumiin, etuaivojen pohjaosan, hypotalamuksen ja ventraalisen tegmentumin aivoalueilta. Hypoteesina neuroanatomian tutkimuksessa oli, että histaminerginen ja dopaminerginen hermovälittäjäainejärjestelmä

sijaitsee hiiren aivoissa näillä aivoalueilla lähellä toisiaan ja muodostaa mahdollisia synaptisia yhteyksiä.

H<sub>3</sub>-reseptorin merkitystä riippuvuuden mekanismeissa on tutkittu viime vuosina lisääntyvissä määrin. H<sub>3</sub>-reseptorien antagonistien on osoitettu vähentävän alkoholin kulutusta itseannostelun menetelmässä (Galici ym. 2011; Nuutinen ym. 2011a) sekä estävän alkoholin tuottamaa mielihyvää ehdollistetun paikkahakuisuuden kokeessa (Nuutinen ym. 2011b; Vanhanen ym. 2013). H<sub>3</sub>-reseptorien antagonistien merkitystä psykostimulanttien tuottamaan mielihyvävaikutukseen sekä liikeaktiivisuuden lisääntymiseen on myös tutkittu aikaisemmin, mutta tulokset ovat olleet ristiriitaisia (Ellenbroek 2013). Erikoistyön tarkoituksena oli selvittää, voiko ei-imidatsolirakenteinen H<sub>3</sub>-reseptorin antagonisti estää amfetamiinin mielihyvää tuottavan ja liikeaktiivisuutta lisäävän vaikutuksen. Tutkimuksissa käytettiin H<sub>3</sub>-reseptorin neutraalia antagonistia JNJ-39220675:sta (Letavic ym. 2010) ja tutkimusmenetelmänä pavlovilasta ehdollistetun paikkahakuisuuden menetelmää (Cunningham ym. 2006; Nuutinen ym. 2010). Amfetamiini metaboloituu maksan CYP 450 -entsyymijärjestelmän kautta, jota vanhempien H<sub>3</sub>-antagonistien molekyyli-rakenteessa oleva imidatsolirengas voi estää (Yang ym. 2002). Tämän mahdollisen farmakokineettisen yhteisvaikutuksen vuoksi erikoistyön käyttäytymiskokeisiin valittiin ei-imidatsolirakenteinen H<sub>3</sub>-reseptorin antagonisti.

H<sub>3</sub>- ja D<sub>2</sub>-reseptoreita sijaitsee runsaasti basaalisessa etuavossa mielihyvävaikutuksen ja liikeaktiivisuuden säätelyyn osallistuvilla aivoalueilla (Bouthenet ym. 1991; Pillot ym. 2002a). On siis mahdollista, että näiden reseptorien välittämät soluvasteet ovat osallisina mielihyvävaikutuksen synnyssä ja motorisissa toiminnoissa. Tämän vuoksi tutkimme tarkemmin myös D<sub>2</sub>-reseptorin agonistin kvinpirolin ja JNJ-39220675:n yhteisvaikutuksia. Selvitimme ensin ehdollistetun paikkahakuisuuden menetelmällä aiheuttaako kvinpiroli mielihyvää vai aversiota, sillä aikaisemmat tutkimustulokset ovat olleet ristiriitaisia (Hoffman ym. 1988; Beninger ja Ranaldi 1992; Graham ym. 2007; Fish ym. 2014). Tämän jälkeen tutkimme JNJ-39220675:n vaikutusta kvinpirolin aiheuttamaan paikkahakuisuuteen sekä mahdolliseen liikeaktiivisuuden muutokseen. Lisäksi tarkastelimme näiden kahden farmakologisen ligandin yhteisvaikutuksia erillisessä liikeaktiivisuuden tut-

kimuksessa, jossa kvinpirolia annettiin hiirille toistetusti. Rotilla kvinpirolin toistetut annot ovat aiheuttaneet D<sub>2</sub>-reseptorien herkistymistä (Kostrzewa ym. 2004), ja tämän on havaittu olevan yleinen patologinen muutos myös skitsofreniassa sekä pakko-oireisessa häiriössä (engl. obsessive-compulsive disorder, OCD) (Seeman ym. 2006; Ducasse ym. 2014). On siis tärkeää selvittää kvinpirolin toistettujen antojen vaikutus myös C57BL/6J -kannan hiirillä. Tutkimme myös JNJ-39220675:n vaikutuksia toistetusti annetun kvinpirolin käyttäytymisvasteisiin. Tietääksemme histamiinin ja H<sub>3</sub>-reseptorin vaikutuksia OCD:n eläinmallissa ei ole tutkittu aikaisemmin.

## 2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 2.1 Eläimet ja lääkeaineet

Immunohistokemiallisessa värjäyksessä sekä liikeaktiivisuuden ja ehdollistetun paikka-hakuisuuden tutkimuksissa käytetyt hiiret olivat sisäsiittoisen C57BL/6J -kannan villityypin uros- ja naarashiiriä (Harlan Laboratories®, Iso-Britannia). Immunohistokemiallisissa kokeissa käytettiin 10-13-viikkoisia uros- ja naarashiiriä, amfetamiinin käyttäytymiskokeissa 8-10-viikkoisia uroshiiriä ja kvinpirolin käyttäytymiskokeissa 15-26-viikkoisia uros- ja naarashiiriä. Hiiret painoivat 19-40 grammaa. Hiiret pidettiin 2-3 hiiren yksittäin ilmastoiduissa häkeissä, joissa niillä oli vettä ja ruokaa (Scanbur, Ruotsi) vapaasti saatavilla. Eläntilan valorytmi oli 12/12 h. Huoneet olivat valaistaina klo 6.00-18.00 välisenä aikana. Huoneiden lämpötila oli  $20 \pm 1$  °C ja ilmankosteus  $50 \pm 10$  %. Käyttäytymiskokeet suoritettiin klo 7.00-15.00 välisenä aikana. Immunohistokemiallisissa kokeissa käytettiin yhteensä 6 hiirtä ja käyttäytymiskokeissa yhteensä 56 hiirtä. Tutkimuksiin saatiin lupa Etelä-Suomen lääninhallituksen eläinlääkintävirastolta (lupnumero: ESAVI/8515/04.10.07/2013).

Eläinten perfuusiossa terminaalianestesiaan käytettiin 60 mg/ml pentobarbitaaliliuosta (Mebunat Vet<sup>®</sup> -injektioliuos, Orion, Espoo, Suomi) laimennettuna steriilillä fysiologisella keittosuolaliuoksella (0,9 % NaCl) pitoisuuteen 30 mg/ml. Kivun lievitykseen käytettiin 0,3 mg/ml buprenorfiiniliuosta (Temgesic<sup>®</sup> -injektioliuos, Reckitt Benckiser

Healthcare, Dansom Lane, Hull, Iso-Britannia) laimennettuna fysiologisella keittosuolaliuoksella pitoisuuteen 15 µg/ml. Kvinpirolihydrokloridi(-/-) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat), d-amfetamiinisulfaatti (lahjoituksena, professori Esa Korpi, Helsingin yliopisto) ja JNJ-39220675 (Janssen Research & Development, LLC, San Diego, Kalifornia, Yhdysvallat) laimennettiin fysiologisella keittosuolaliuoksella vapaan emäksen pitoisuuksiin: 0,5 mg/kg kvinpiroliä, 2 mg/kg amfetamiinia ja 1 mg/kg tai 10 mg/kg JNJ-39220675:a. Erikoistyössä käytetyt lääkeaineannokset valittiin aikaisempien tutkimusten perusteella (Thanos ym. 2010; Galici ym. 2011; Vanhanen ym. 2013; Fish ym. 2014; Geuzaine ym. 2014) ja uudet lääkeaineliuokset valmistettiin joka päivä. Kaikki lääkeaineliuokset ja fysiologinen keittosuolaliuos annosteltiin injektio-tilavuudessa 0,01 ml/g.

## 2.2 Immunohistokemiallinen värjäys

Erikoistyössä käytettiin pieniä muutoksia lukuunottamatta samaa immunohistokemiallista menetelmää, jota Panula ja Kaslin (2001) käyttivät tutkiessaan histaminergistä ja dopaminergistä hermovälittäjäainejärjestelmää seeprakalan aivoissa. Näiden hermovälittäjäainejärjestelmien sijainnin kartoitus hiiren aivoissa rajattiin koronaalileikkeissä ventromediaaliseen osaan: Bregma (B): +0,9 mm – (-3,6) mm ja horisontaalileikkeissä dorsomediaaliseen osaan: Bregma (B): -2,5 mm – (-5,8) mm.

### 2.2.1 Perfusointi ja aivojen poistaminen

Hiiret nukutettiin yksitellen pentobarbitaalilla (30 mg/kg, i.p.) ja punnittiin. Kivun lievitykseen hiirille annosteltiin buprenorfiinia (0,1 mg/kg, i.p.) heti pentobarbitaali-injektion jälkeen. Anestesian syvyys varmistettiin nipistämällä hiirtä pihdeillä hännästä ja varpaista. Refleksien kadottua hiiri kiinnitettiin selkä alaspäin alustaan. Hiiren rintakehä leikattiin auki saksilla ja rintalasta siirrettiin sivuun sydämen edestä. Perfuusiopumppuun kytketty neula asetettiin sydämen vasempaan kammioon ja sydämen oikeaan eteiseen leikattiin reikä saksilla, jotta veri pääsi valumaan ulos. Perfuusio aloitettiin antamalla 10-20 ml fosfaatilla puskuroitua suolaliuosta (0,1 M PB, pH 7,0) virrata hiiren verenkiertoelimistön läpi paineella 30-35 mmHg. Perfuusiopumpun paine pidettiin samana. Maksan

muututtua vaaleammaksi, fosfaattipuskuriliuos vaihdettiin vastavalmistettuun ja jäällä olevaan 4 % 1-etyyli-3(3-dimetyyliaminopropyyli)karbodi-imidi (EDAC) -fosfaattipuskuriliuokseen (0,1 M PB, pH 7,0). 4 % EDAC -fosfaattipuskuriliuosta käytettiin 80-100 ml yhden hiiren perfuusioon. Perfusioon jälkeen hiiren kallo avattiin ja aivot poistettiin. Kaikki kirurgiset toimenpiteet ja perfuusio suoritettiin vetokaapissa.

### 2.2.2 Aivojen fiksaus ja leikkeiden teko

Aivot siirrettiin perfusoinnin jälkeen välittömästi jälkifiksaatioliuokseen, jossa niitä inkuboitettiin 24 h pimeässä +4 °C -asteessa. Jälkifiksaatioon käytettiin 4 % EDAC -fosfaattipuskuriliuosta (0,1 M PB, pH 7,0). Seuraavana päivänä aivot siirrettiin 20 % sakkaroosifosfaattipuskuriliuokseen (0,1 M PB, pH 7,0), jossa niitä inkuboitettiin 24 h, jälleen pimeässä ja +4 °C -asteessa. Inkuboinnin jälkeen aivot jäädytettiin vetokaapissa kuivajään päällä. Jäädytetyt aivot säilytettiin -80 °C -asteessa, josta ne otettiin -20 °C -asteeseen noin tunti ennen jatkokäsittelyä. Jäädytetyt aivot kiinnitettiin alustaansa kiinnitysaineen (Shandon™ M-1 Embedding Matrix, Thermo Scientific, Yhdysvallat) avulla ja aivoista leikatettiin 25 µm koronaali- ja horisontaalileikkeitä Leica CM3050 -kryostaatilla. Kryostaatin kammion lämpötila oli leikkaushetkellä -20 – -24 °C ja näytteenpitimen lämpötila oli vastaavasti -17 – -20 °C. Leikkeet kiinnitettiin mikroskooppilaseille (Superfrost™ Plus Microscope slides, Thermo Scientific, Yhdysvallat) 10 leikkeen sarjoissa. Leikkeet säilytettiin pimeässä -20 °C -asteessa.

### 2.2.3 Värjäykset, pesut ja inkubaatiot

Leikkeet otettiin sulamaan -20 °C -asteesta huoneenlämpöön noin 15 minuuttia ennen värjäyksen aloittamista. Mikroskooppilasit pestiin kaksi kertaa 5-10 minuutin ajan fosfaattipuskurilla (PBS-T), joka sisälsi 0,1 % TritonX-100 (T) -detergenttiä (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat). Pesujen jälkeen mikroskooppilasit asetettiin vedellä kostutettujen vaahtomuovipalojen päälle ja niiden päälle pipetoitiin 2 % vuohen normaaliiserumia PBS-T-puskuriliuoksessa (400 µl/mikroskooppilasi). Leikkeitä inkuboitettiin blokkausliuoksen kanssa 20 minuuttia huoneenlämmössä.

Blokkauksen jälkeen jokaisen mikroskooppilasin päälle pipetoitiin 400 µl primaarivasta-aineliuosta. Primaarivasta-aineina käytettiin kaniinissa tuotettua anti-HA-19C (Panula ym. 1984) sekä hiiressä tuotettua anti-TH (Immunostar, Hudson, Yhdysvallat) vasta-aineita PBS-T-puskuriliuoksessa, joka sisälsi myös 2 % vuohen normaalisserumia. Käytetyt vasta-ainekonsentraatiot olivat 1:10 000 anti-HA ja 1:1000 anti-TH. Leikkeitä inkuboitiin primaarivasta-aineliuoksen kanssa 48 h +4 °C -asteessa ja valolta suojattuna.

Mikroskooppilaseja pestiin kolme kertaa PBS-T-puskuriliuoksella (5 minuuttia + 2 x 15 minuuttia) ennen sekundaarivasta-ainekäsittelyä. Tämän jälkeen ne asetettiin kostutetuille vaahtomuovipaloille ja kunkin niistä päälle pipetoitiin 400 µl sekundaarivasta-aineliuosta. Sekundaarivasta-aineina käytettiin vuohessa tuotettuja korkeasti ristiinabsorboituja (\*) Alexa fluorofori-488-konjugoitua anti-hiiri IgG (GAM488\*) ja Alexa fluorofori-568-konjugoitua anti-kaniini IgG (GAR568\*) vasta-aineita (Life Technologies, Carlsbad, Yhdysvallat). Kumpikin vasta-aine laimennettiin pitoisuuteen 1:1000 PBS-T-puskuriliuoksella. Sekundaarivasta-aineliuos sisälsi myös 2 % vuohen normaalisserumia. Leikkeitä inkuboitiin sekundaarivasta-aineilla 24 h +4 °C -asteessa ja valolta suojattuna. Inkuboinnin jälkeen mikroskooppilaseja pestiin kerran 5 minuuttia PBS-T-puskuriliuoksella ja kaksi kertaa 15 minuuttia fosfaattipuskuriliuoksella (PBS), joka ei sisältänyt TritonX-100 (T) -detergenttiä. Tämän jälkeen mikroskooppilasien päälle pipetoitiin 100 µl 50 % glyseroli-fosfaattipuskuriliuosta (PBS) ja leikkeiden päälle asetettiin peitinlasit (24 x 60 mm) suojaksi. Mikroskooppilasit säilytettiin pimeässä ja +4 °C -asteessa ennen leikkeiden kuvausta.

#### 2.2.4 Kontrollivärjäykset ja vasta-aineiden ristireaktiivisuus

Kontrollivärjäykset sekä vasta-aineiden ristireaktiivisuuden tutkiminen suoritettiin samalla, kappaleessa 2.2.3 (Värjäykset, pesut ja inkubaatiot) kuvatulla, menetelmällä. Kontrollivärjäyksissä käytimme vain joko primaarivasta-aineita tai sekundaarivasta-aineita. Vasta-aineiden ristireaktiivisuutta tutkittiin puolestaan inkuboimalla leikkeitä joko primaarisen kaniinissa tuotetun anti-HA vasta-aineen sekä sekundaarisen vuohessa tuotetun GAM488\* vasta-aineen kanssa tai primaarisen hiiressä tuotetun anti-TH vasta-aineen sekä sekundaarisen vuohessa tuotetun GAR568\* vasta-aineen kanssa. Kontrollivärjäykseen ja ristireaktiivisuuden tutkimiseen valittiin leikkeet, joissa TH:ta ja histamiinia

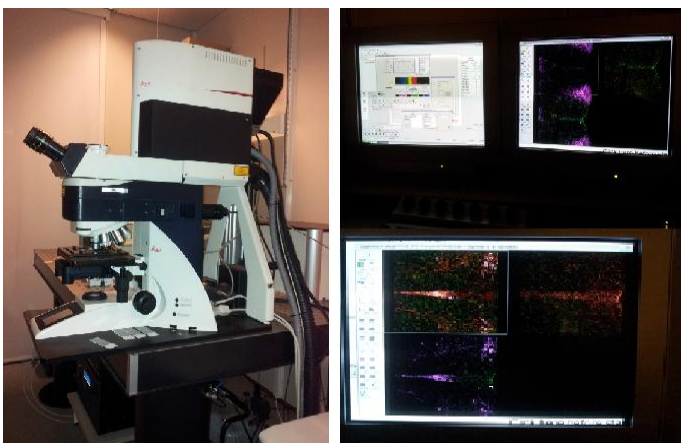


sisältävät hermosolut ja hermosäikeet ovat havaittavissa kappaleessa 2.2.3 kuvatuilla vasta-ainekäsittelyillä.

### 2.2.5 Leikkeiden kuvantaminen konfokaalimikroskoopilla

Immunohistokemiallisesti värjätyt näytteet tutkittiin Leica-TCS-SP2 konfokaalimikroskoopilla (Leica microsystems, Heidelberg, Saksa) (Kuva 7). Näytteiden skannaukseen käytettiin kahta argon-kryptonlaseria (Melles Griot, Carlsbad, Yhdysvallat). Toisen argon-kryptonlaserin viritysaallonpituutena käytettiin 488 nm (GAM488\* detektointi) ja toisen viritysaallonpituudeksi määritettiin 568 nm (GAR568\* detektointi). Näytteiden emittoiman säteilyn tarkasteluikkunoiksi määriteltiin 500 - 550 nm ja 600 - 650 nm. Skannaustavaksi valittiin peräkkäinen skannaus, jolloin laserit vuorottelivat näytettä skannaessaan.

Kuvien muodostamiseen käytettiin Leica SP2WSPlus -ohjelmaa (Kuva 7). Yleisin käytössä ollut algoritmi oli maksimaalinen projektiokuva, jossa jokaisen skannatun fokustason intensiteetti on asetettu maksimiarvoonsa. Erikoistyössä esitetyissä kuvissa on joko yksi tai useampi fokustaso. Kuvien muokkaukseen ja tarkempaan analysointiin käytettiin Corel Draw X5 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) sekä Leica LAS AF Lite (Leica microsystems, Heidelberg, Saksa) kuvankäsittelyohjelmia.



Kuva 7. Immunohistokemiallisesti värjätyt näytteet tutkittiin Leica-TCS-SP2 konfokaalimikroskoopilla ja kuvien muodostuksessa käytettiin Leica SP2WSPlus -ohjelmaa.

## 2.3 Ehdollistetun paikkahakuisuuden tutkimus

Ehdollistetun paikkahakuisuuden kokeet suoritettiin aiemmin kuvattua menetelmää mukailten (Cunningham ym. 2006; Nuutinen ym. 2010). Erikoistyössä käytetyssä menetelmässä hiirille luotiin kaksi erilaista ehdollistamisympäristöä käyttämällä tutkimuslaatikon (42 x 26 x 15 cm) lattiamateriaalina joko metalli- tai muovimattoa. Paikkahakuisuutta voidaan pitää luotettavana mielihyvövaikutuksen mittarina, mikäli eläimillä ei ole luontaista mieltymystä kumpaankaan ehdollistamisympäristöön. Hiiret eivät ole osoittaneet aikaisemmissa tutkimuksissa spontaania mieltymystä kumpaakaan erikoistyössä käytettyä lattiamateriaalia kohtaan (Nuutinen ym. 2010), joten ehdollistamisympäristöt ovat itsessään neutraaleja.

Ehdollistettu paikkahakuisuus perustuu siihen, että eläin yhdistää mielihyvää tai aversiota tuottavan ärsykkeen (esimerkiksi lääkeaineen) tiettyyn ehdollistamisympäristöön. Mikäli eläin liittyy tietyn lattiamateriaalin mielihyvään, se hakeutuu siihen osaan tutkimuslaatikkoa, jossa on kyseinen lattiamateriaali. Mikäli eläin puolestaan liittyy tietyn lattiamateriaalin aversiiviseen ärsykkeeseen, se välttää menemistä sille puolelle tutkimuslaatikkoa, jossa on kyseinen lattiamateriaali.

Tutkimusasetelmassa lääkeainekäsittelyt tasapainotettiin niin, että puolet hiiristä ehdollistettiin metallimatolle ja puolet muovimatolle. Lisäksi eläimet, lääkeainekäsittelyn ajankohta sekä lattiamateriaalien järjestys satunnaistettiin. Hiiret tuotiin laboratorion käyttäytymistilaan 30 minuuttia ennen kokeen aloitusta ja kaikki injektiot annettiin eläimille vatsaontelonsisäisesti (i.p.). Kokeissa käytettiin hiirien liikeaktiivisuuden mittaamiseen videokameraa sekä Ethovision Color-Pro 3.0-ohjelmaa (Noldus Information Technology, Wageningen, Alankomaat).

### 2.3.1 H<sub>3</sub>-reseptorin antagonisti ja amfetamiini

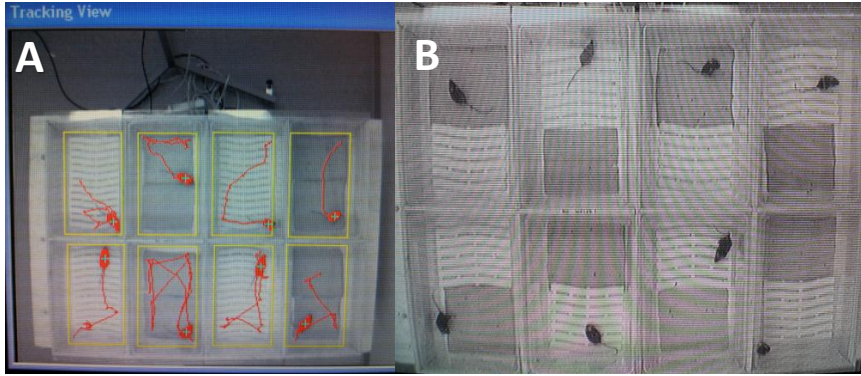
H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistin JNJ-39220675:en ja amfetamiinin ehdollistetun paikkahakuisuuden kokeessa käytettiin 10 päivää kestävästä ehdollistamismenetelmästä (Taulukko 1). Kokeessa käytetyt uroshiiret olivat kokeen alkamisen aikana 8-viikkoisia. Hiiret jaettiin

kolmeen ryhmään niille toistetuksi annettujen lääkeainekäsittelyjen mukaan: keittosuolaliuos - amfetamiini 2mg/kg (n=11), JNJ-39220675 1 mg/kg - amfetamiini 2mg/kg (n=14) ja JNJ-39220675 10 mg/kg - amfetamiini 2mg/kg (n=14).

Tutkimuksen ensimmäisenä päivänä hiiret totutettiin tutkimuslaatikkoon. Eläimet punnittiin ja niille annettiin esikäsittelyä keittosuolainjektiot. Toiset keittosuolainjektiot annettiin 30 minuutin kuluttua esikäsittelystä. Tämän jälkeen eläimet asetettiin tyhjiin tutkimuslaatikkoon. Hiirien liikeaktiivisuutta mitattiin 30 minuutin ajan. Päivinä 2-9 hiiret ehdollistettiin tietylle lattiamateriaalille ja viimeisenä päivänä suoritettiin varsinainen paikkahakuisuuskoee.

Taulukko 1. JNJ-39220675:n ja amfetamiinin paikkahakuisuusmenetelmän kuvaus. JNJ-39220675 (1 mg/kg ja 10mg/kg) tai keittosuolaliuos esikäsittely annosteltiin (i.p.) 30 minuuttia ennen amfetamiinikäsittelyä (2 mg/kg). Totuttamispäivänä ja paikkahakuisuuskoekessa hiirille annettiin esikäsittelyinä keittosuolainjektiot (i.p.) 30 minuuttia ennen varsinaista käsittelyä. Puolet hiiristä ehdollistettiin metallimatolla (metalliryhmä) ja puolet muovimatolla (muoviryhmä).

Päivä		Aika (min)	METALLIRYHMÄ		MUOVIRYHMÄ	
			Lattia- materiaali	Käsittely (i.p.)	Lattia- materiaali	Käsittely (i.p.)
1.	Totuttaminen	30	ei mitään	keittosuolaliuos	ei mitään	keittosuolaliuos
2.	Ehdollistaminen	30	metalli	amfetamiini	muovi	amfetamiini
3.	Ehdollistaminen	30	muovi	keittosuolaliuos	metalli	keittosuolaliuos
4.	Ehdollistaminen	30	metalli	amfetamiini	muovi	amfetamiini
5.	Ehdollistaminen	30	muovi	keittosuolaliuos	metalli	keittosuolaliuos
6.	Ehdollistaminen	30	metalli	amfetamiini	muovi	amfetamiini
7.	Ehdollistaminen	30	muovi	keittosuolaliuos	metalli	keittosuolaliuos
8.	Ehdollistaminen	30	metalli	amfetamiini	muovi	amfetamiini
9.	Ehdollistaminen	30	muovi	keittosuolaliuos	metalli	keittosuolaliuos
10.	Paikkahakuisuus	30	½ metallia, ½ muovia	keittosuolaliuos	½ muovia, ½ metallia	keittosuolaliuos



Kuva 8. JNJ-39220675:n ja amfetamiinin paikkahakuisuuskoetta C57BL/6J -kannan hiirillä. Ehdollistamisvaiheessa (A) kukin hiiri sai joka toinen päivä lääkeainekäsittelyn tietyn lattiamateriaalin (muovi- tai metallimaton) päällä ja joka toinen päivä kullekin hiirelle annettiin keittosuolainjektiot toisen lattiamateriaalin (muovi- tai metallimaton) päällä. Varsinaisessa paikkahakuisuuskoeteossa (B) tutkimuslaatikon pohjasta puolet oli peitetty metallimatolla ja puolet muovimatolla. Hiirien liikeaktiivisuutta mitattiin 30 minuuttia ehdollistamisvaiheen amfetamiinin (2 mg/kg, i.p.) ja paikkahakuisuuskoeteon keittosuolaliuoksen (i.p.) annon jälkeen videokameran ja Ethovision Color-Pro 3.0-ohjelman avulla.

Ehdollistamisvaihe kesti yhteensä 8 päivää. Ehdollistamiset ja paikkahakuisuuskoetta suoritettiin klo 7.30-14.00 välisenä aikana. Joka toinen päivä kukin hiiri sai lääkeainekäsittelyn tietyn lattiamateriaalin päällä ja joka toinen päivä kullekin hiirelle annettiin keittosuolainjektiot toisen lattiamateriaalin päällä (Kuva 8A). Hiiret saivat esikäsittelyinä JNJ-39220675 (1 mg/kg tai 10 mg/kg) tai keittosuolaliuosinjektiot 30 minuuttia ennen amfetamiini-injektioita (2 mg/kg) Amfetamiini-injektioiden jälkeen hiiret asetettiin tutkimuslaatikkoon tietyn lattiamateriaalin päälle ja niiden liikeaktiivisuutta mitattiin 30 minuutin ajan. Jokaisen ehdollistamiskerran välissä tutkimuslaatikon pohjalle asetettiin puhtaat lattiamateriaalit.

Paikkahakuisuuskoetta suoritettiin viimeisen ehdollistamispäivän jälkeisenä päivänä, 24 tuntia viimeisen ehdollistamiskerran jälkeen. Hiiret punnittiin ja niille annettiin esikäsittelyinä keittosuolaliuosta 30 minuuttia ennen koeteon alkua. Juuri ennen tutkimuslaatikkoon asettamista hiirille annettiin toiset keittosuolainjektiot. Tutkimuslaatikon pohjasta puolet oli peitetty metallimatolla ja puolet muovimatolla (Kuva 8B). Lattiamateriaalien sijainti (oikea/vasen) satunnaistettiin. Aikaa, jonka eläimet viettivät lattiamateriaalin päällä, mitattiin 30 minuutin ajan. Metallimaton päällä vietettyä aikaa käytettiin pääasiassa muuttujana tulosten analysoinnissa.

### 2.3.2 H<sub>3</sub>-reseptorin antagonisti ja D<sub>2</sub>-reseptorin agonisti

H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistin JNJ-39220675:n ja D<sub>2</sub>-reseptorin agonistin kvinpirolin ehdollistetun paikkahakuisuuden kokeessa käytettiin viisi päivää kestävää ehdollistamismenetelmää. Tutkimuksessa käytetyt uros- ja naarashiiret olivat kokeen alussa 22-viikkoisia. Ehdollistaminen suoritettiin neljän ensimmäisen päivän aikana niin, että jokainen hiiri sai sekä lääkeainekäsittelyn että keittosuolaliuosinjektiot kahdessa eri ehdollistamissessiossa joko aamulla tai iltapäivällä. Aamun ehdollistamiset suoritettiin klo 7.30-8.30 välisenä aikana ja iltapäivän ehdollistamiset klo 13.30-14.30 välisenä aikana. Puolet hiiristä sai lääkeainekäsittelyn aamulla ja puolet iltapäivällä. Lisäksi puolet hiiristä sai lääkeainekäsittelyn metallimatolla (n=4) ja puolet muovimatolla (n=4).

Eläimet punnittiin ja niille annettiin JNJ-39220675 (10 mg/kg) tai keittosuolaliuosinjektiot esikäsittelyä 30 minuuttia ennen ehdollistamiskokeen alkua. Ne hiiret, jotka saivat esikäsittelyä JNJ-39220675:sta, saivat varsinaisena käsittelyä kvinpirolia (0,5 mg/kg). Ne hiiret, jotka saivat esikäsittelyä keittosuolainjektiot, saivat varsinaisena käsittelyä toisen keittosuolainjektion. Tämän jälkeen hiiret asetettiin tutkimuslaatikkoon joko metalli- tai muovimatolle. Hiirien liikeaktiivisuutta mitattiin jokaisessa ehdollistamissessiossa 30 minuutin ajan.

Varsinainen paikkahakuisuuskoe suoritettiin ehdollistamiskokeen viidentenä päivänä klo 7.30-9.00 välisenä aikana. Eläimet punnittiin 30 minuuttia ennen kokeen alkua. Kaikille hiirille annettiin varsinaisena käsittelyä keittosuolaliuosinjektiot. Tämän jälkeen hiiret asetettiin tutkimuslaatikkoon, jonka pohjasta puolet oli metallimaton ja puolet muovimaton peitossa. Paikkahakuisuuskokeen aikana mitattiin aikaa, jonka hiiret viettivät kummankin lattiamateriaalin päällä 30 minuutin aikana.

Ennen JNJ-39220675:en ja kvinpirolin paikkahakuisuuden koetta suoritettiin ehdollistetun paikkahakuisuuden koe, jossa 25-viikkoiset uros- ja naarashiiret saivat lääkeainekäsittelyä pelkästään kvinpirolia (0,5 mg/kg). Tässä tutkimuksessa käytettiin samaa yllä-

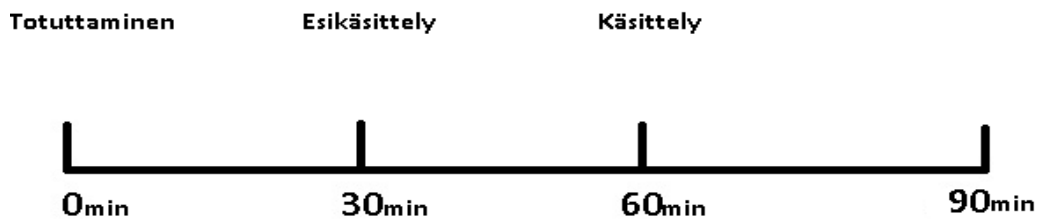
kuvattua viisi päivää kestävää ehdollistamismenetelmää, mutta eläimille ei annettu esikäsitteilyä. Tämän kokeen hiiret toimivat kontrolleina JNJ-39220675:n ja kvinpirolin ehdollistetun paikkahakuisuuden kokeessa.

#### 2.4 Liikeaktiivisuuden tutkimus

JNJ-39220675:en vaikutusta kvinpirolin aiheuttamaan liikeaktiivisuuden muutokseen tutkittiin viisi päivää kestävässä liikeaktiivisuuskokeessa. Kokeessa käytettiin samoja hiiriä, joita käytettiin JNJ-39220675:n ja amfetamiinin ehdollistetun paikkahakuisuuden kokeessa. Näiden kahden kokeen välinen aika oli 6 viikkoa.

Hiiret tuotiin laboratorion käyttäytymistilaan jokaisena päivänä 15 minuuttia ennen kokeen alkua, ne punnittiin ja niille annettiin joko lääkeainekäsittely tai keittosuolaliuosinjektiot (i.p.). Hiiret jaettiin kolmeen ryhmään niille toistetusti annettujen injektioiden mukaan: keittosuolaliuos - keittosuolaliuos (n=9), keittosuolaliuos - kvinpiroli 0,5 mg/kg (n=11) ja JNJ-39220675 10 mg/kg - kvinpiroli 0,5 mg/kg (n=12). Liikeaktiivisuutta mitattiin vain kokeen ensimmäisenä ja viidentenä päivänä. Päivinä 2-4 hiiret palautettiin takaisin kotihäkkeihinsä käsittelyjen välissä (30 min) sekä injektioiden annon jälkeen. Liikeaktiivisuuden mittaaminen suoritettiin klo 7.00-15.30 välisenä aikana ja päivien 2-4 injektiot annettiin klo 9.30-11.00 välisenä aikana.

Liikeaktiivisuuskokeen ensimmäisenä ja viidentenä päivänä hiiret laitettiin punnitsemisen jälkeen muovisiin tutkimuslaatikoihin. Niiden annettiin tottua laatikkoon 30 minuutin ajan (kuva 9). Esikäsitteilynä hiirille annettiin joko JNJ-39220675 (10 mg/kg) tai keittosuolainjektiot, jonka jälkeen hiiret laitettiin uudestaan tutkimuslaatikkoon 30 minuutiksi. Toisena injektiona hiiret saivat joko kvinpirolia (0,5 mg/kg) tai keittosuolaliuosta, jonka jälkeen ne palautettiin tutkimuslaatikkoon vielä 30 minuutiksi. Jokaisen hiiren liikeaktiivisuutta mitattiin videokameran ja Ethovision Color-Pro-ohjelman avulla yhteensä 90 minuuttia.



Kuva 9. Liikeaktiivisuuskokeen aikajana.

## 2.5 Tilastolliset menetelmät

Käyttäytymiskokeiden tulokset analysoitiin GraphPad Prism 4 -ohjelman (GraphPad Software, San Diego, Yhdysvallat) tilastollisten testien avulla. Tilastollisina testeinä käytettiin yksi- tai kaksisuuntaista varianssianalyysiä. Jatkotesteinä käytettiin Tukeyn ja Bonferronin testejä. Tilastollisen merkitsevyyden raja-arvona käytimme p-arvoa 0,05.

## 3 TULOKSET

### 3.1 Immunohistokemiallinen värjäys

Histaminergisen ja dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän sijainti suhteessa toisiinsa esitetään 10 - 13 -viikkoisten C57BL/6J -kannan villityypin uros- ja naarashiirien aivojen koronaali- ja horisontaalileikkeissä. Erikoistyössä esitetyt kuvat ovat otettu striatumiin, etuaivojen pohjaosan, hypotalamuksen ja keskiaivojen alueilta. Alla esitetyt kuvakokoelmat (koronaalileikkeet: kuvat 10, 11 ja 14; horisontaalileikkeet: kuvat 12 ja 18) koostettiin 10-kertaiseksi suurentavalla objektiivilla kuvatuista kaikkien fokustasojen maksimaalisen projektion kuvista (engl. maximum projection, overlay). Kuvakokoelman kuvat valittiin vertailemalla kolmen yksilön saman Bregman alueen koronaali- (n=3) tai horisontaalileikkeistä (n=3) otettuja kuvia toisiinsa ja valitsemalla niistä keskivertokuvat. Tämän lisäksi tuloksissa esitetään 20- ja 40-kertaiseksi suurentavalla objektiivilla kuvattuja yhden ja useamman fokustason sisältäviä maksimaalisia projektiokuvia samoilta ai-voalueilta (kuvat: 13, 15, 16, 17 ja 19). PMT (engl. photomultiplier tube) intensiteetti on

kaikissa kuvissa 450 - 650. Kuvakokoelmien sagitaalinen rakennekuva, joka osoittaa leikkeen sijainnin hiiren aivoissa (pystysuoran ja vaakasuoran viivan leikkauskohta), on piirretty Paint -ohjelmalla (Microsoft, Redmond, Yhdysvallat) Franklinin ja Paxinoksen (1997) hiiren aivoatlasta apuna käyttäen. Kontrollinäytteet osoittivat, että vasta-aineet ovat spesifisiä histamiinille ja TH:lle eikä niillä esiintynyt ristireaktiivisuutta toisiaan kohtaan. Kuvissa esiintyvät lyhenteet on koottu taulukkoon 2.

Taulukko 2. Kuvissa esiintyvät aivoalueiden lyhenteet (Franklin ja Paxinos 1997).

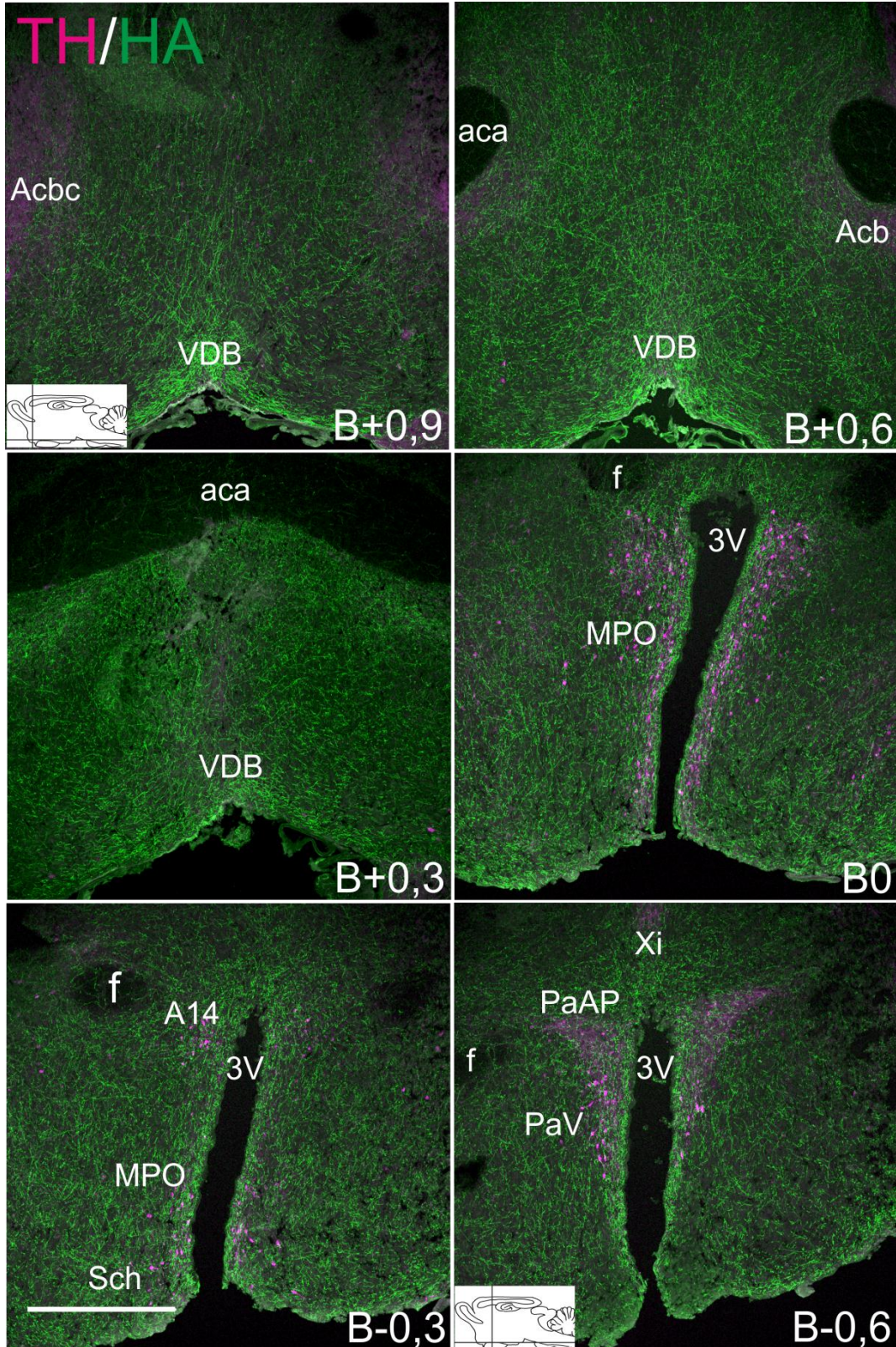
<b>3V = third ventricle</b>	<b>PaLM = paraventral hypothalamic lateral magnocell</b>
<b>aca = anterior commissure, anterior</b>	<b>PaMM = paraventral hypothalamic nucleus, medial</b>
<b>Acbc = accumbens nucleus, core</b>	<b>PaV = paraventral hypothalamic nucleus, ventral</b>
<b>Acb = accumbens nucleus</b>	<b>PH = posterior hypothalamic area</b>
<b>A14 = A14 dopamine cells</b>	<b>pm = principle mammillary tract</b>
<b>Arc = arcuate nucleus</b>	<b>PMV = ventral premammillary nucleus</b>
<b>bp = brachium pontis</b>	<b>RLi = rostral linear raphe nucleus</b>
<b>DM = dorsomedial hypothalamic area</b>	<b>Sch = suprachiasmatic nucleus</b>
<b>DTM = dorsal tuberomammillary nucleus</b>	<b>SNC = substantia nigra, compact</b>
<b>f = fornix</b>	<b>SNR = substantia nigra, reticular</b>
<b>fr = fasciculus retroflexus</b>	<b>SuM = supramammillary nucleus</b>
<b>IPR = interpeduncular nucleus, rostral</b>	<b>TMdm = tuberomammillary nucleus, dorsomedial</b>
<b>LH = lateral hypothalamus</b>	<b>TMN = tuberomammillary nucleus</b>
<b>MM = med mammillary nucleus, medial</b>	<b>VDB = nucleus vertical limb diagonal band</b>
<b>MP = med mammillary nucleus, posterior</b>	<b>VPAG = ventral periaqueductal gray</b>
<b>MPO = med preoptic nucleus</b>	<b>VTA = ventral tegmental area</b>
<b>MRe = mammillary recess of third ventricle</b>	<b>VTM = ventral tuberomammillary nucleus</b>
<b>mt = mamillothalamic tract</b>	<b>Xi = xiphoid thalamic nucleus</b>
<b>mtg = mamillo tegmental tract</b>	<b>ZI = zona incerta</b>
<b>ns = nigrostriatal bundle</b>	
<b>Pa = paraventral hypothalamic area</b>	
<b>PaAP = paraventral hypothalamic anterior parvicell</b>	



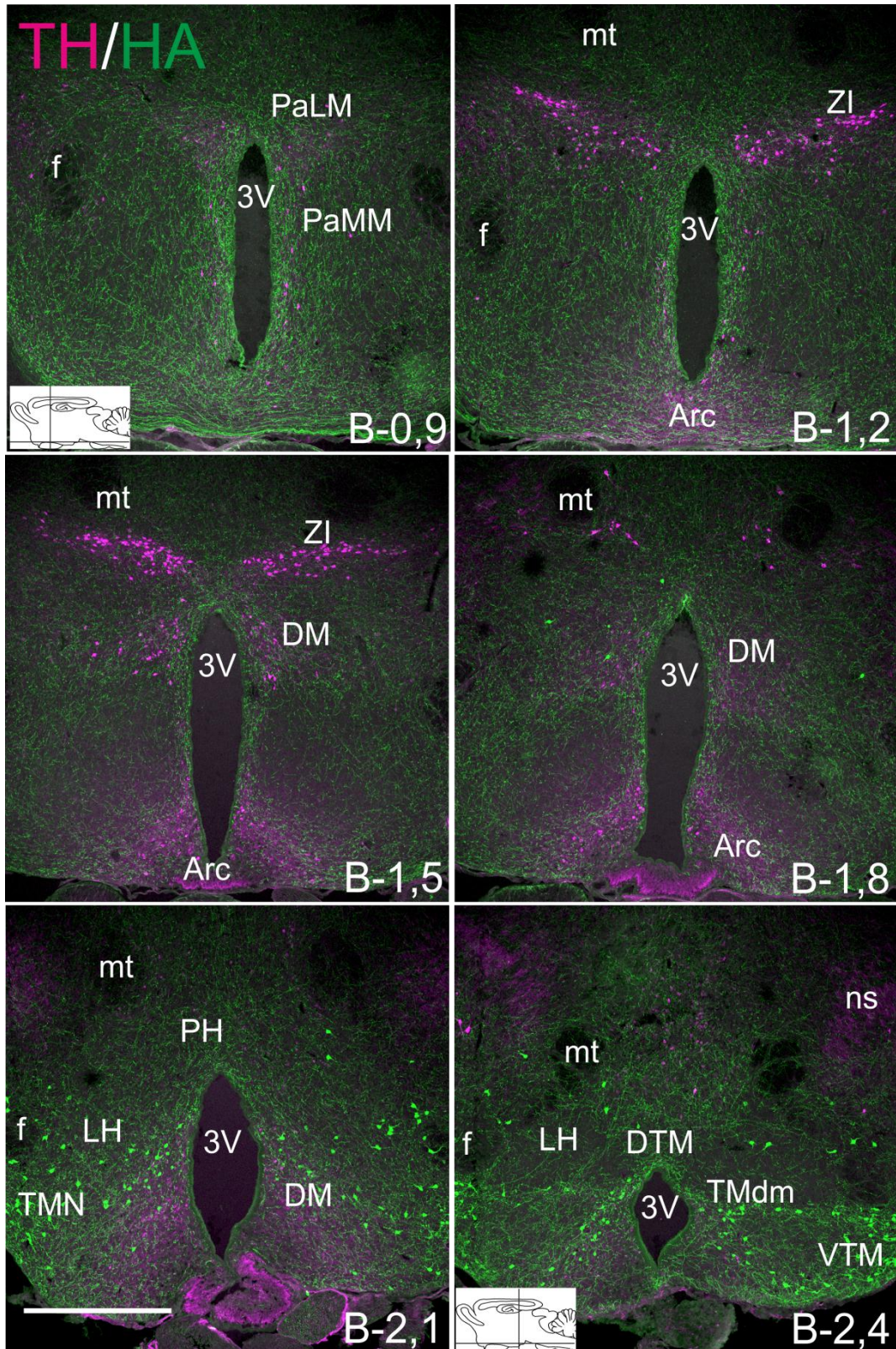
### 3.1.1 Striatum, etuaivojen pohjaosa ja hypotalamus

Mesolimbisen dopamiiniradan päätepisteenä olevassa accumbens-tumakkeessa on nähtävissä sekä dopaminergistä että histaminergistä hermotusta (kuva 10: B+0,9 ja B+0,6). Histaminergisiä hermosäikeitä on ventraalisessa striatumissa sekä muuallakin etuaivojen pohjaosassa kauttaaltaan. Histaminerginen hermotus on kuitenkin erityisen tiheää ventraalisen diagonaalisen hermokimpun alueella (VDB) (kuva 10: B+0,9; B+0,6 ja B+0,3) sekä aivan anterior commissure -hermokimpun (aca) alapuolella (kuva 10: B+0,3).

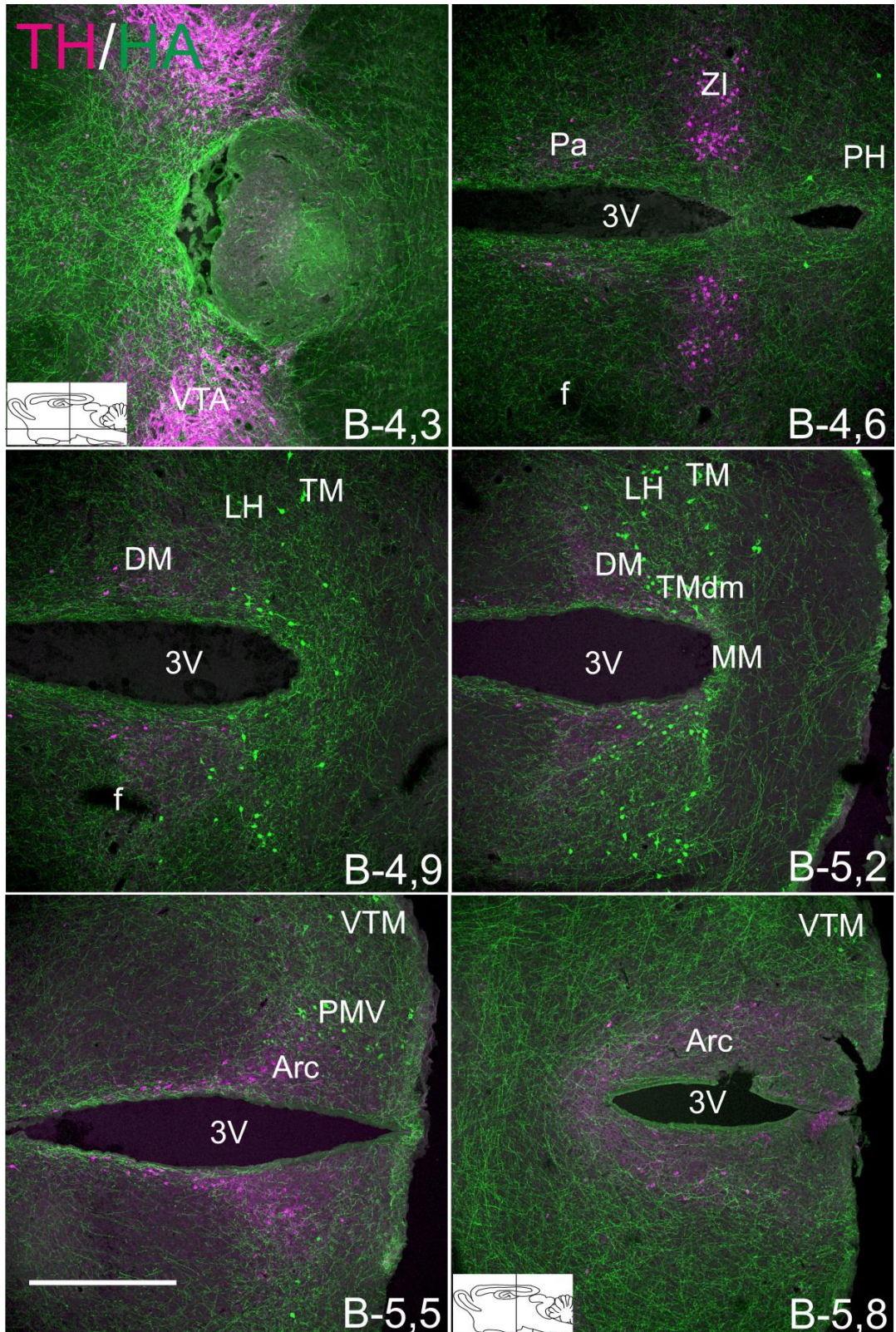
Anteriorisessa hypotalamuksessa dopaminergisiä hermosoluja ja hermosäikeitä sijaitsee kolmannen ventrikkelin (3V) ympärillä olevalla mediaanisella preoptisella alueella (MPO) (kuva 10: B0), suprakiasmaattisessa tumakkeessa (Sch) (kuva 10: B-0,3), anteriorisessa-, ventraalisessa- (kuva 10: B-0,6), lateraalissa ja mediaalisessa (kuva 11: B-0,9) paraventrikulaarisessa hypotalamisessa tumakkeessa sekä zona incertan (ZI) aivoalueella (kuva 11: B-1,2; kuva 12: B-4,6). Talamuksen alapuolelle sijoittuva ZI jatkuu posteriorisen hypotalamuksen alueelle. Kaikilla näillä aivoalueella on nähtävissä myös voimakas histaminerginen hermotus. Histaminergisiä hermosäikeitä on runsaasti muun muassa MPO:n (kuva 10: B0), hypotalamisten tumakkeiden (kuva 10: B-0,6 ja kuva 11: B-0,9) ja ZI:n (kuva: 11: B-1,2; kuva 12: B-4,6) dopamiinisolujen läheisyydessä.



Kuva 10. Histaminergisiä (HA, vihreä) hermosäikeitä ja tyrosiinihydroksylaasia (TH, magenta) sisältäviä dopamiinisoluja ja hermosäikeitä hiiren koronaalisissa aivoleikkeissä (Bregma (B): +0,9 mm – (-0,6 mm)) (kts. lyhenteet taulukko 2). Maksimaalinen projektiio; kuvissa mukana kaikki fokustasot (engl. maximum projection, overlay); Skaalaviiva=500 µm.

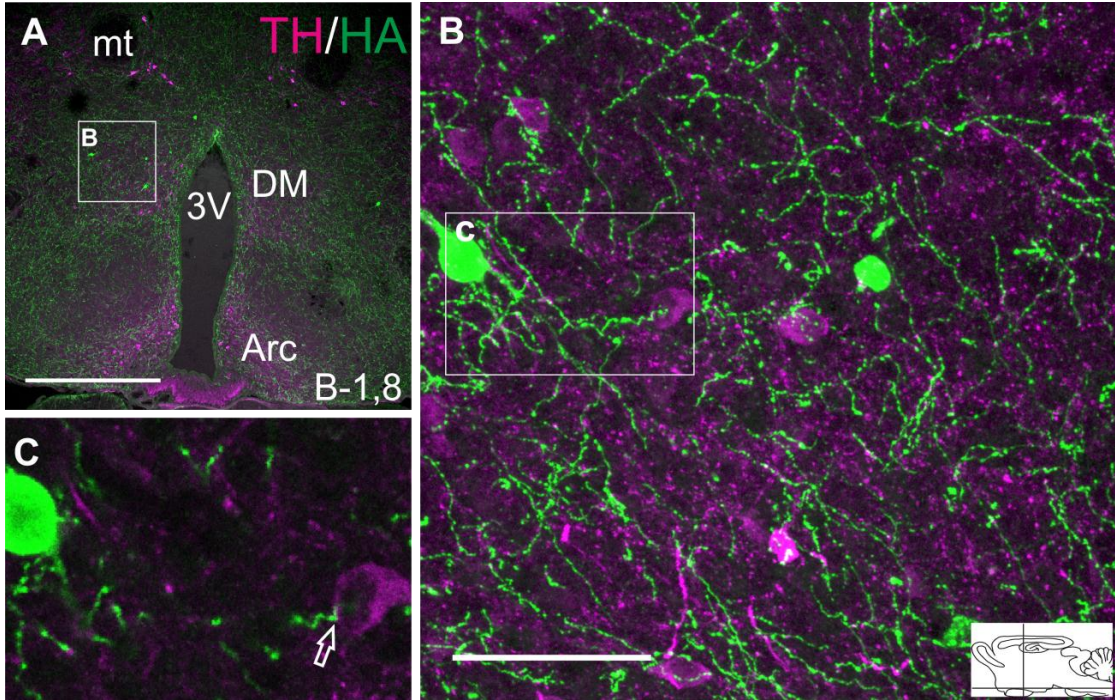


Kuva 11. Histamiinia (HA, vihreä) sisältäviä soluja ja säikeitä sekä tyrosiinihydroksylaasia (TH, magenta) sisältäviä dopamiinisoluja ja hermosäikeitä hiiren koronaalisissa aivoleikkeissä (Bregma (B): -0,9 mm – (-2,4 mm)) (kts. lyhenteet taulukko 2). Maksimaalinen projektiio; kuvissa mukana kaikki fokustasot (engl. overlay projection); Skaalaviiva=500  $\mu$ m.



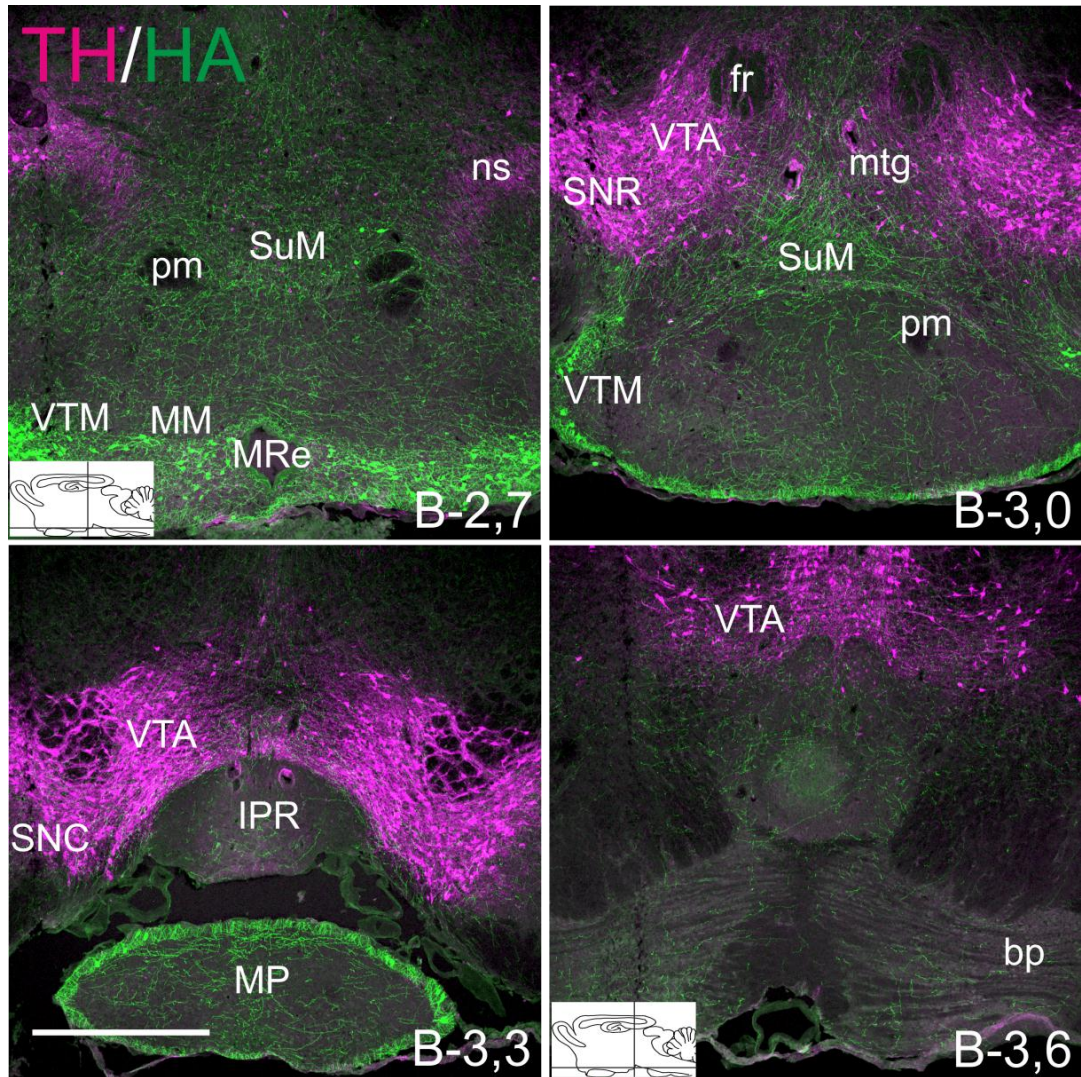
Kuva 12. Histamiinia (HA, vihreä) sisältäviä soluja ja säikeitä sekä tyrosiinihydroksylaasia (TH, magenta) sisältäviä dopamiinisoluja ja hermosäikeitä hiiren horisontaalisissa aivoleikkeissä (Bregma (B): -4,3 mm – (-5,8 mm)) (kts. lyhenteet taulukko 2). Maksimaalinen projektiio; kuvissa mukana kaikki fokustasot (engl. maximum projection, overlay); Skaalaviiva=500 µm.

Posteriorisessa hypotalamuksessa dopamiinisoluja ja hermosäikeitä sijaitsee ZI:ssa, dorsomedialisella hypotalamisella alueella (DM), arcute tumakkeessa (Arc) sekä mammillototalamisen hermoradan (mt) ympärillä (kuva 11: B-1,5; B-1,8 ja B-2,1; kuva 12: B-4,9; B-5,2; B-5,5 ja B-5,8 sekä kuva 13).



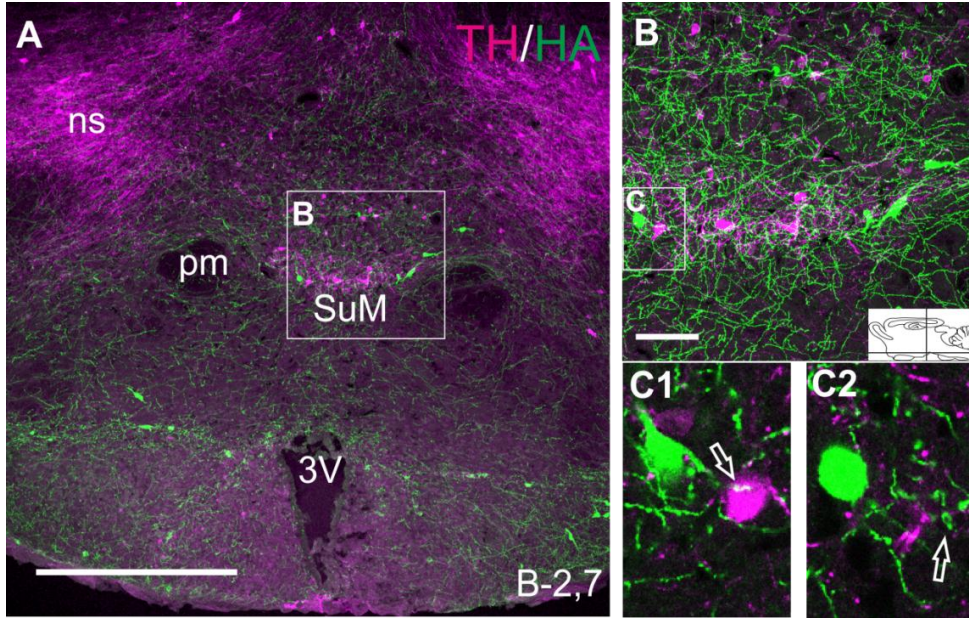
Kuva 13. Dopamiini (TH, magenta)- ja histamiinisoluja sekä hermosäikeitä (HA, vihreä) dorsomedialisella hypotalamisella alueella koronaalileikkeessä (Bregma (B): -1,8 mm) (kts. lyhenteet taulukko 2). Dopamiinisoluja on nähtävissä myös mammillototalamisen hermoradan ympärillä sekä arcuate-tumakkeessa. Kuvan A (skaalaviiva=500  $\mu$ m) ja B (skaalaviiva=50  $\mu$ m) ovat maksimaalisen projektion usean fokustason kuvia. Kuvassa C (yksi fokustaso) histaminerginen säie suuntautuu hyvin lähelle dopamiinisolua (nuoli).

Yksittäisiä dopamiinihermosoluja sijaitsee myös posteriorisella hypotalamisella alueella (PH) (kuva 11: B-2,1) sekä VTA:n alapuolella sijaitsevassa supramammillaarisessa tumakkeessa (SuM) (kuva 14: B-2,7 ja B-3,0 sekä kuva 15).

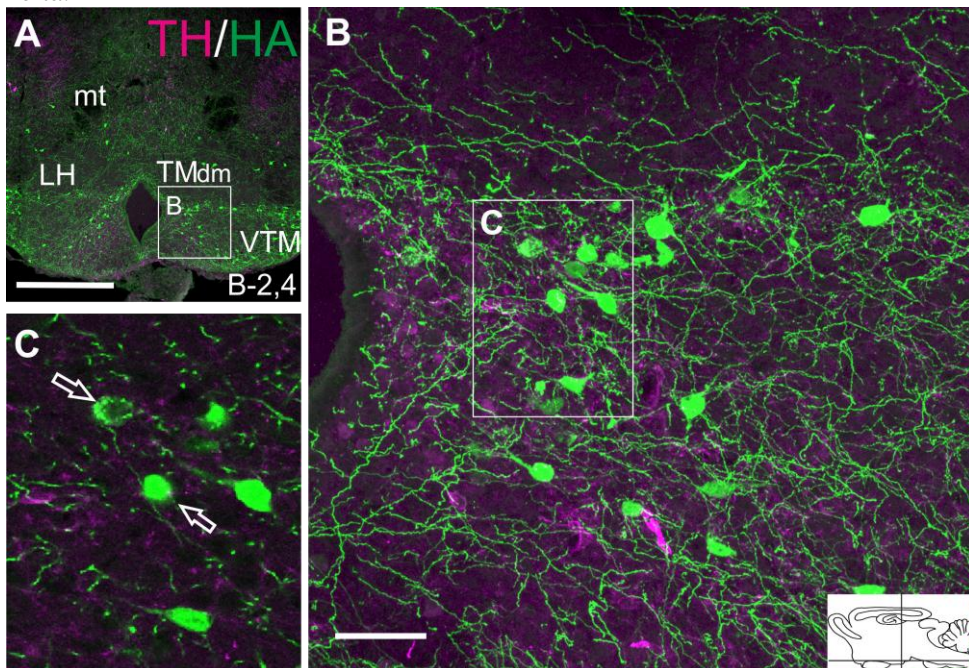


Kuva 14. Histamiinia (HA, vihreä) sisältäviä soluja ja säikeitä sekä tyrosiinihydroksylaasia (TH, magenta) sisältäviä dopamiinisoluja ja hermosäikeitä hiiren koronaalisissa aivoleikkeissä (Bregma (B): -2,7 mm – (-3,6 mm) (kts. lyhenteet taulukko 2). Maksimaalinen projektiio; kuvissa mukana kaikki fokustasot (engl. maximum projection, overlay); Skaalaviiva=500 µm.

Histamiinisoluja sijaitsee runsaasti posteriorisessa hypotalamuksessa TMN:ssä, (kuva 11: B-2,1 ja B-2,4), ventraalisessa tuberomammillaarisessa (VTM) tumakkeessa (kuva 11: B-2,4 sekä kuva 14: B-2,7 ja B-3,0) sekä SuM:ssä (kuva 14: B-2,7 ja B-3,0 sekä kuva 15). TMN:n histamiinisoluissa näkyy histamiinia varastoituneena vesirakkuloihin ja ohuet dopaminergiset hermosäikeet suuntautuvat näitä soluja kohti (kuva 16C). Muutamia histamiinisoluja on nähtävissä myös lateraalisessa hypotalamuksen alueella (kuva 11: B-2,1 ja B-2,4 sekä kuva 12: B-4,9) ja PH:n alueella 3V:n yläpuolella (kuva 11: B-2,1 sekä kuva 12: B-4,6).

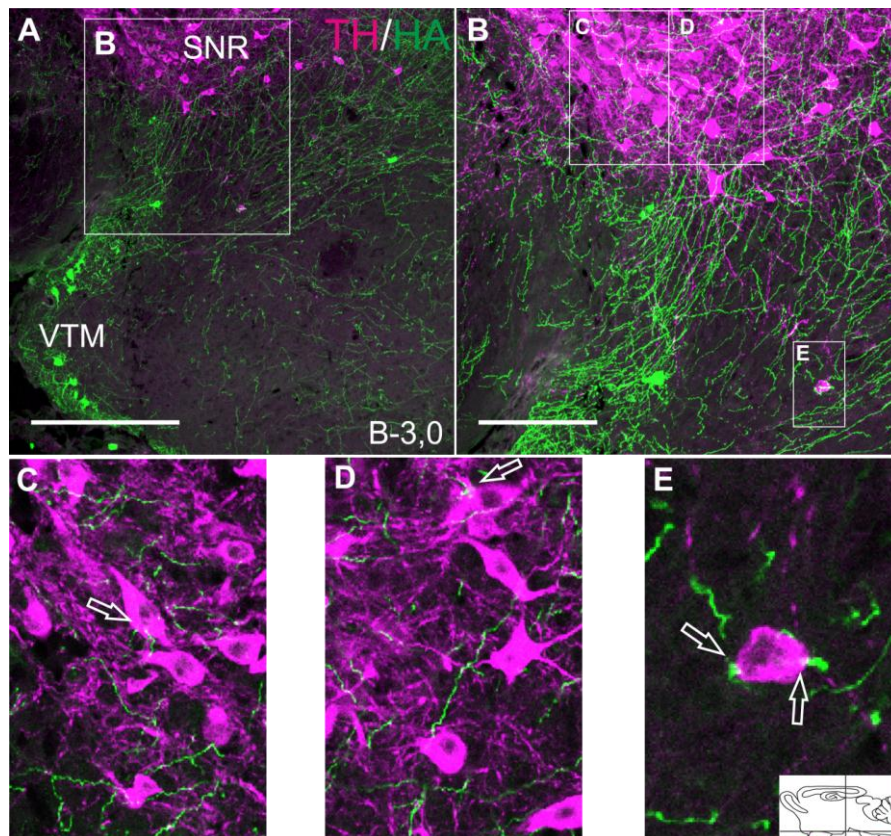


Kuva 15. Histamiini- (HA, vihreä) ja dopamiinisoluja (TH, magenta) sijaitsee hyvin lähellä toisiaan supramammillaarisessa tumakkeessa (koronaalileike, Bregma (B): -2,7 mm) (kts. lyhenteet taulukko 2). Maksimaalisen projektion kuvien skaalaviiva on 500  $\mu\text{m}$  (kuva A) ja 50  $\mu\text{m}$  (kuva B). Kuvissa C1 ja C2 (lähes peräkkäiset fokustasot) histamiini- ja dopamiinisolut sijaitsevat hyvin erittäin lähellä toisiaan. Kuvassa C1 histamiinisolusta suuntautuu hermosäie dopamiinisolua kohden (nuoli). Kuvassa C2 näkyy mahdollisesti histaminergisen hermosäikeen hermpäätteitä (nuoli). Kuvassa A on nähtävissä nigrostriataaliradan dopaminergisiä hermosäikeitä.



Kuva 16. Tuberomammillaarisen tumakkeen histamiinisoluja (HA, vihreä) sekä dopaminergisiä hermosäikeitä (TH, magenta) koronaalileikkeeseessä (Bregma (B): -2,4 mm) (kts. lyhenteet taulukko 2). Kuvat A (skaalaviiva=500  $\mu\text{m}$ ) ja B (skaalaviiva=50  $\mu\text{m}$ ) ovat usean fokustason maksimaalisen projektion kuvia. Kuvassa C (yksi fokustaso) ohut dopaminerginen hermosäie sijaitsee hyvin lähellä histaminergistä hermosolua ja histamiinia sisältäviä vesirakkuloita näkyy histamiinisolun sisällä (nuolet).

Histamiini- ja dopamiinisolut ovat lähimpinä toisiaan DM:ssä (kuva 11: B-2,1 ja kuva 12: B-4,9 ja B-5,2 sekä kuva 13), dorsomediaalisessa tuberomammillaarisessa tumakkeessa (kuva 11: B-2,4; kuva 12: B-5,2; kuva 13 sekä kuva 16) ja SuM:ssa (kuva 12: B-5,2; kuva 14: B-2,7 ja B-3,0 sekä kuva 15). DM:ssä sekä SuM:ssä histaminergiset hermosäikeet suuntautuvat hyvin lähelle dopamiinisoluja. SuM:n yhden fokustason kuvissa on myös mahdollisesti nähtävissä histaminergisiä hermopäätteitä dopamiinisolun vieressä (kuva 15C2). VTM:n histamiinisoluista nousee voimakas histaminerginen hermotus mustatumakkeeseen ja hieman heikompi hermostus VTA:n alueelle (kuva 14: B-3,0 sekä kuva 17). Histaminergisiä hermosäikeitä on posteriorisessa hypotalamuksessa kauttaaltaan (kuva 12 B-4,6 – B-5,8). Erityisen tiheästi niitä sijaitsee posteriorisen hypotalamuksen ventraalisessa osassa (kuva 12: B-5,5 ja B-5,8) sekä SuM:ssä (kuva 14: B-2,7 ja B-3,0).



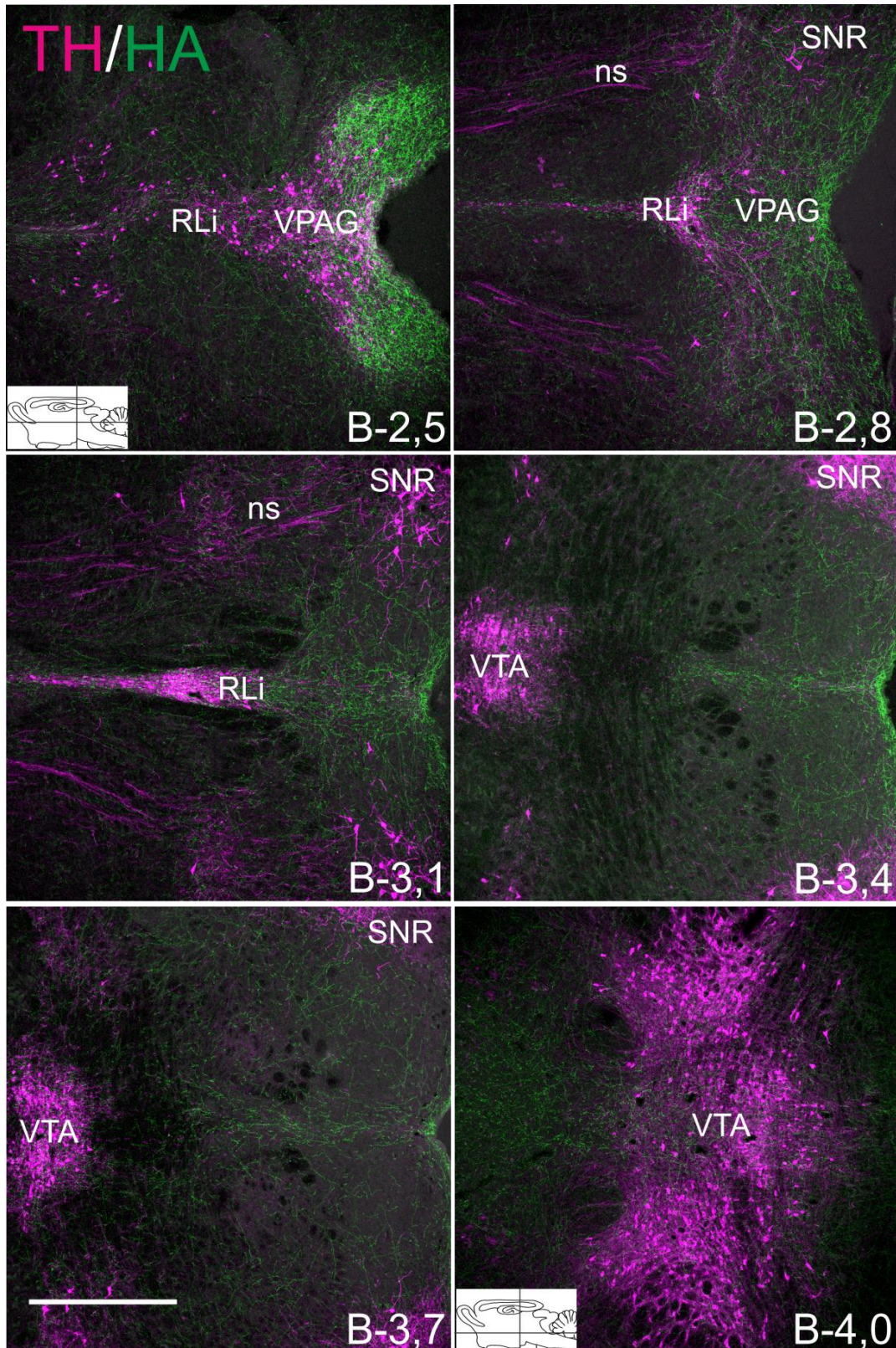
Kuva 17. Ventraalisen tuberomammillaarisen tumakkeen (VTM) histamiinisoluista (HA, vihreä) nousee voimakas hermotus mustatumakkeen (SNR) dopamiinisoluja (TH, magenta) kohti (SNR) (koronaalileike, Bregma (B): -3,0 mm). Kuvat A (skaalaviiva 250  $\mu$ m) ja B (skaalaviiva 100  $\mu$ m) ovat usean fokustason maksimaalisia projektiokuvia. Kuvissa C-E (yhden fokustason kuvia) näkyy VTM:stä nousevien histaminergisten hermosäikeiden läheinen sijainti suhteessa dopamiinisoluihin (nuolet).



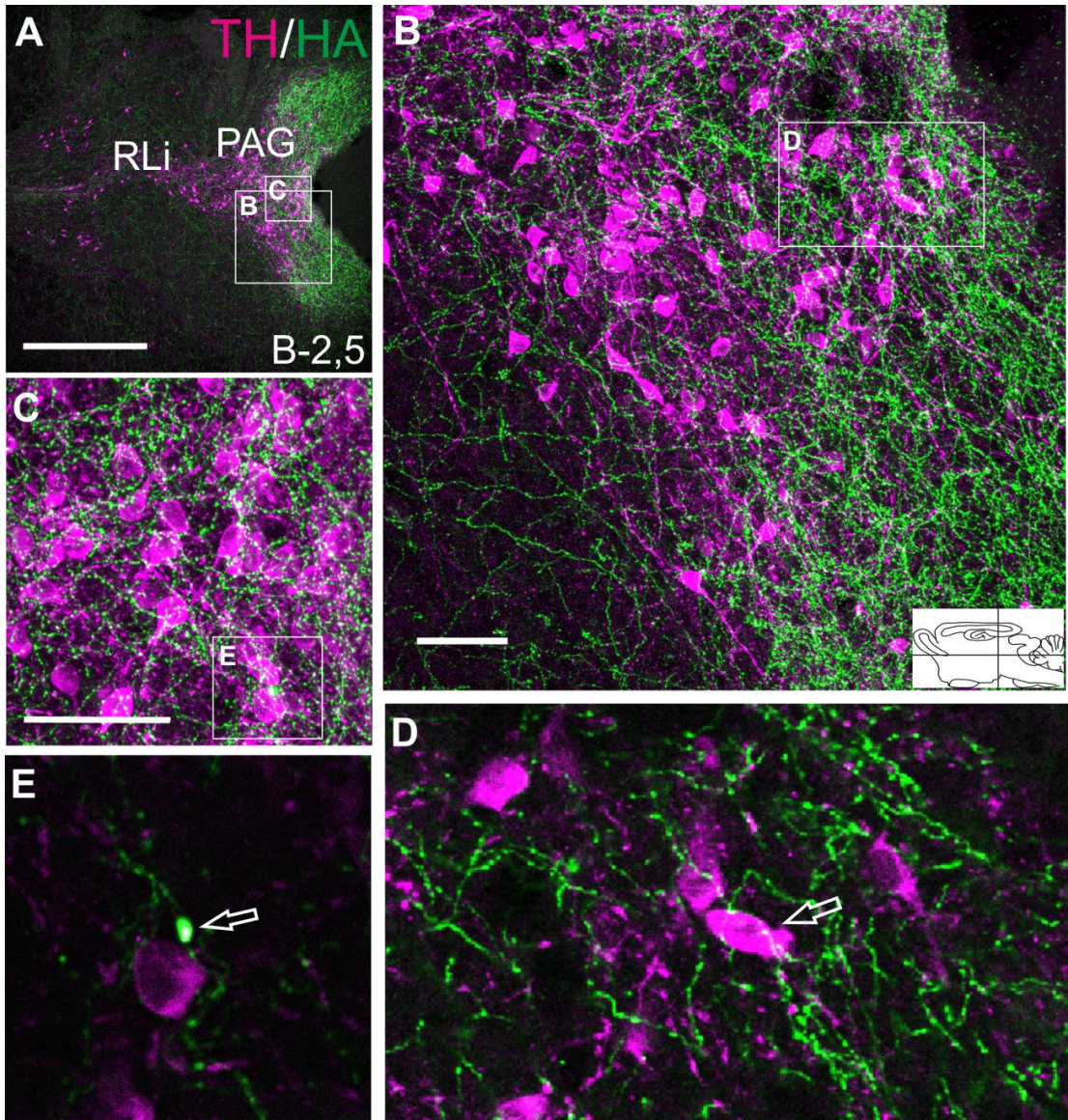
### 3.1.2 Keskiäivot

Keskiäivoissa dopamiinisoluja ja hermosäikeitä esiintyy erityisen runsaasti VTA:ssa sekä mustatumakkeessa (kuva 14: B-3,0; B-3,3 ja B-3,6 sekä kuva 18: B-3,1 ja B-4,0). Mustatumakkeesta suuntautuu vahva dopaminerginen hermotus dorsaalista striatumia kohti (kuva 18: B-2,8 ja B-3,1) ja VTA:n dopamiinisolusta suuntautuu heikompi hermotus hypotalamusta (kuva 14: B-3,0 sekä kuva 17) sekä ventraalista striatumia (mikroskooppihavainto) kohden. Dopaminergisiä hermosoluja on myös runsaasti ventraalisen periakveduktaalisesta harmaan aineen alueella (VPAG) sekä rostraalisessa lineaarisessa tumakkeessa (RLi) (kuva 18: B-2,5 ja B-2,8 sekä kuva 19).

Histaminergisiä hermosäikeitä on keskiäivoissa kauttaaltaan, mutta hermotus on erityisen tiheää VPAG:n dorsaaliosassa (kuva 18: B-2,5 ja B-2,8 sekä kuva 19). Nämä hermosäikeet kulkevat RLi:n ja superiorisen VTA:n suuntaan (kuva 18: B-2,5 - B-3,4) ja niissä on nähtävissä histamiinia sisältäviä vesirakkuloita (kuva 19). Histamiinihermosäikeitä on huomattavasti myös VTA:n sentraalisessa osassa (kuva 12: B-4,3, kuva 14: B-3,0 ja kuva 18: B-4,0).



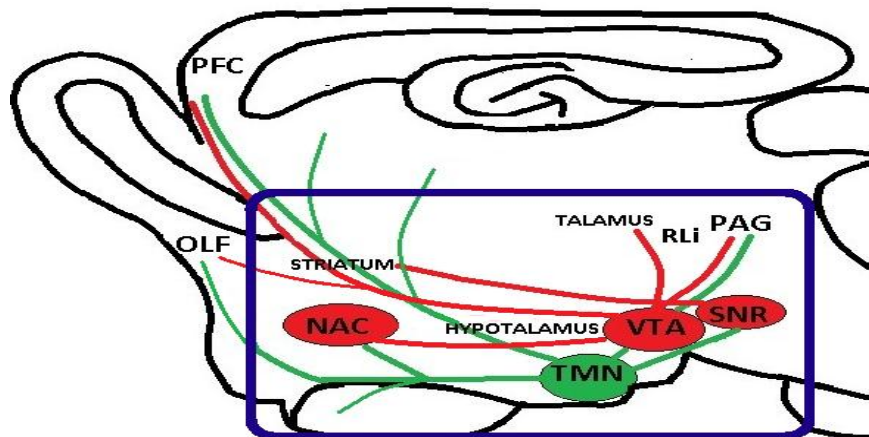
Kuva 18. Histaminergisiä (HA, vihreä) hermosäikeitä ja tyrosiinihydroksylaasia (TH, magenta) sisältäviä dopamiinisoluja ja hermosäikeitä hiiren horisontaalisissa aivoleikkeissä (Bregma (B):-2,5 mm – (-4,0 mm)) (kts. lyhenteet taulukko 2). Maksimaalinen projektio; kuvissa mukana kaikki fokustasot (engl. maximum projection, overlay); Skaalaviiva=500  $\mu$ m.



Kuva 19. Voimakas histaminerginen (HA, vihreä) hermotus ja dopamiinisoluja (TH, magenta) ventraalisen periaqueductaalisen harmaan aineen (VPAG) ja rostraalisen lineaarisen raphe-tumakkeen (RLi) alueella (Bregma (B): -2,5 mm). Horisontaalileikkelyn kuva A (skaalaviiva=500  $\mu\text{m}$ ), B (skaalaviiva=50  $\mu\text{m}$ ) ja C (skaalaviiva=50  $\mu\text{m}$ ) ovat maksimaalisen projektion usean fokustason kuvia. Kuvissa E ja D (yhden fokustason kuvat) histamiinisäikeet suuntautuvat dopamiinisoluja kohti. Kuvissa C-E histamiinia sisältävät vesirakkulat erottuvat histamiinisäikeiden sisällä (mm. kuvan E nuoli).

### 3.1.3 Histaminergiset ja dopaminergiset hermosäikeet hiiren aivojen sagitaalisessa rakennekuvassa

Tutkimustulosten perusteella kokosimme hiiren sagitaaliseen rakennekuvaan yhteenvetona histaminergisten ja dopaminergisten eli TH-positiivisten hermosäikeiden hermottamat alueet hiiren aivoissa tarkastelemaltamme alueelta (kuva 20). Histamiinisäikeet suuntautuvat TMN:stä VTA:han, mustatumakkeeseen, PAG:n alueelle sekä striatumissa muun muassa accumbens-tumakkeeseen. Dopamiinisäikeet suuntautuvat puolestaan VTA:sta PAG:n alueelle, talamukseen ja accumbens-tumakkeeseen sekä mustatumakkeesta striatumiin. Histamiini- että dopamiinisäikeet kulkevat myös hajukäämiin ja isoaivokuorelle. Rakennekuva on piirretty Paint -ohjelmalla Franklinin ja Paxinoksen (1997) hiiren aivoatlasta apuna käyttäen.



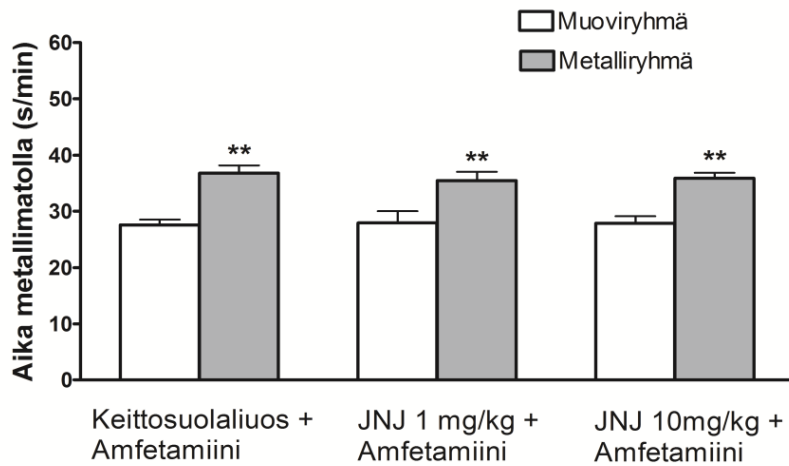
Kuva 20. Sagitaali-rakennekuva histaminergisen (vihreä) ja dopaminergisen (punainen) hermovälittäjäainejärjestelmän sijainnista hiiren aivoissa. Tarkastelimme erikoistyössä näiden kahden hermovälittäjäainejärjestelmän sijaintia basaalisesta etuainon, hypotalamuksen ja ventromediaalisen posteriorisen keskiaivon alueilla (kuvan rajattu alue). Histamiinisäikeet suuntautuvat tuberomammillaarisesta tumakkeesta (TMN) ventraalisesta tegmentumiin (VTA), mustatumakkeeseen (SNR), periakveduktaalisesta harmaaseen aineeseen (PAG) sekä striatumissa muun muassa accumbens-tumakkeeseen (NAC). Dopamiinisäikeet suuntautuvat ventraalisesta tegmentumista periakveduktaalisesta harmaan aineen alueelle, talamukseen ja accumbens-tumakkeeseen sekä mustatumakkeesta striatumiin. Näytteitä mikroskoopilla tarkasteltessa havaittiin, että sekä histamiini- että dopamiinisäikeet kulkevat myös hajukäämiin (engl. olfactory tubercle, OLF) ja isoaivokuorelle (engl. prefrontal cortex, PFC). Hiiren sagitaali-rakennekuva on piirretty Paint -ohjelmalla Franklinin ja Paxinoksen (1997) hiiren aivoatlasta apuna käyttäen.

### 3.2 Ehdollistettu paikkahakuisuus

Paikkahakuisuuden kehittymistä tutkittiin vertaamalla aikaa (s/min), jonka eri lattiamateriaaleille ehdollistetut hiiret viettivät toisella lattiamateriaaleista. Eläimille tulkittiin kehittyneen ehdollistettua paikkahakuisuutta, mikäli ne viettivät preferenssitestissä enemmän aikaa sen lattiamateriaalin päällä, jolla ne olivat saaneet lääkeainekäsittelyn. Hiirien liikeaktiivisuutta mitattiin tutkimuslaatikkoon totuttamisen eli habituaation, jokaisen ehdollistamiskerran sekä varsinaisen paikkahakuisuuskokeen aikana videokameran ja Ethovision Color-Pro 3.0-ohjelman avulla. Habituaatiossa ja ehdollistamissessioissa liikeaktiivisuutta tutkittiin liikuttuna matkana (cm) minuutissa (min) 30 minuutin ajalta sekä kumulatiivisena liikuttuna matkana (cm) 30 minuutin aikana. Kaikissa kuvissa hajonta kuvaa keskiarvon keskivirhettä (engl. standard error of mean, SEM).

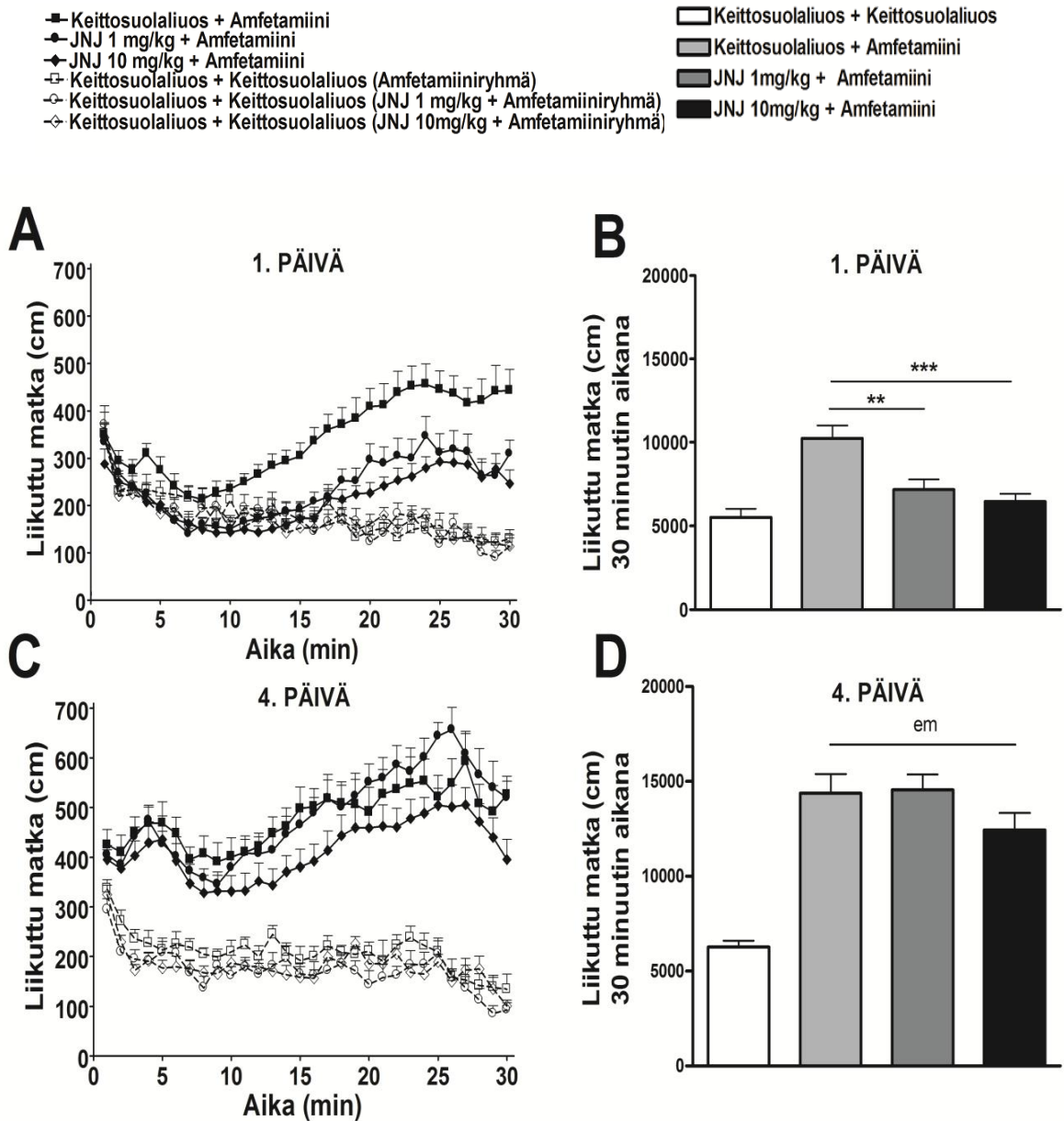
#### 3.2.1 JNJ-39220675 ja amfetamiini

C57BL/6J -kannan uroshiiret ehdollistettiin amfetamiinille neljässä ehdollistamissessiossa. Selvittääksemme vaikuttaako ei-imidatsolirakenteinen  $H_3$ -reseptorin antagonistin amfetamiinin aiheuttaman ehdollistetun paikkahakuisuuden kehittymiseen, osalle hiiristä annettiin esikäsitteilyä JNJ-39220675:sta (1 mg/kg tai 10 mg/kg; n=14) 30 minuuttia ennen amfetamiinin (2 mg/kg) annostelua. Kaksisuuntainen varianssianalyysi osoitti, että käsittelyn ja tutkimuslaatikon alustan välillä ei ole interaktiota ( $F_{2,34}=0,16$ ,  $p=0,8545$ ), joten preferenssitestin tulokset analysoitiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä sekä Tukeyn jatkotestillä. Pelkästään amfetamiini-injektion saaneille kontrolliryhmän hiirille (n=11) kehittyi tilastollisesti merkitsevä paikkahakuisuus ( $p<0,01$ ), eikä JNJ-39220675 esikäsitteily (1 mg/kg:  $p<0,01$  ja 10mg/kg:  $p<0,01$ ) vaikuttanut amfetamiinin aiheuttamaan paikkahakuisuuteen (kuva 21).



Kuva 21. JNJ-39220675 (1 mg/kg ja 10 mg/kg) esikäsitteily (i.p.) ei vaikuta amfetamiinin (2 mg/kg, i.p.) aiheuttamaan ehdollistettuun paikkahakuisuuteen C57BL/6J -kannan hiirillä. Metallimatolla amfetamiini-injektion saaneet hiiret (metalliryhmä) viettivät preferenssitestin aikana enemmän aikaa (s/min) tutkimuslaatikon metallimatolla ja muovimatolle ehdollistetut hiiret (muoviryhmä) puolestaan hakeutuvat tutkimuslaatikon muovimatolle. Tulokset on analysoitu yksisuuntaisella varianssianalyysillä ja Tukeyn jatkotestillä, \*\* $p < 0,01$ ;  $n = 6-7$ .

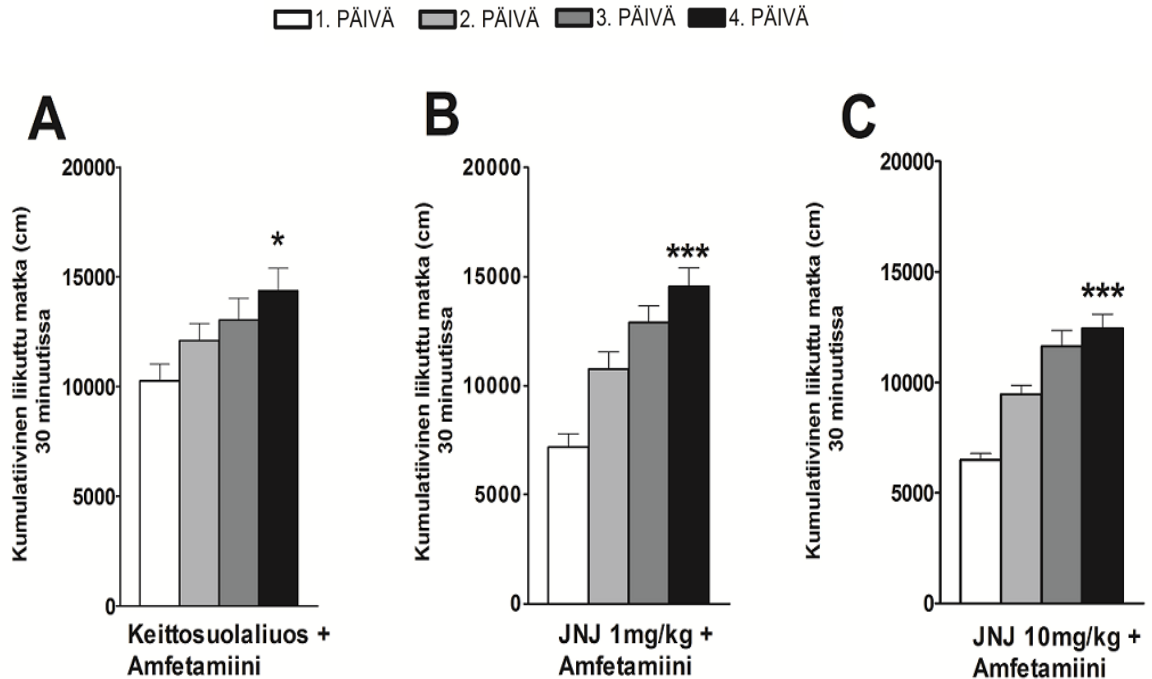
Hiirien kumulatiivinen liikeaktiivisuus (cm) analysoitiin habituaation, neljän ehdollistamiskerran ja preferenssitestin ajalta yksisuuntaisella varianssianalyysillä ja Tukeyn jatkotestillä (kuva 22B ja 22D). Habituaatioissa liikutussa matkassa ei havaittu ryhmien välisiä tilastollisesti merkitseviä eroja. Molemmat annokset JNJ-39220675:sta (1 mg/kg:  $p < 0,01$  ja 10 mg/kg:  $p < 0,001$ ) vähensivät amfetamiinin aiheuttamaa liikeaktiivisuuden lisääntymistä ensimmäisellä ehdollistamiskerralla. Neljännellä ehdollistamiskerralla JNJ-39220675 ei enää vaikuttanut liikeaktiivisuuteen tilastollisesti merkitsevästi (1 mg/kg:  $p > 0,05$  ja 10 mg/kg:  $p > 0,05$ ). Preferenssitestissä JNJ 1 mg/kg - amfetamiini ja JNJ 10 mg/kg - amfetamiini käsittelyryhmien hiirien liikeaktiivisuuksissa ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa kontrolliryhmän hiiriin verrattuna.



Kuva 22. JNJ-39220675 (1 mg/kg ja 10 mg/kg) vähentää amfetamiinin (2 mg/kg) aiheuttamaa liikeaktiivisuuden kasvua C57BL/6J -kannan hiirillä ensimmäisen ehdollistamiskerran yhteydessä, mutta ei enää neljännellä ehdollistamiskerralla. Kuvissa A ja C on esitetty hiirien päivinä 1. ja 4. minuutissa liikuttu matka (cm) 30 minuutin ajalta. Kuvissa B ja D on esitetty hiirien päivinä 1. ja 4. kumulatiivinen liikuttu matka (cm) 30 minuutin ajalta. Kumulatiivisen liikutun matkan eri käsittelyryhmien tulokset on analysoitu yksisuuntaisella varianssianalyysillä ja Tukeyn jatkotestillä, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , em=ei tilastollista merkitsevyyttä= $p > 0,05$ ;  $n=11-14$ .

Kumulatiivinen liikuttu matka (cm) 30 minuutin aikana lisääntyi neljän ehdollistamiskerran aikana kaikissa käsittelyryhmissä päivien 1-4 välillä (yksisuuntainen varianssianalyysi ja Tukeyn jatkotesti; keittosuolaliuos-amfetamiini:  $p < 0,05$ ; JNJ-39220675

1 mg/kg - amfetamiini:  $p < 0,001$ ; JNJ-39220675 10 mg/kg - amfetamiini:  $p < 0,001$ ) (kuva 23).



Kuva 23. Amfetamiini (2 mg/kg, i.p.) aiheuttaa liikeaktiivisuuden herkistymistä toistetuilla annoilla C57BL/6J -kannan hiirillä. JNJ-39220675 (1 mg/kg ja 10 mg/kg, i.p.) esikäsitteily ei vaikuta amfetamiinin aiheuttamaan herkistymiseen. Kumulatiivinen liikuttu matka (cm) 30 minuutissa päivinä 1-4 on esitetty kuvassa A käsittelyryhmälle keittosuolaliuos - amfetamiini 2 mg/kg, kuvassa B käsittelyryhmälle JNJ-39220675 1 mg/kg - amfetamiini 2 mg/kg ja kuvassa C käsittelyryhmälle JNJ-39220675 10 mg/kg - amfetamiini 2 mg/kg. Tulokset on analysoitu yksisuuntaisella varianssianalyysillä ja Tukeyn jatkotestillä, \*\*\* $p < 0,001$ , \* $p < 0,05$ ;  $n = 11-14$ .

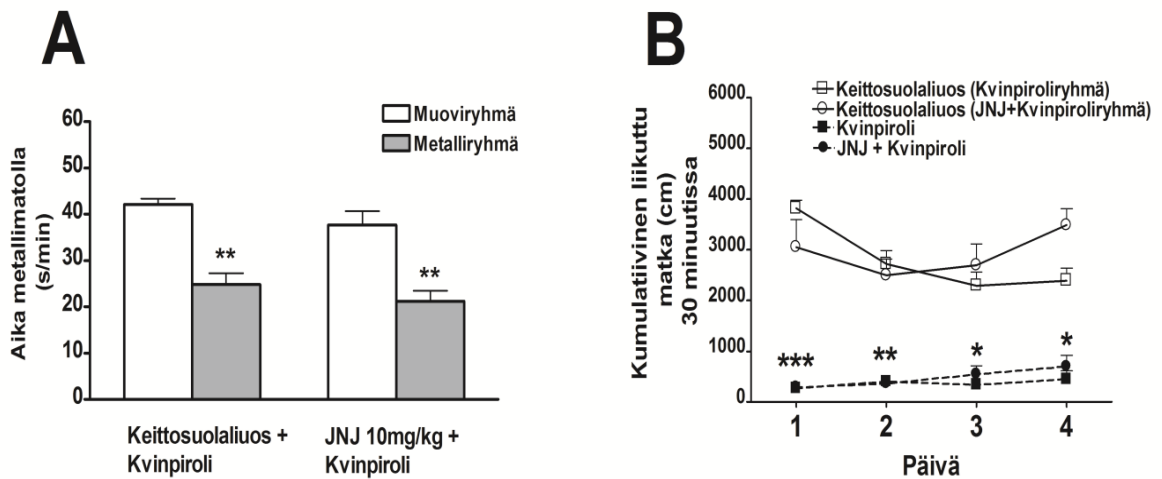
### 3.2.2 JNJ-39220675 ja kvinpiroli

Ensin selvitimme, aiheuttaako  $D_2$ -reseptorin agonisti kvinpiroli mielihyvää vai aversiota, sillä toistaiseksi C57BL/6J -kannan hiirillä julkaistut tutkimukset ovat olleet tältä osin ristiriitaisia. Ehdollistetun paikkahakuisuuden kokeessa havaittiin, että kvinpiroli (0,5 mg/kg) ilman esikäsitteilyä aiheuttaa ehdollistettua aversiota C57BL/6J -kannan uros- ja naarashiirillä ( $n = 4$ ) ( $p < 0,01$ ) (kuva 24A). Hiiret siis välttivät sitä lattiamateriaalia, jonka päälle ne ovat saaneet kvinpiroli-injektion. Tulokset analysoitiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä ja Tukeyn jatkotestillä, sillä kaksisuuntainen varianssianalyysi osoitti, että käsittelyn ja lattiamateriaalien välillä ei ole interaktiota ( $F_{1,12} = 2,89$ ,  $p = 0,8545$ ). Selvitämme vaikuttaako  $H_3$ -reseptorin antagonistin kvinpirolin aiheuttaman ehdollistetun



aversion muodostumiseen, toistimme kokeen samalla ehdollistusmenetelmällä ja annoimme eri hiirille (n=4) esikäsitteilynä JNJ-39220675:sta (10 mg/kg) 30 minuuttia ennen kvinpirolin (0,5 mg/kg) annostelua. Tulokset osoittivat, että JNJ-39220675 esikäsitteily ei estä kvinpirolin aversiivista vaikutusta ( $p < 0,01$ ) (kuva 24A).

Lisäksi analysoimme kvinpirolin vaikutusta liikeaktiivisuuteen toistettujen mittausten kaksisuuntaisella varianssianalyysillä ja Bonferronin jatkotestillä. Kvinpiroli aiheutti voimakasta liikeaktiivisuuden vähenemistä kaikkina ehdollistamispäivinä ( $F_{3,84}=43,71$ , 1. päivä:  $p < 0,001$ ; 2. päivä:  $p < 0,01$ ; 3. päivä:  $p < 0,05$  ja 4. päivä  $p < 0,05$ ) verrattuna keittosuolaliuksen saaneisiin hiiriin (kvinpiroliryhmä) (kuva 24B). JNJ-39220675 ei vaikuttanut kvinpirolin aiheuttamaan liikeaktiivisuuden vähenemiseen ( $F_{3,84}=43,71$ , päivät 1-4  $p > 0,05$ ).

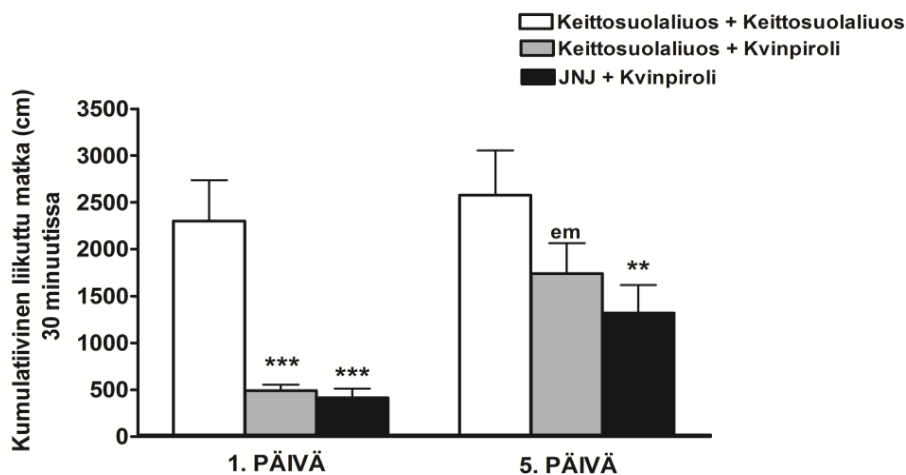


Kuva 24. JNJ-39220675 ei vaikuta kvinpirolin aversiiviseen ja liikeaktiivisuutta vähentävään vaikutukseen. Kuva A: JNJ-39220675 (10 mg/kg, i.p.) esikäsitteily ei vaikuta kvinpirolin (0,5 mg/kg, i.p.) aiheuttamaan ehdollistettuun paikka-aversioon C57BL/6J -kannan hiirillä. Metallimatolla kvinpiroli-injektion saaneet hiiret (metalliryhmä) viettävät preferenssitetin aikana enemmän aikaa (s/min) tutkimuslaatikon muovimatolla ja muovimatolle ehdollistetut hiiret (muoviryhmä) puolestaan hakeutuvat laatikon metallimatolle. Tulokset analysoitiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä ja Tukeyn jatkotestillä, \*\* $p < 0,01$ ; n=4. Kuva B: Kvinpiroli (0,5 mg/kg, i.p.) aiheuttaa liikeaktiivisuuden laskua, johon JNJ-39220675 (10 mg/kg, i.p.) esikäsitteily ei vaikuta. Tulokset on analysoitu toistettujen mittausten kaksisuuntaisella varianssianalyysillä sekä Bonferronin jatkotestillä, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ ; n=4.

### 3.3 Liikeaktiivisuuskoe

Ehdollistetun paikkahakuisuuden kokeiden jälkeen tutkimme tarkemmin kvinpirolin vaikutusta hiirien liikeaktiivisuuteen sekä JNJ-39220675:n vaikutusta kvinpirolin aiheuttamaan liikeaktiivisuuden muutokseen toistettujen lääkeantojen liikeaktiivisuuskokeessa. Hiiret jaettiin kolmeen eri käsittelyryhmään: keittosuolaliuos - keittosuolaliuos (n=9), keittosuolaliuos - kvinpiroli 0,5 mg/kg (n=11) ja JNJ-39220675 10mg/kg -kvinpiroli 0,5 mg/kg (n=12) ja niiden liikeaktiivisuutta mitattiin tutkimuksen ensimmäisenä ja viidentenä päivänä yhteensä 90 minuutin ajan videokameran ja Ethovision Color-Pro 3.0 -ohjelman avulla. Liikeaktiivisuus analysoitiin kumulatiivisena liikuttuna matkana (cm) sekä nopeutena (cm/s) 30 minuutin aikana kvinpirolin annon jälkeen. Kuvissa esiintyvä hajonta kuvaa keskiarvon keskivirhettä (SEM).

Ensimmäisenä päivänä sekä keittosuolaliuos - kvinpiroli ( $F_{2,58}=14,81$ ,  $p<0,001$ ) että JNJ-39220675 - kvinpiroli ( $F_{2,58}=14,81$ ,  $p<0,001$ ) käsittelyryhmän hiirien liikeaktiivisuus väheni tilastollisesti merkitsevästi kontrolliryhmään verrattuna (kuva 25). Viidentenä päivänä JNJ-39220675:sta ja kvinpirolia saaneiden hiirien liikeaktiivisuus oli tilastollisesti alhaisempi kontrolliryhmään verrattaessa ( $F_{2,58}=14,8$ ,  $p<0,01$ ). Keittosuolaliuos - kvinpiroli käsittelyryhmän hiirien liikeaktiivisuus ei eronnut enää viidentenä päivänä tilastollisesti kontrolliryhmän hiirien liikutusta matkasta ( $F_{2,58}=14,8$ ,  $p>0,05$ ). Tulokset analysoitiin kaksisuuntaisella varianssianalyysillä ja Bonferronin jatkotestillä.



Kuva 25. Kvinpirolin (0,5 mg/kg) liikeaktiivisuutta vähentävä vaikutus väheni viiden päivän toistettujen antojen (i.p.) liikeaktiivisuuskokeessa C57BL/6J -kannan hiirillä. JNJ-39220675 (10 mg/kg) esikäsitteily esti kvinpirolin toistettujen antojen liikeaktiivisuutta vähentävän vaikutuksen desensitisaatiota. Kumulatiivisen 30 minuutissa liikutun matkan (cm) arvot on analysoitu kaksisuuntaisella varianssianalyysillä ja Bonferronin jatkotestillä, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , em=ei tilastollista merkitsevyyttä= $p > 0,05$ ;  $n = 9-12$ .

Ensimmäisenä päivänä lääkekäsittelyryhmissä nopeuden keskiarvot (cm/s) olivat alhaisemmat keittosuolakäsittelyryhmän hiiriin verrattuna: 64,9 % (keittosuolaliuos - kvinpiroliryhmä) ja 68,3 % (JNJ-39220675 - kvinpiroliryhmä). Viidentenä päivänä nopeuden keskiarvot olivat edelleen lääkekäsittelyryhmissä matalammat kuin kontrolliryhmässä: 29,0 % (keittosuolaliuos - kvinpiroliryhmä) ja 40,0 % JNJ-39220675 - kvinpiroliryhmä). JNJ-39220675 siis laski nopeutta viidentenä päivänä vielä 15,4 % kvinpiroliryhmään verrattuna.

## 4 TULOSTEN TARKASTELU

### 4.1 Immunohistokemiallinen värjäys

Histamiinin primaarivasta-aineen (kaniinin-anti-HA-19C) spesifisyys keskushermoston histaminergisiä soluja ja säikeitä kohtaan on osoitettu kattavasti muun muassa dot plot- ja preabsorptiokokeissa (Panula ym. 1984; Panula ym. 1990). HA-19C:sta onkin käytetty laajasti neuroanatomisissa tutkimuksissa muun muassa ihmisen (Panula ym. 1990), rotan (Panula ym. 1989; Vanhala ym. 1994) ja seeprakalan (Kaslin ja Panula 2001) aivojen

histamiinin tutkimisessa. Laimensimme HA-vasta-aineen suhteessa 1/10000 perustuen aikaisempiin rotan aivojen histamiinivärjäyksiin. Se osoittautui riittäväksi konsentraatioksi osoittamaan histamiinin myös hiiren aivoissa.

TH on yleisesti käytetty markkeri dopamiinin immunohistokemiallisissa tutkimuksissa (Pickel ym. 1975). TH osallistuu myös noradrenaliinin synteesiin (Levitt ym. 1965), mutta TH-antiseerumin on kuitenkin osoitettu havaitsevan dopamiinisoluja suuremmalla intensiteetillä (Pickel ym. 1975). Syyksi tähän on arveltu muun muassa suurempaa TH määrää dopaminergisissä hermosoluissa verrattuna noradrenergisiin hermosoluihin. Näiden kahden katekoliiniamiinin neuroanatomiaa on myös kartoitettu kattavasti (Ungerstedt 1971), joten dopaminergisen ja noradrenergisen hermovälittäjäainejärjestelmän tiedetään sijaitsevan aivoissa anatomisesti eri alueilla. Nämä tekijät huomioon ottaen voidaan olettaa erikoistyyssä tutkittujen aivoalueiden TH-positiivisten solujen olevan nimenomaan dopaminergisiä soluja. Tutkimuksessa käytetty monoklonaalinen hiiressä tuotettu primaarinen anti-TH-vasta-aine (Ross ym. 1981; Semenenko ym. 1986) (laimennos 1/1000) ei myöskään sitoutunut epäspesifisesti muihin hiiren endogeenisiin antigeneihin.

Kontrollivärjäykset osoittivat, että HA-antiseerumin sitoutumista histamiinin ja TH-antiseerumin sitoutumista tyrosiinihydroksylaasiin ei pystytä havaitsemaan ilman sekundaarisia vuohessa tuotettuja fluoresoivia vasta-aineita (GAR568\* ja GAM488\*). Primaari- ja sekundaarivasta-aineiden välillä ei myöskään havaittu ristireaktiivisuutta. Käytetty menetelmä on siis spesifinen ja histaminergisen ja dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän värjäyksen tuloksia voidaan pitää luotettavina.

#### 4.1.1 Histaminergisen ja dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän sijainti suhteessa toisiinsa sekä mahdolliset synaptiset yhteydet

Histamiinisolut ovat keskittyneet hiiren aivoissa TMN:een. Tämä on osoitettu aikaisemmin myös muun muassa rotan (Panula ym. 1984; Vanhala ym. 1994) ja ihmisen (Panula ym. 1990) aivoissa. Aikaisemmissa tutkimuksissa on myös havaittu, että histamiinisolut ja hermosäikeet sijaitsevat TMN:n kaudaaliosassa tiheämmin ja rostraalisessa osassa harvakseltaan (Panula ym. 2000). Tutkimustuloksemme vahvistivat saman myös

hiiren aivoissa. Yksittäisiä histamiinisoluja havaittiin lateraalisisessa ja dorsomediaalisisessa hypotalamuksessa sekä supramammillaarisessa tumakkeessa. Histaminergisen hermotuksen havaitsimme olevan runsainta TMN:n posteriorisisessa, lateraalisisessa, ja ventromediaalisisessa osassa. Lisäksi, kuten aikaisemmissa tutkimuksissa on osoitettu (Vanhala ym. 1994), histamiinisolut ja säikeet muodostavat tarkkarajaisen reunan lateraalisen hypotalamuksen ja mediaalisen mammillaarisen tumakkeen välille. Koronaalileikkeissä on nähtävissä, että hiiren aivojen ventraalisisessa osassa histamiinisoluja on vielä posteriorisen mediaalisen tuberomammillaarisen tumakkeen alueella, mutta branchium pontiksen alueella on enää harvakseltaan histaminergisiä hermosäikeitä. Tutkimuksessamme havaitut TMN:n histamiinisolut vaihtelevat halkaisijaltaan 5-20  $\mu\text{m}$  välillä. Lisäksi yksittäin tai harvakseltaan sijaitsevat histamiinisolut ovat muodoltaan epäsymmetrisempiä kuin TMN:n histamiinisolut. Histamiinia sisältävät vesirakkulat ovat havaittavissa solujen soomaosissa sekä viejähaarakkeissa.

Tutkimustuloksista nähdään, että suurin osa hiiren aivojen dopamiinisoluista sijaitsee keskiaivojen ventraalisisessa tegmentumissa ja mustatumakkeessa, kuten on aikaisemmin osoitettu (Dahlström ja Fuxe 1964; Ungerstedt 1971). Mustatumakkeen, erityisesti superiorisen osan, dopamiinisolut ovat suuria (halkaisijaltaan 15-25  $\mu\text{m}$ ) sekä epäsymmetrisiä. Näistä dopaminergisista soluista suuntautuu pitkiä vahvasti värjäytyneitä hermosäikeitä dorsaalista striatumia kohti. VTA:n dopamiinisolut ovat kooltaan hieman pienempiä (halkaisijaltaan 10-20  $\mu\text{m}$ ) ja ne sijaitsevat huomattavasti tiheämmin suhteessa toisiinsa. Dopamiinisoluja sijaitsee runsaasti tarkastelemallamme alueella myös zona incertassa, ventraalisen periakveduktaalisen harmaan aineen alueella sekä lineaarisessa raphe-tumakkeessa. Hieman heikommalla intensiteetillä havaittiin dopamiinisoluja mediaalisella preoptisella alueella, dorsomediaalisella ja paraventrikulaarisella hypotalamisella alueella ja suprakiasmaattisessa sekä arcuate-tumakkeessa. Myös A14 dopamiinisolut olivat havaittavissa. Yksittäisiä dopamiinisoluja oli nähtävissä posteriorisisessa hypotalamuksessa mammillotalamisen hermoradan ympärillä sekä supramammillaarisessa tumakkeessa. Dopamiinisolujen sijainti näillä kaikilla alueilla on osoitettu aikaisemmissa tutkimuksissa (Dahlström ja Fuxe 1964; Ungerstedt 1971).

Havaitsimme, että histamiinisäikeet hermottavat hiiren aivoissa kaikkia edellä mainittuja dopaminergisiä aivoalueita. VTM:n histamiinisolujen hermosäikeet kulkevat voimakkaasti posteriorisen hypotalamuksen lateraalisessa osassa kohti mustatumaketta ja posteriorisen hypotalamuksen mediaalisessa osassa kohti ventraalista tegmentumia. SNR:n ja VTA:n dopamiinisolujen viejähaarakkeet laskeutuvat puolestaan histamiinisoluja kohden. Nämä dopamiinisäikeet ovat heikosti värjäytyneet eikä synaptisia yhteyksiä dopaminergisten hermosäikeiden ja TMN:n histamiinisolujen kanssa ole havaittavissa tällä alueella. Ericson (1989) tutkimusryhmineen on kuitenkin osoittanut dopaminergisten säikeiden hermottavan rotan TMN:tta ja ehdottanut näiden säikeiden muodostavan synaptisia yhteyksiä histamiinisolujen tuojahaarakkeiden kanssa. Myös mesolimbisen ja mesokortikaalisen hermoradan säikeet ovat tutkimuksessamme heikosti havaittavissa. On mahdollista, että dopamiinisäikeet olisivat paremmin nähtävissä, mikäli hiiren aivojen jälkifiksaatioliuoksessa olisi ollut EDAC:in lisäksi paraformaldehydiä (PFA), jota on käytetty yleisesti TH-positiivisten hermosolujen ja säikeiden stabiloinnissa (Pickel ym. 1975). Toisaalta pelkkää EDAC:ia sisältävän jälkifiksaatioliuoksen on osoitettu olevan histamiinin sitomisessa optimaalisin (Panula ym. 1990) ja TH-positiivisia soluja on pystytty aikaisemminkin havaitsemaan ilman PFA:ta (Vanhala ym. 1994). Tutkimuksemme SNR:n ja VTM:n yhden fokustason kuvista on kuitenkin selkeästi nähtävissä, että histaminergiset säikeet puolestaan kulkevat hyvin lähelle SNR:n dopamiinisoluja ja voivat muodostaa synaptisia yhteyksiä dopamiinisolujen kanssa. Tämä on havaittu aikaisemmin myös rotan aivoleikkeissä (Panula ym. 1989).

Erityisen voimakas histamiinisäikeiden hermotus nousee TMN:stä posteriorisesti dorsoventraalisen periakveduktaalisen harmaan aineen alueelle. Osa näistä histamiinisäikeistä nousee keskiaivojen ylempiin osiin ja osa jatkaa kulkuaan mediaalisesti lineaarisen rapheetumakkeen suuntaan. Värjäys osoitti histaminergisten hermosäikeiden muodostavan todennäköisesti synaptisia yhteyksiä tämän alueen dopamiinisolujen kanssa. Periakveduktaalisen harmaan aineen (PAG) alueen dopamiinisoluilla lienee merkitystä riippuvuuden mekanismeissa, sillä niiden viejähaarakkeiden on osoitettu puolestaan hermottavan muun muassa accumbens- ja manteliumaketta (Hasue ja Shammah-Lagnado 2002) sekä synapsoivan VTA:n dopaminergisten ja GABAergisten hermosolujen kanssa (Omelchenko ja

Sesack 2010). On siis mahdollista, että PAG:n histaminergisten säikeiden aktivaatio säätelee accumbens- ja mantelitumakkeen sekä VTA:n dopaminergisten ja GABAergisten hermosolujen toimintaa epäsuorasti PAG:n alueen hermosolujen aktiivisuutta muuttamalla, ja näin ollen tämä olisi yksi mekanismi, jolla histamiini osallistuu dopamiinin säätelyyn mielihyvävasteeseen.

Tutkimuksemme osoitti histaminergisten hermosäikeiden suuntautuvan TMN:stä myös basaalisen etuavon ventraaliseen striatumiin ja accumbens-tumakkeeseen. Lisäksi mikroskoopilla leikkeitä tarkasteltaessa havaitsimme histaminergisiä ja dopaminergisiä hermosäikeitä myös hajukäämissä ja isoaivokuorella, kuten on havaittu aiemmin myös muun muassa rotan aivoissa (Panula ym. 1989). Hajukäämin dopamiinisolut olivat myös nähtävissä leikkeissä.

Histaminergisten ja dopaminergisten hermosolujen kolokalisaatiota ei havaittu hiiren aivoissa. Tämä tulos on yhtäpitävä aikaisempien, muilla eläinlajeilla tehtyjen immunohistokemiallisten värjäysten tulosten kanssa (Vanhala ym. 1994; Kaslin ja Panula 2001). Histaminergiset ja dopaminergiset hermosolut sijaitsevat tarkastelemallamme alueella lähimpinä toisiaan dorsomedialisella hypotalamisella alueella ja supramammillaarisessa tumakkeessa. Histamiinisäikeet suuntautuvat molemmilla alueilla hyvin lähelle yksittäisiä dopamiinisoluja. Esimerkiksi supramammillaarisen tumakkeen kahden peräkkäisen fokustason kuvissa 15C1 (etummainen) ja 15C2 (takimmainen) histamiinisolun ja dopamiinisolun välissä on vain noin 6  $\mu\text{m}$ , ja näyttäisi siltä, että kuvassa 15C2 on histaminergisen viejähaarakkeen kaksi hermopäätettä. Onkin siis mahdollista, että histamiinisäikeiden ja dopamiinisolujen välillä on synaptisia yhteyksiä näillä aivoalueilla.

#### 4.1.2 Merkitys riippuvuudessa

Osoitimme tutkimuksessamme histaminergisten hermosäikeiden suuntautuvan hiiren aivoissa riippuvuuden kannalta oleellisille aivoalueille, kuten VTA:iin, accumbens-tumakkeeseen ja isoaivokuorelle. Lisäksi havaitsimme erityisen runsaan histaminergisen hermoteloksen periaqueductaalisen harmaan aineen alueella. PAG säätelee muun muassa vi-

reystilaa, kivun, pelon sekä ahdistuksen tuntemuksia ja on osallisena myös opioidien mielihyvävaikutuksessa (Wise 1989; Brandao 1993). Histaminergisiä hermosäikeitä sekä soluja havaittiin myös supramammillaarisessa tumakkeessa, jonka on myös havaittu osaltaan säätelevän mielihyvää (Olds ja Olds 1963).

VTA:n dopamiinisolujen aktivaatio lisää dopamiinin vapautumista accumbens-tumakkeessa ja tämän on arveltu olevan yksi tärkeimmistä mekanismeista mielihyvävaikutuksessa sekä riippuvuuden kehittymisessä. Näiden dopamiinisolujen on osoitettu ilmentävän H<sub>3</sub>-reseptorin mRNA:ta (González-Sepúlveda ym. 2013). Tämä löydös vaatii kuitenkin lisätutkimuksia. Mikäli VTA:n mielihyvää säätelevien dopamiinisolujen solukalvolla on H<sub>3</sub>-heteroreseptoreita, histamiini voi teoriassa estää näiden solujen dopamiinin synteesiä ja vapautumista samalla tavalla kuin se voi estää dopaminergisten hermopäätteiden aktivaatiota striatumissa (Schlicker ym. 1993; Molina-Hernandez ym. 2000). Histamiinin on arveltu myös säätelevän VTA:n dopamiinisolujen toimintaa epäsuorasti VTA:n ja mustatumakkeen GABAergisten hermosäikeiden aktivaation välityksellä (Korotkova ym. 2002). Tutkimuksemme osoitti histamiinisäikeiden hermottavan VTA:ta ja mustatumaketta, mikä tukee tätä teoriaa. Havaitsimme myös, että histaminergiset hermosäikeet hermottavat striatumia. Suurin osa striatumin hermosoluista on GABAergisiä MS-hermosoluja (Gerfen ym. 1990; Le Moine ja Bloch 1995), joiden solukalvoilla on runsaasti postsynaptisia H<sub>3</sub>-reseptoreita (Pollard ym. 1993). Histamiini voi estää epäsuorasti VTA:n dopamiinisolujen toimintaa näiden H<sub>3</sub>-reseptoreiden välityksellä.

Havaitsimme mikroskoopilla leikkeitä tutkiessa, että histamiinisäikeet hermottavat kohdalaisen tiheästi myös isoaivokuorta, mikä tukee histamiinin merkitystä isoaivokuoren toimintojen säätelyssä. Isoaivokuoren dopaminergisen ja glutamatergisen aktiivisuuden on arveltu säätelevän muun muassa riippuvuuteen liittyvää nautintoa tuottavien aineiden tai tapahtumien tavoittelua sekä accumbens-tumakkeen toimintaa (Schultz ym. 2000; Everitt ja Robbins 2005; Quintero 2013). Isoaivokuorelta on löydetty runsaasti H<sub>1</sub>- (Boutenet ym. 1988), H<sub>2</sub>- (Traiffort ym. 1992b) ja H<sub>3</sub>-reseptoreita (Pollard ym. 1993). H<sub>1</sub>- ja H<sub>2</sub>-reseptorien aktivaatio isoaivokuorella vaikuttaa todennäköisesti muun muassa muistin sekä oppimisen toimintoihin (Dai ym. 2007; Zlomuzica ym. 2008). H<sub>3</sub>-reseptorin akti-



vaation vastetta on vaikeampi arvioida, sillä se voi sijaita tällä alueella sekä pre- että post-synaptisesti. H<sub>3</sub>-reseptorin käänteisagonistin pitolisantin (Wakix®) on kuitenkin havattu lisäävän dopaminergistä aktiivisuutta spesifisesti isoaiivokuorella (Ligneau ym. 2007b), mikä puolestaan lisää vireyttä sekä kognitiivisia toimintoja sekä mahdollisesti estää accumbens-tumakkeen säätelemiä motivaatiota lisääviä ja mielihyvää vahvistavia toimintoja (Hyman ym. 2006).

Periakveduktaaliseen harmaaseen aineeseen suuntautuvalla histaminergisellä hermotuksella voi olla tärkeä osuus useiden eri fysiologisten toimintojen esimerkiksi mielihyvävasteen säätelyssä. PAG:n alueelta lähtee runsaasti glutamatergisiä hermosäikeitä VTA:han muodostaen mahdollisia synaptisia yhteyksiä dopamiinisolujen kanssa (Geisler ym. 2007). Näiden hermoyhteyksien onkin ehdotettu olevan osallisena muun muassa opioidien mielihyvävasteessa (Omelchenko ja Sesack 2010). Opioidien on arveltu vaikuttavan VTA:n dopamiinisolujen toimintaan myös epäsuorasti GABAergisiä soluja estämällä (Gysling ja Wang 1983; Johnson ja North 1992), ja niiden onkin havaittu vähentävän GABA:n vapautumista lateraalisen PAG:n alueella *in vivo* (Renno ym. 1992). Opioidien on havaittu myös lisäävän histamiinin vapautumista PAG:n alueella (Barke ja Hough 1993). Koska histamiinin on osoitettu estävän VTA:n dopamiinisolujen toimintaa epäsuorasti muun muassa VTA:n ja mustatumakkeen GABAergisten hermosäikeiden aktivaation välityksellä (Korotkova ym. 2002), on mahdollista, että elimistö pyrkii kompensoimaan opioidien aiheuttamaa GABAergisen aktiivisuuden vähenemistä PAG:n alueella lisäämällä histamiinin vapautumista tällä alueella. Dopamiinisolujen sijainti PAG:ssa on osoitettu myös aikaisemmissa tutkimuksissa (Hasue ja Shammah-Lagnado 2002).

Havaitsimme supramammillaarisessa tumakkeessa histamiini- ja dopamiinisoluja sekä erityisesti histaminergisiä hermosäikeitä. Supramammillaarisen tumakkeen merkitys riippuvuudessa huomattiin jo 1960-luvulla, kun rottien havaittiin itseannostelevan supramammillaariseen tumakkeeseen mielihyvää tuottavia aineita (Olds ja Olds 1963). Myöhemmin rottien on havaittu itsennostelevan GABA<sub>A</sub>-reseptorin antagonistia pikrotoksii-nia useammin ja matalammilla konsentraatiolla SuM:in alueelle kuin anterioriseen VTA:han (Ikemoto 2005). Itseannostelun havaittiin olevan myös estettävissä dopamiini-

niantagonistilla (Ikemoto ym. 2004). Lisäksi SuM:iin annostellun selektiivisen glutamatergisen AMPA-reseptorin agonistin havaittiin lisäävän mikrodialyysillä mitattua solunulkoista dopamiinia ventraalisessa striatumissa. Voimakas histaminerginen hermotus viittaa mahdollisesti siihen, että histamiini säätelee mielihyvävasteita myös SuM:n aivoalueella. SuM:n osuus riippuvuuden mekanismeissa välittynee aikaisempien tutkimusten perusteella suurilta osin GABAergisten ja glutamatergisten vaikutusten kautta (Ikemoto ym. 2004; Ikemoto 2005).

Histamiinin merkitystä PAG:n ja SuM:n hermosolujen säätelyssä ei vielä tunneta. Histaminergisen, dopaminergisen, GABAergisen ja glutamatergisen hermovälittäjäainejärjestelmän laaja-alaisempi anatomian tutkimus immunohistokemiallisin ja *in situ* hybridisaatio -menetelmin sekä tarkemmat mekanistiset tutkimukset antaisivat arvokasta lisätietoa näiden aivoalueiden histamiinin, dopamiinin, GABA:n ja glutamaatin yhteisvaikutuksista, ja niiden merkityksestä riippuvuuden mekanismeissa. PAG:n hermosoluissa on havaittu H<sub>3</sub>-reseptoreita ilmentävää mRNA:ta (Pillot ym. 2002a), mutta esimerkiksi H<sub>3</sub>-reseptorien sijaintia PAG:n eri hermosoluissa ei ole toistaiseksi selvitetty. Dopaminergisen ja histaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän mahdollisia synaptisia yhteyksiä PAG:n ja SuM:n alueella voitaisiin tutkia tarkemmin myös kolmoisvärjäyksellä, jossa anti-HA:n ja anti-TH:n lisäksi käytettäisiin spesifisesti synapseissa sijaitsevaan markkeriin, esimerkiksi DAT-proteiinin, sitoutuvaa primaarista vasta-ainetta. Olisi mielenkiintoista myös selvittää miten esimerkiksi H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistin infuusio suoraan SuM:n tai PAG:n alueelle vaikuttaa päihdyttävien aineiden mielihyvävaikutukseen.

## 4.2 Ehdollistettu paikkahakuisuus

### 4.2.1 H<sub>3</sub>-reseptorivasteista

Tutkijat eivät ole toistaiseksi pystyneet täydellä varmuudella osoittamaan H<sub>3</sub>-heteroreseptoreita dopaminergisissä hermopäätteissä. Näiden reseptorien olemassaolo selittäisi kuitenkin histamiinin dopaminergiseen hermovälittäjäainejärjestelmään kohdistuvaa säätelyvaikutusta. Tällöin H<sub>3</sub>-reseptorien farmakologiset ligandit voivat vaikuttaa dopami-

nergisiin soluvasteisiin muun muassa sitoutumalla suoraan dopamiinisolun H<sub>3</sub>-heteroreseptoriin. Näin ollen H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistit lisäävät dopamiinin vapautumista hermopäätteestä ja H<sub>3</sub>-reseptorien agonistit puolestaan estäisivät dopamiinin vapautumista synapsirakoon, kuten on aiemmin osoitettu (Schlicker ym. 1993; Molina-Hernandez ym. 2000).

Mikäli H<sub>3</sub>-reseptoriligandit sitoutuvat histaminergiseen hermopäätteeseen, vaikutus dopaminergisiin soluvasteisiin on epäsuora ja päinvastainen. H<sub>3</sub>-autoreseptorin antagonistit lisäävät histamiinin vapautumista (Arrang ym. 1983). Tällöin GABAergisten hermosolujen pinnassa oleviin H<sub>3</sub>-reseptoreihin sitoutuu enemmän histamiinia ja GABAerginen hermosolu aktivoituu. GABAergisten hermosolujen aktivaation on havaittu estävän dopamiinin vapautumista dopaminergisestä hermopäätteestä (Korotkova ym. 2002). Histamiinin vapautumisen lisääntyminen voi lisäksi estää suoraan dopamiinin vapautumista histamiinin sitoutuessa dopaminergisissä hermopäätteissä mahdollisesti sijaitseviin H<sub>3</sub>-heteroreseptoreihin. On mahdollista, että H<sub>3</sub>-reseptorin agonistit voivat puolestaan lisätä dopamiinin vapautumista GABAergisten hermosolujen aktivaatiota heikentämällä.

#### 4.2.2 Amfetamiinin mielihyvää ja liikeaktiivisuutta lisäävä vaikutus

Tutkimuksemme osoitti, että amfetamiini (2 mg/kg) aiheuttaa C57BL/6J -kannan hiirille ehdollistetun paikkahakuisuuden neljän ehdollistamiskerran jälkeen. Voimme siis tulkita amfetamiinin aiheuttaneen mielihyvää hiirille. Havaitsimme myös, että amfetamiinilla on liikeaktiivisuutta herkistävä vaikutus. Nämä amfetamiinin vaikutukset on osoitettu aikaisemmissakin tutkimuksissa (Wise ja Bozarth 1985; Wise ja Leeb 1993).

Amfetamiini vaikuttaa keskushermostossa useaan eri hermovälittäjäainejärjestelmään. Sen tiedetään muun muassa estävän dopamiinin, noradrenaliinin ja serotoniinin soluunottoa synapsiraosta estämällä näiden välittäjäaineiden presynaptisella solukalvolla sijaitsevia transporttereita (Seiden ym. 1993). Lisäksi se voi estää VMAT-2:n, MAO-A:n ja MAO-B:n toimintaa ja aktivoita elimistön toimintoja pääsääntöisesti kiihdyttävää glutamatergistä hermovälittäjäainejärjestelmää.

Amfetamiini voi myös lisätä dopamiinin vapautumista synapsirakoon muuttamalla DAT:n toiminnan käänteiseksi (Seiden ym. 1993). DAT:n toiminnan kääntymisen ei ole todettu olevan mahdollista ilman elimistön ulkopuolista dopaminergiseen hermovälittäjäainejärjestelmään vaikuttavaa ligandia (Jones ym. 1998). Vaikka DAT-poistogeenisillä hiirillä dopamiini säilyy synapsiraossa noin 300 kertaa pidempään kuin villityypin hiirillä, amfetamiini vähentää dopamiinin pitoisuutta synapsiraossa DAT-poistogeenisillä hiirillä (Siciliano ym. 2014). Tämä johtuu todennäköisesti dopamiinia vesirakkulaan pakkaavan VMAT-2:n estosta. Lisäksi villityypin hiirillä matalampi annos amfetamiinia lisää dopamiinin vapautumista ja korkeampi annos vähentää sitä. Amfetamiini vaikuttaa siis todennäköisesti matalammilla annoksilla DAT:n toimintaan ja korkeammilla annoksilla VMAT-2:n toimintaan. Amfetamiinin on havaittu aiheuttavan ehdollistettua paikka-hakuisuutta C57BL/6J -kannan hiirillä annoksilla 1 mg/kg ja 3 mg/kg (Thanos ym. 2010). Tämän vuoksi voidaan olettaa, että tutkimuksemme valittu amfetamiinin annos 2 mg/kg kääntää DAT:n toiminnan ja aiheuttaa mielihyvää lisäämällä dopamiinin vapautumista accumbens-tumakkeessa.

Hiirien liikeaktiivisuus lisääntyi merkittävästi jo ensimmäisen amfetamiinin annon vaikutuksesta. Amfetamiini lisää dopamiinin vapautumista siis myös striatumin liikeaktiivisuutta säätelevässä osassa. Dopamiinin vapautuminen striatumissa aktivoi liikeaktiivisuutta lisäävää GABAergistä suoraa hermorataa D<sub>1</sub>-reseptorin välityksellä ja hillitsee liikeaktiivisuutta vähentävän GABAergisen epäsuoran hermoradan toimintaa D<sub>2</sub>-reseptorin välityksellä (Gerfen ym. 1990; Le Moine ja Bloch 1995; Freeze ym. 2013; Sano ym. 2013). Suoran hermoradan GABAergisten hermosolujen aktivoituessa globus palliduksen sisäosan hermosolujen toiminta estyy. Nämä hermosolut ovat levossa toonisesti aktiivisia ja estävät mustatumakkeen liikeaktiivisuutta sääteleviä dopamiinisoluja. Kun globus palliduksen sisäosan hermosolujen toiminta estetään, niiden mustatumakkeen liikeaktiivisuutta sääteleviin dopamiinisoluihin kohdistuva estovaikutus poistuu (disinhibitio). Näin ollen mustatumakkeen dopamiinisolut aktivoituvat ja stimuloivat motorisen aivo-kuoren hermosoluja. Kun dopamiini puolestaan inaktivoi epäsuoran hermoradan GABAergisiä hermosoluja D<sub>2</sub>-reseptorin välityksellä, niiden estävä vaikutus globus palliduksen ulko-osan soluihin estyy. Tällöin globus palliduksen ulko-osan hermosolujen

tooninen, globus palliduksen sisäosaan kohdistuva estävä vaikutus säilyy. Näin ollen dopamiini lisää mustatumakkeen dopamiinisolujen aktiivisuutta myös epäsuoran hermoradan kautta.

Hiirien liikeaktiivisuus lisääntyi jokaisena ehdollistamiskertana edelliseen kertaan verrattuna. Tämä osoittaa, että amfetamiini aiheuttaa toistetuilla annoilla liikeaktiivisuuden herkistymistä. Herkistyminen on ilmiönä tyypillinen amfetamiinille ja lähes kaikille riippuvuutta aiheuttaville lääkeaineille (Robinson ja Becker 1986). Tarkkaa mekanismia miten amfetamiini aiheuttaa herkistymistä ei kuitenkaan tunneta. Koska dopamiinireseptoreista erityisesti GABAergisen suoran hermoradan  $D_1$ -reseptorien arvellaan välittävän herkistymisen vasteita (Nelson ja Killcross 2013), on todennäköistä, että toistetuilla annoilla amfetamiini lisää  $D_1$ -reseptorien määrää (engl. up-regulation) tämän hermoradan soluissa, kuten on osoitettu aikaisemmissa tutkimuksissa (Ujike ym. 1991; Bonhomme ym. 1995). Tällöin dopamiinin  $D_1$ -välitteinen suoran hermoradan aktivaatio voimistunee entisestään. Dopamiinin suoraan hermorataan kohdistuvien vaikutusten tulkintaa vaikeuttaa kuitenkin se, että MS-hermosolujen  $D_1$ -reseptorin aktivaatio voi välittää sekä kiihdyttäviä että estäviä soluvasteita (Hernandez-Lopez ym. 1997). Amfetamiinin on osoitettu aiheuttavan toistetuilla annoilla myös DAT:n ja VMAT-2:n määrän lisääntymistä (Lu ja Wolf 1997; Shilling ym. 1997; Schwendt ym. 2009), mikä voi olla amfetamiinin aiheuttaman liikeaktiivisuuden herkistymisen osasyynä.

$D_1$ -reseptoreita sijaitsee myös muun muassa isoaiivokuorelta striatumiin kulkevilla glutamatergisissä hermopäätteissä, ja dopamiinin sitoutumisen näihin heteroreseptoreihin on havaittu estävän glutamaatin vapautumista synapsirakoon (Nicola ym. 1996). Tutkimustulostemme perusteella olisi voinut olettaa, että  $D_1$ -reseptorin aktivaation välittämä vaste glutamatergisessä hermopäätteessä olisi päinvastainen, sillä yleensä glutamaatti aikaansaa elimistön toimintojen kiihtymisen, kuten liikeaktiivisuuden lisääntymisen. Amfetamiinin on kuitenkin arveltu lisäävän toistetuilla annoilla isoaiivokuorelta alkavien glutamatergisten hermosäikeiden ja dopaminergisten hermosolujen synaptisia yhteyksiä VTA:ssa, mustatumakkeessa ja striatumissa (Wolf 1998; Cador ym. 1999). Tämä voi aiheuttaa näiden aivoalueiden dopamiinisolujen entistä pitkäkestoisemman ja voimakkaamman aktivaation, ja näin ollen dopamiinin vapautumisen lisääntymisen accumbens-

tumakeessa, striatumissa sekä isoaiivokuorella. Amfetamiinin on arveltu aktivoivan dopamiinisoluja myös D<sub>2</sub>-autoreseptorien toimintaa estämällä (Seutin ym. 1991), mikä edelleen voimistaa dopamiinin vapautumista edellä mainituilla aivoalueilla. Nämä muutokset voivat olla tutkimuksessamme havaitun amfetamiinin mielihyvän positiivista vahvistumista ja liikeaktiivisuuden herkistymistä tuottavan vaikutuksen taustalla.

#### 4.2.3 JNJ-39220675 ei estä amfetamiinin aiheuttamaa mielihyvää, mutta vähentää amfetamiinin liikeaktiivisuuden stimulaatiota

H<sub>3</sub>-reseptorin antagonisti JNJ-39220675 läpäisee veri-aivoesteen ja saavuttaa plasman huippupitoisuuden (C<sub>max</sub>) 15 minuuttia ihonalaisesti annetun injektion jälkeen (Galici ym. 2011). Sen puoliintumisaika (T<sub>1/2</sub>) elimistössä on 1,09 tuntia. Lisäksi JNJ-39220675:n (0,3 mg/kg, 3 mg/kg ja 10 mg/kg) H<sub>3</sub>-reseptorien sitoutumisasteeksi on määritetty *ex vivo* noin 90 %. Sitoutumisaste on lähes maksimaalinen vielä 4 tuntia lääkkeen annon jälkeen. Nämä JNJ-39220675:n farmakokineettiset ominaisuudet on määritetty rotilla, mutta oletettavasti ne ovat hiirillä samankaltaiset. Rotan ja hiiren välisiä lajispesifisiä eroja JNJ-39220675:n farmakokineettisissä ominaisuuksissa ei voida kuitenkaan sulkea täysin pois tutkimustuloksia tulkittaessa.

JNJ-39220675 ei vaikuttanut tutkimuksessamme amfetamiinin aiheuttamaan mielihyvään 1 mg/kg:n eikä 10 mg/kg:n annoksella. Se kuitenkin vähensi kummallakin annoksella amfetamiinin lisäämää liikeaktiivisuutta akuutisti ensimmäisen ehdollistamiskerran aikana. Toistetuilla annoilla JNJ-39220675 ei enää vaikuttanut amfetamiinin liikeaktiivisuuden stimulaatiota vähentävästi. Koska amfetamiini lisää dopamiinin pitoisuutta synapsiraossa liikeaktiivisuutta säätelevässä striatumissa (Seiden ym. 1993) ja H<sub>3</sub>-reseptoreita sijaitsee tällä alueella runsaasti (Pollard ym. 1993), JNJ-39220675:n ja amfetamiinin liikeaktiivisuutta säätelevää yhteisvaikutusta tarkastellaan tällä aivoalueella.

Aikaisemmissa tutkimuksissa H<sub>3</sub>-reseptorien antagonistien on havaittu lisäävän dopamiinin synteesiä ja vapautumista synapsirakoon (Schlicker ym. 1993; Molina-Hernandez ym. 2000). Ilmiö voi johtua siitä, että H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistit sitoutuvat suoraan dopa-

minergisten hermopäätteiden mahdollisiin H<sub>3</sub>-heteroreseptoreihin. Tämä teoria on ristiriidassa JNJ-39220675:n amfetamiinin aiheuttamaa liikeaktiivisuutta vähentävän vaikutuksen kanssa. Lisäksi on osoitettu, että JNJ-39220675 ei vaikuta dopamiinin vapautumiseen accumbens-tumakkeessa (Galici ym. 2011), joten JNJ-39220675 välittää siis amfetamiinin hyperaktiivisuutta hillitsevän vasteensa siis todennäköisesti toisen mekanismin kautta. JNJ-39220675:n mahdollisia muita vaikutuskohtia striatumissa ovat presynaptiset H<sub>3</sub>-reseptorit histaminergisissä ja glutamatergisissä hermopäätteissä (Arrang ym. 1983; Pollard ym. 1993; Molina-Hernandez ym. 2001; González-Sepúlveda ym. 2013) sekä postsynaptiset H<sub>3</sub>-reseptorit GABAergisissä MS-hermosoluissa (Pillot ym. 2002a).

Amfetamiini lisää dopamiinin pitoisuutta synapsiraossa, ja tämän on arveltu lisäävän liikeaktiivisuutta pääasiallisesti striatumin MS-hermosolujen suoran hermoradan D<sub>1</sub>-reseptoreita aktivoimalla (Nelson ja Killcross 2013). MS-hermosolujen solukalvoilla on myös H<sub>3</sub>-reseptoreita sekä H<sub>3</sub>-D<sub>1</sub>-heterodimeerejä (Pollard ym. 1993; Ryu ym. 1994; Ferrada ym. 2009). Heterodimeerien D<sub>1</sub>-reseptorin on havaittu linkittyvän G<sub>i</sub>-proteiinin, vaikka yksittäiset D<sub>1</sub>-reseptorit stimuloivat aktivoituessaan G<sub>s</sub>-proteiinia. Voidaan siis olettaa, että dopamiini aktivoi MS-hermosoluja D<sub>1</sub>-reseptorivälitteisesti muun muassa lisäämällä solunsisäistä cAMP:ia. Toisaalta on havaittu, että H<sub>3</sub>-D<sub>1</sub>-heterodimeerin aktivaatio dopamiinin vaikutuksesta aikaansaa solunsisäisen MAPK-signalointiketjun aktivaation, joka johtaa muun muassa CREB-transkriptiotekijän fosforylaatioon (Ferrada ym. 2009; Moreno ym. 2011). Histamiinin sitoutumisen H<sub>3</sub>-D<sub>1</sub>-heterodimeerin H<sub>3</sub>-reseptoriin on arveltu voimistavan dopamiinin vaikutusta.

Mikäli JNJ-39220675 sitoutuu MS-hermosolun H<sub>3</sub>-D<sub>1</sub>-heterodimeeriin se voi aikaansaada heterodimeerin D<sub>1</sub>-reseptorin konformaatioissa muutoksen, joka estää dopamiinin sitoutumisen heterodimeeriin (Ferrada ym. 2009). Tällöin tämän hypoteesin mukaan MAPK-signalointiketjun aktivaatio estyy. Tarkkaa tietoa siitä, miten MS-hermosolujen MAPK-signalointiketjun esto vaikuttaa GABAergisen suoran hermoradan toimintaan, ei ole. On kuitenkin mahdollista, että JNJ-39220675 voi hillitä amfetamiinin liikeaktiivisuutta lisäävää vaikutusta tämän mekanismin kautta, oletettavasti suoran GABAergisen hermoradan toimintaa estämällä.

H<sub>3</sub>-reseptorin ja D<sub>1</sub>-reseptorin monomeerien signalointi MS-hermosolussa on erilainen kuin heterodimeerissä. H<sub>3</sub>-reseptori on linkittynyt G<sub>i</sub>-proteiiniin, joten sen aktivaatio histamiinin vaikutuksesta voi johtaa solunsisäisen cAMP:in laskuun (Ferrada ym. 2009). H<sub>3</sub>-reseptorin aktivaatio voi estää myös G<sub>s</sub>-proteiiniin linkittyntä D<sub>1</sub>-reseptoria, ja näin ollen vähentää solunsisäisen cAMP:in määrää entisestään. Tämän perusteella voitaisiin ajatella, että postsynaptisen H<sub>3</sub>-reseptorin salpaus JNJ-39220675:lla voi puolestaan lisätä solunsisäisen cAMP:in määrää ja aktivoida suoraan hermorataan kuuluvaa GABAergistä MS-hermosolua. Tämä hypoteesi ei ole kuitenkaan yhteneväinen tutkimustulostemme kanssa.

Histamiinin on havaittu lisäävän GABA:n vapautumista interneuroneista H<sub>3</sub>-heteroreseptorin välityksellä (Korotkova ym. 2002). Mikäli JNJ-39220675 sitoutuu tähän H<sub>3</sub>-heteroreseptoriin, se voi vähentää GABA:n vapautumista interneuroneista ja näin ollen lisätä dopamiinin vapautumista synapsirakoon. Tämäkään mekanismi ei tue tulostamme JNJ-39220675:n estävästä vaikutuksesta amfetamiinin lisäämään liikeaktiivisuuteen ensimmäisellä ehdollistamiskerralla, mutta se voi osaltaan selittää sen miksi JNJ-39220675 ei vaikuttanut amfetamiinin mielihyvää tuottavaan vaikutukseen.

Edellä tarkastelimme JNJ-39220675:n mahdollisia postsynaptisia sitoutumiskohtia. Tutkimustulosten tarkastelua monimutkaistaa se, että JNJ-39220675 voi mahdollisesti sitoutua myös histaminergisten hermopäätteiden H<sub>3</sub>-autoreseptoreihin (Arrang ym. 1983). Tämä puolestaan lisää histamiinin vapautumista synapsirakoon. Histamiinin ja JNJ-39220675:n postsynaptisiin H<sub>3</sub>-reseptoreihin sitoutumisen aikaansaamat vasteet ovat päinvastaiset. Mikäli JNJ-39220675 lisää histamiinin vapautumista, se voi kuitenkin hillitä amfetamiinin aiheuttamaa liikeaktiivisuuden stimulaatiota muun muassa vähentämällä dopamiinin vapautumista dopaminergisista hermopäätteistä histamiinin potentiaalisen H<sub>3</sub>-heteroreseptorivälitteisen aktivaation välityksellä tai lisäämällä GABA:n vapautumista interneuroneista jälleen histamiinin H<sub>3</sub>-heteroreseptorivälitteisen aktivaation seurauksena. Lisäksi JNJ-39220675 voi hillitä amfetamiinin liikeaktiivisuuden stimulaatiota sitoutumalla glutamatergisen hermopäätteen H<sub>3</sub>-heteroreseptoreihin, ja näin ollen vähentäen elimistön toimintoja kiihdyttävän glutamaatin vapautumista synapsirakoon (González-Sepúlveda ym. 2013).



Havaitsimme myös amfetamiinin liikeaktiivisuutta lisäävän vaikutuksen voimistuvan toistettujen antojen seurauksena. JNJ-39220675 ei vaikuttanut amfetamiinin aiheuttamaan liikeaktiivisuuden lisääntymiseen enää neljännellä ehdollistamiskerralla. Amfetamiinin herkistävä vaikutus toistetuilla annoilla johtunee muun muassa VTA:n, mustatumakkeen sekä striatumien elimistön toimintoja kiihdyttävien glutamatergisten synapsien lisääntymisestä (Wolf 1998). Todennäköisesti ensimmäisen ehdollistamiskerran JNJ-39220675:n estävä vaikutus amfetamiin liikeaktiivisuutta lisäävään vaikutukseen ei yksinkertaisesti ole riittävän voimakas estämään amfetamiinin toistettujen antojen aiheuttamaa voimakasta liikeaktiivisuuden herkistymistä.

Vaikka JNJ-39220675 pystyy estämään alkoholin tuottaman mielihyvävaikutuksen (Galici ym. 2011; Vanhanen ym. 2013), se ei vaikuttanut amfetamiinin mielihyvävaikutukseen. Tämä johtunee osittain amfetamiinin omia vaikutuksiaan voimistavasta ominaisuudesta ja osittain amfetamiinin farmakologisen vaikutusprofiilin laajuudesta (Seiden ym. 1993). Teoriassa on myös mahdollista, että JNJ-39220675 sitoutuu accumbens-tumakkeen dopaminergisen hermopäätteen oletettuun H<sub>3</sub>-heteroreseptoriin, lisää dopamiinin vapautumista, ja näin ollen jopa voimistaa amfetamiinin mielihyvää tuottavaa vaikutusta. Näin tuskin kuitenkaan on, koska JNJ-39220675 - amfetamiini ja keittosuolaliuos - amfetamiini käsittelyryhmien välillä ei ollut tilastollista eroa. Tämä hypoteesi on myös ristiriidassa sen kanssa, että JNJ-39220675 vähensi amfetamiinin lisäämää liikeaktiivisuutta ensimmäisellä ehdollistamiskerralla.

H<sub>3</sub>-reseptorien antagonistien on havaittu myös parantavan kognitiivisia toimintoja (Sander ym. 2008). Hiiret voivat siis JNJ-39220675:n vaikutuksesta oppia liittämään amfetamiinin annon tiettyyn lattiamateriaalin entistä voimakkaammin. On siis teoriassa mahdollista, että jos JNJ-39220675 vähentäisi amfetamiinin mielihyvävaikutusta, hiiret osaisivat liittää vähentyneenkin mielihyvävaikutuksen paremmin tiettyyn ympäristöön, ja näin ollen JNJ-39220675:n vaikutus ei tulisi ilmi ehdollistetun paikkahakuisuuden menetelmässä. JNJ-39220675 ei kuitenkaan voimistanut amfetamiinin aikaansaamaa ehdollistettua paikkahakuisuutta, joten sen mahdollinen kognitiivisia toimintoja parantava vaikutus ei liene kovin oleellinen tässä tutkimuksessa.

JNJ-39220675:n vaikutusten tulkintaa vaikeuttaa se, että H<sub>3</sub>-reseptorit voivat sijaita striatumissa laajasti eri hermosoluissa sekä pre- että postsynaptisesti (Pollard ym. 1993). JNJ-39220675:n sitoutuminen eri H<sub>3</sub>-reseptoreihin voi aiheuttaa hermosoluissa eri vasteita, jotka voivat olla jopa päinvastaisia. H<sub>3</sub>-reseptorilla on lisäksi havaittu eri alamuotoja (Hancock ym. 2003) ja JNJ-39220675:n affiniteetti näihin eri alamuotoihin on tuntematon. On otettava myös huomioon, että amfetamiinin synapsirakoon vapauttama dopamiini voi sitoutua striatumissa muun muassa D<sub>1</sub>- ja D<sub>2</sub>-reseptoriin (Missale ym. 1998) sekä D<sub>1</sub>-D<sub>2</sub>- (Perreault ym. 2010), H<sub>3</sub>-D<sub>1</sub>- (Ferrada ym. 2009) ja H<sub>3</sub>-D<sub>2</sub>-heterodimeereihin (Ferrada ym. 2008). Kaikki nämä dopamiinireseptorien monomeerit ja heterodimeerit voivat signaloida eri mekanismien välityksellä. Esimerkiksi dopamiinin sitoutuminen D<sub>1</sub>- tai D<sub>2</sub>-reseptoriin voi joko aktivoida tai estää solun toimintaa joko lisäämällä tai vähentämällä solunsisäistä cAMP:ia (Missale ym. 1998).

Tarkkaa mekanismia, miten JNJ-39220675 estää akuutisti amfetamiinin liikeaktiivisuutta, ja miksi JNJ-39220675 ei vaikuta amfetamiinin mielihyvävaikutukseen, ei pystytä näiden tutkimustulosten perusteella osoittamaan. On kuitenkin todennäköistä, että JNJ-39220675 sitoutuu MS-hermosolujen postsynaptisiin H<sub>3</sub>-reseptoreihin, ja sen amfetamiinin liikeaktiivisuutta lisäävän vaikutuksen akuutti hillitseminen liittyy striatumin suoran GABAergisen hermoradan estoon ja epäsuoran GABAergisen hermoradan aktivaatioon.

H<sub>3</sub>- ja D<sub>1</sub>-reseptorien yhteisvaikutusten tarkempi selvittäminen vaatii kuitenkin *in vitro* reseptoritason tutkimuksia ja spesifisemmin pelkästään D<sub>1</sub>-reseptoriin sitoutuvan farmakologisen ligandin. Olisi myös oleellista selvittää laajemmin millä aivoalueilla sekä missä eri soluissa eri H<sub>3</sub>-reseptorien alamuodot sijaitsevat ja millä affiniteetilla spesifiset H<sub>3</sub>-reseptorien farmakologiset ligandit sitoutuvat H<sub>3</sub>-reseptorien eri alamuotoihin. Teoriassa voitaisiin ajatella, että ideaalinen riippuvuuden hoitoon tarkoitettu H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistit sitoutuisi VTA:n histaminergisten hermopäätteiden H<sub>3</sub>-reseptoreihin, lisäisi histamiinin vapautumista ja hillitsisi tällöin VTA:n dopamiinisolujen aktivaatiota mahdollisten H<sub>3</sub>-heteroreseptorien välityksellä. Riskinä tässä lähestymistavassa on mahdollinen anhedonia ja aversio, mikäli histamiinin dopaminergisiin hermosoluihin kohdistuva estovaikutus olisi liian voimakas. Asiaa monimutkaistaa myös se, että VTA:n dopamiinisolujen toiminta on myös monen muun eri hermovälittäjäainejärjestelmän säätelyn alaista.

Luultavasti striatumin H<sub>3</sub>-D<sub>1</sub>- ja H<sub>3</sub>-D<sub>2</sub>-heterodimeerien toimintaan vaikuttaminen olisi hienovaraisempi tapa säätää dopamiinin liikeaktiivisuuden stimulaatiota ja mielihyvävai-  
kutusta.

H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistien on osoitettu olevan tehokkaita kohentamaan eri keskusher-  
mostosairauksien kognitiivisia häiriöitä (Sander ym. 2008). Ne voivat prekliinisten tutki-  
mustulosten perusteella olla tulevaisuudessa lisäksi mahdollisia lääkeainekandidaatteja  
alkoholiriippuvuuden hoidossa (Nuutinen ym. 2011a). Prekliinisten kokeiden tulokset  
H<sub>3</sub>-reseptorien antagonistien vaikutuksesta psykostimulanttien aiheuttamaan mielihyvään  
sekä liikeaktiivisuuden lisääntymiseen ovat olleet kuitenkin ristiriitaisia (Ellenbroek  
2013). Erikoistyon tutkimuksessa käytetty JNJ-39220675 on eläinkokeiden perusteella  
potentiaalinen uusi lääkeainekandidaatti alkoholiriippuvuuden hoidossa (Galici ym.  
2011; Vanhanen ym. 2013). Se ei välttämättä ole kuitenkaan riittävän tehokas estämään  
voimakkaasti herkistävän amfetamiinin aiheuttamaa riippuvuutta. JNJ-39220675:n mah-  
dollisesta potentiaalista tulevaisuuden amfetamiiniriippuvuuden läkehoidossa ei voida  
kuitenkaan tehdä johtopäätöksiä pelkästään tämän tutkimuksen pohjalta muun muassa  
siksi, että käytimme tutkimuksessa vain yhtä amfetamiinin annosta sekä yhtä eläinmallia.

#### 4.2.4 JNJ-39220675 ei vaikuta kvinpirolin aiheuttamaan aversioon ja liikeaktiivisuuden vähenemiseen

Tutkiessamme kvinpirolin vaikutuksia ehdollistetun paikkahakuisuuden menetelmällä  
havaitimme sen aiheuttavan ehdollistettua paikka-aversiota sekä liikeaktiivisuuden vä-  
henemistä. JNJ-39220675 esikäsittely ei vaikuttanut kvinpirolin vaikutuksiin. Aikaisem-  
piin tutkimuksiin verrattaessa tutkimustulokset ovat ristiriitaisia. Rotilla kvinpirolin on  
esimerkiksi havaittu aiheuttavan paikkahakuisuutta (Hoffman ym. 1988) sekä vähentävän  
että lisäävän eläinten liikeaktiivisuutta (Eilam ja Szechtman 1989; Horvitz ym. 2001). On  
siis mahdollista, että kvinpiroli aiheuttaa erilaisia lajispesifisiä käyttäytymisvasteita.  
C57BL/6J -kannan hiirillä kvinpirolin on havaittu aiheuttavan akuutisti liikeaktiivisuuden  
vähenemistä (Halberda ym. 1997), ja toisaalta liikeaktiivisuuden lisääntymistä yli tunnin  
päästä annostelusta (Luque-Rojas ym. 2013).

Kvinpiroli on sekä D<sub>2</sub>- että D<sub>3</sub>-reseptorin selektiivinen agonisti (Levant ym. 1992). Sitä on käytetty farmakologisena ligandina tutkittaessa dopamiinireseptorien, lähinnä D<sub>2</sub>-reseptorin, välittämiä vaikutuksia *in vitro* ja *in vivo*. D<sub>2</sub>- ja D<sub>3</sub>-reseptoreita sijaitsee muun muassa VTA:ssa, accumbens-tumakkeessa sekä striatumissa sekä pre- että postsynaptisilla solukalvoilla (Fremeau ym. 1991). Aikaisemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että D<sub>2</sub>-autoreseptorien aktivaatio vähentää dopamiinin vapautumista hermopäätteestä (Hoffman ja Cubeddu 1982). Myös D<sub>3</sub>-reseptorin aktivaation on arveltu aiheuttavan lievää liikeaktiivisuuden vähenemistä (Joseph ym. 2002).

Kvinpirolin aversiota aiheuttava vaikutus on selitettävissä D<sub>2</sub>-autoreseptorien aktivaatiolla, minkä on havaittu estävän striatumissa dopamiinin vapautumista ja mahdollisesti myös synteesiä (Hoffman ja Cubeddu 1982; Lindgren ym. 2001). On siis mahdollista, että kvinpiroli estää dopamiinin vapautumista accumbens-tumakkeessa dopaminergisten hermopäätteiden D<sub>2</sub>-autoreseptoreita aktivoimalla. Myös VTA:ssa sijaitsee runsaasti D<sub>2</sub>-autoreseptoreita (Meador-Woodruff ym. 1989), joten kvinpiroli voi estää dopamiinisoluja myös suoraan VTA:ssa. Kvinpiroli voi sitoutua myös presynaptisiin D<sub>3</sub>-autoreseptoreihin, mutta todennäköisesti sen vaikutus välittyy D<sub>2</sub>-autoreseptorien kautta, sillä kvinpirolin aiheuttama dopamiinin vapautumisen estovaikutus on D<sub>3</sub>-reseptorin suhteen poistogeenisillä hiirillä vain hieman vähäisempi verrattuna kontrollihiiriin (Joseph ym. 2002). Lisäksi on havaittu, että D<sub>2</sub>-reseptorin suhteen poistogeenisillä hiirillä kvinpiroli ei vaikuta dopamiinin vapautumiseen (Schmitz ym. 2002). Todennäköisesti kvinpiroli välittää vaikutuksensa tässä tutkimuksessa nimenomaan D<sub>2S</sub>-reseptorin kautta, sillä sen on havaittu osoitettu olevan yleisin presynaptinen dopamiinireseptori aivoissa (De Mei ym. 2009).

On myös mahdollista, että kvinpirolin aversiivinen vaikutus välittyy accumbens-tumakkeen GABAergisten MS-hermosolujen solukalvoilla sijaitsevien postsynaptisten D<sub>2</sub>-reseptorien kautta, sillä näiden hermosolujen aktivaation on arveltu estävän epäsuorasti VTA:n dopamiinisolujen toimintaa (Xia ym. 2011). Kvinpiroli voi siis mahdollisesti vähentää dopamiinin vapautumista accumbens-tumakkeessa myös tämän mekanismin kautta ja aiheuttaa siksi aversiota.

Kvinpiroli aiheuttaa todennäköisesti tutkimuksessamme havaitun liikeaktiivisuutta vähentävän vaikutuksensa sitoutumalla striatumin dopaminergisten hermopäätteiden D<sub>2</sub>-autoreseptoreihin ja vähentämällä dopamiinin vapautumista synapsirakoon. On myös mahdollista, että kvinpiroli estää dopamiinin synteesiä suoraan mustatumakkeen dopamiinisoluuissa. Teoriaa D<sub>2</sub>-autoreseptorin osallistumisesta kvinpirolin liikeaktiivisuutta vähentävään vaikutukseen tukee muun muassa se, että kvinpirolin on havaittu lisäävän liikeaktiivisuutta hiirillä, joilla presynaptisen dopamiinin vapautuminen oli estetty VMAT-2:n toimintaa estävällä reserpiinillä (Ferrada ym. 2008). Tämä viittaisi kvinpirolin aiheuttavan liikeaktiivisuuden lisääntymistä postsynaptisiin D<sub>2</sub>-reseptoreihin sitoutuessaan. Tämä postsynaptinen vaste voi välittyä D<sub>2</sub>-reseptorin aktivaation välittämästä GABAergisen epäsuoran hermoradan estosta. Kvinpiroli voi vähentää liikeaktiivisuutta myös vaikuttamalla striatumin glutamatergisen hermovälittäjäainejärjestelmän toimintaan. Kvinpirolin onkin havaittu muun muassa vähentävän striatumin glutamatergistä aktiivisuutta pääasiallisesti glutamatergisen hermopäätteen D<sub>2S</sub>-heteroreseptorin välityksellä (Centonze ym. 2004).

Kvinpirolin annoksella on osoitettu olevan merkitystä liikeaktiivisuuden muutokseen. Sen on havaittu aiheuttavan rotilla matalalla 0,5 mg/kg annoksella liikeaktiivisuuden vähenemistä ja suurella 8 mg/kg annoksella ensin liikeaktiivisuuden vähenemistä ja myöhemmin liikeaktiivisuuden lisääntymistä (Eilam ja Szechtman 1989). Tutkimuksessamme mittasimme hiirien liikeaktiivisuutta vain ensimmäisten 30 minuutin ajalta kvinpirolin annon jälkeen. Sillä ajalla kvinpiroli aiheutti liikeaktiivisuuden vähenemistä. Emme tiedä, mikä kvinpirolin vaikutus olisi ollut yli 30 minuutin jälkeen sen annosta. Todennäköisesti käyttämämme kvinpirolin annos 0,5 mg/kg oli kuitenkin riittävän matala, jotta hiirien liikeaktiivisuus ei olisi lisääntynyt merkittävästi niiden normaaliin liikeaktiivisuuteen verrattuna. Liikeaktiivisuuden vähenemisen on arveltu johtuvan sekä matalilla että korkeilla annoksilla D<sub>2</sub>-autoreseptorien estosta (Eilam ja Szechtman 1989), joten kvinpirolin välittämä liikeaktiivisuuden lisääntyminen johtuu todennäköisesti postsynaptisesta soluvasteesta. On mahdollista, että kvinpirolin vaikutuksen siirtyminen presynaptisista hermopäätteistä postsynaptisille kalvoille johtuu esimerkiksi D<sub>2</sub>-autoreseptorin toiminnan saturoitumisesta.

Oletetaan, että kvinpiroli estää dopamiinin vapautumista striatumissa. Tällöin suoran liikeaktiivisuutta stimuloivan hermoradan aktiivisuus vähenee ja epäsuoran liikeaktiivisuutta hillitsevän hermoradan aktiivisuus lisääntyy estävän postsynaptisen D<sub>2</sub>-aktivaation vähenemisen seurauksena. Mikäli JNJ-39220675 sitoutuu histaminergisen hermopäätteen H<sub>3</sub>-autoreseptoriin, on mahdollista, että lisääntynyt histamiinin vapautuminen voimistaa kvinpirolin dopamiinin vapautumisen estovaikutusta dopaminergisessä hermopäätteessä mahdollisen H<sub>3</sub>-heteroreseptorin välityksellä. Toisaalta vaste voi olla päinvastainen, mikäli JNJ-39220675 sitoutuu suoraan dopaminergisen hermopäätteen mahdolliseen H<sub>3</sub>-heteroreseptoriin. Tutkimuksemme ei kuitenkaan osoittanut JNJ-39220675 - kvinpiroli ja keittosuolaliuos - kvinpiroli käsittelyryhmien välisiä eroja liikeaktiivisuudessa. Vaikka JNJ-39220675 tutkimustulostemme perusteella vähentää akuutisti synapsiraon lisääntyneen dopamiinin aiheuttamaa liikeaktiivisuuden lisääntymistä, sillä ei näyttäisi olevan vaikutusta synapsiraon vähentyneen dopamiinin aiheuttamaan liikeaktiivisuuden väheneemiseen.

#### 4.3 JNJ-39220675 estää kvinpirolin toistettujen antojen aiheuttamaa liikeaktiivisuuden vähenemisen desensitisaatiota

Tutkimme JNJ-39220675:n vaikutusta kvinpirolin aiheuttamaan liikeaktiivisuuden väheneemiseen tarkemmin liikeaktiivisuuden tutkimuksessa, jossa hiiret altistettiin kvinpirolin toistetuille annoille. Havaitimme kvinpirolin aiheuttavan toistetuilla annoilla liikeaktiivisuuden vähenemisen desensitisaatiota. Desensitisaatio on toistettujen lääkeaineantojen aiheuttama päinvastainen solusignaaloinnin muutos verrattuna herkistymiseen. Tutkimuksemme osoittaa myös JNJ-39220675:n estävän kvinpirolin aiheuttamaa liikeaktiivisuuden vähenemisen desensitisaatiota.

Sekä D<sub>1</sub>- (Ng ym. 1994) että D<sub>2</sub>-reseptorien (Barton ym. 1991) on havaittu desensitisoituvan toistetun agonistin annon jälkeen. Tutkimuksemme ensimmäisenä päivänä kvinpiroli aiheutti ensin voimakasta liikeaktiivisuuden vähenemistä. Viidentenä päivänä kvinpirolikäsitteilyryhmän ja kontrolliryhmän hiirien välisessä liikeaktiivisuudessa ei ollut enää tilastollista merkitsevyyttä. Kvinpiroli ei siis oletettavasti enää viidentenä päivänä estä dopamiinin vapautumista yhtä voimakkaasti. Syynä tähän voi olla esimerkiksi D<sub>2</sub>-

autoreseptorin toiminnan desensitisaatio striatumissa. Tämä kvinpirolin mahdollisesti aiheuttama DIR-ilmio (engl. dopamine inhibition reversal, DIR) on havaittu myös aikaisemmissa tutkimuksissa (Nimitvilai ja Brodie 2010). Desensitisaatio voi johtua muun muassa D<sub>2</sub>-autoreseptorien vähenemisestä (engl. down-regulation) VTA:ssa, mustatummakkeessa ja striatumissa, heikentyneestä affiniteetistä kvinpirolia kohtaan tai aktivaation aiheuttamasta solusignaloinnin muutoksesta. D<sub>1</sub>-kaltaisten dopamiinireseptorien ja G<sub>q</sub>-proteiinivälitteisten toisioläheittäjäjärjestelmien, muun muassa PI3K- ja PKC-toisioläheittäjäjärjestelmien, aktivaation on arveltu liittyvän kvinpirolin toistettujen antojen aiheuttamaan D<sub>2</sub>-autoreseptorien desensitisaatioon (Nimitvilai ym. 2013). Keskushermoston välittäjäaineista PI3K- ja PKC-toisioläheittäjäjärjestelmiä aktivoi muun muassa serotoniini ja neurotensiini.

On myös mahdollista, että kvinpiroli ei aiheuta toistetuilla annoilla presynaptisten D<sub>2</sub>-autoreseptorien desensitisaatiota vaan postsynaptisten dopamiinireseptorien herkistymistä, kuten on havaittu aikaisemmin rotilla tehdyissä kokeissa (Einat ja Szechtman 1993; Kostrzewa ym. 2004). Tällöin oletettavasti dopamiinin pitoisuus synapsiraossa pysyy samana toistettujen antojen aikana, mutta esimerkiksi postsynaptisten dopamiinireseptorien määrä MS-hermosoluissa voi lisääntyä (engl. up-regulation), jolloin vähäisempikin dopamiini aikaansaa voimakkaampia postsynaptisia vasteita. Tämän teorian pohjalta olisi mahdollista, että kvinpiroli aikaansaa toistetuilla annoksilla liikeaktiivisuuden vähenemisen desensitisaatiota esimerkiksi GABAergisen epäsuoran hermoradan toimintaa estämällä.

JNJ-39220675 ei vaikuttanut kvinpirolin aiheuttamaan liikeaktiivisuuden muutokseen tutkimuksen ensimmäisenä päivänä, mutta viidentenä päivänä JNJ-39220675 esikäsittely esti kvinpirolin liikeaktiivisuuden vähenemisen desensitisaatiota. JNJ-39220675 vastustaa siis mahdollisesti DIR-ilmioista johtuvaa dopamiinin vapautumisen elpymistä tai dopamiinin postsynaptisia vasteita tai muokkaa kvinpirolin vasteita MS-hermosolujen postsynaptisilla solukalvoilla.

JNJ-39220675 voi vaikuttaa esimerkiksi serotoniinin ja neurotensiinin vapautumiseen hermosoluista, ja näin ollen PI3K- ja PKC-toisiohjaajajärjestelmiin. Tämä signaalintie ei ole kuitenkaan toistaiseksi kovin hyvin tunnettu. JNJ-39220675 voi myös vastustaa kvinpirolin vaikutusta muun muassa hillitsemällä dopamiinin vapautumista ja postsynaptisia vasteita sekä lisäämällä GABAergistä aktiivisuutta. MS-hermosolujen postsynaptisten D<sub>2</sub>-reseptorien dopamiinivälitteisen aktivaation arvellaan johtavan epäsuoran hermoran toiminnan estymiseen (Le Moine ja Bloch 1995; Sano ym. 2013). On siis esimerkiksi mahdollista, että JNJ-39220675:n histaminergisestä hermopäätteestä vapautuva histamiini sitoutuu MS-hermosolujen H<sub>3</sub>-D<sub>2</sub>-heterodimeerin H<sub>3</sub>-reseptoriosaan, jolloin heterodimeerin affiniteetti jo entuudestaan vähäistä dopamiinia kohtaan heikkenee (Ferrada ym. 2008). Tällöin GABAergisen epäsuoran hermoran aktiivisuus lisääntyy ja liikeaktiivisuus vähenee. Näin ollen, vaikka dopamiinin vapautuminen elpyisi hitaasti D<sub>2</sub>-autoreseptorin desensitisaation vuoksi tai dopamiinin soluvasteet voimistuisivat postsynaptisten dopamiinireseptorien herkistymisen seurauksena, histamiinin postsynaptinen jarruttava vaikutus estäisi liikeaktiivisuuden lisääntymisen. Toisaalta mikäli JNJ-39220675 sitoutuu postsynaptisesti H<sub>3</sub>-reseptoriosaan, se voi estää antagonistina koko heterodimeerin toiminnan ja välittää saman soluvasteen kuin histamiini.

H<sub>3</sub>-antagonistien estovaikutusta kvinpirolin toistettujen antojen aiheuttamaan liikeaktiivisuuden vähenemisen desensitisaatioon ei ole osoitettu aikaisemmissa tutkimuksissa. Havaitsemamme ilmiö on mielenkiintoinen ja tukee aikaisempia tutkimustuloksia histamiinin dopaminergiseen hermovälittäjäainejärjestelmään kohdistuvasta estävästä säätelyvaikutuksesta.

#### 4.4 Pohdintaa neuroanatomian ja käyttäytymiskokeiden tuloksista

Erikoistyön neuroanatomian tutkimus osoitti histaminergisten hermosäikeiden lähtevän hiiren aivoissa TMN:stä ja hermottavan erityisen voimakkaasti posteriorisen hypotalamuksen SuM:ia sekä keskiaivojen mustatumaketta ja VPAG:a. Myös VTA:n alueelle nousee kohtalaisen voimakas histaminerginen hermostus. Histaminergiset hermosäikeet sijaitsevat näillä alueilla hyvin lähelle dopamiinisoluja ja muodostavat niiden kanssa



mahdollisesti synaptisia yhteyksiä. H<sub>3</sub>-reseptoreita on osoitettu sijaitsevan SuM:ssa, mustatumakkeessa, VPAG:ssa sekä VTA:ssa (Pollard ym. 1993; Pillot ym. 2002a; González-Sepúlveda ym. 2013). Näitä reseptoreita sijaitsee muun muassa histaminergisissä sekä mahdollisesti myös dopaminergisissä hermopäätteissä (Arrang ym. 1983; Schlicker ym. 1993; Molina-Hernandez ym. 2000; Doreulee ym. 2001). Mikroskoopilla hiiren aivoleikeita tutkittaessa havaitsimme dopamiinihermosäikeiden kulkevan VTA:sta ventraaliseen striatumiin (mesolimbinen hermorata) ja mustatumakkeesta dorsaaliseen striatumiin (nigrostriataalinen hermorata). Myös striatumissa on runsaasti H<sub>3</sub>-reseptoreita, jotka ovat pääsääntöisesti postsynaptisia (Pollard ym. 1993). Histamiini voi siis säädellä näillä aivoalueilla H<sub>3</sub>-reseptorivälitteisesti dopamiinin soluvasteita esimerkiksi GABAergisessä suorassa ja epäsuorassa hermoradassa, ja näin ollen vaikuttaa dopamiinin säätelemiin elimistön fysiologisiin toimintoihin.

Käyttäytymiskokeissa käytetty H<sub>3</sub>-reseptorin antagonisti JNJ-39220675 välittää akuutin amfetamiinin liikeaktiivisuuden lisääntymisen eston ja kvinpirolin toistettujen antojen liikeaktiivisuuden vähenemisen desensitisaation eston todennäköisesti histamiinisäikeiden voimakkaasti hermottaman nigrostriataalisen hermoradan kautta. Se ei kuitenkaan tutkimustulostemme mukaan vaikuta amfetamiinin mielihyvävaikutukseen eikä kvinpirolin aversiiviseen vaikutukseen, vaikka neuroanatomian tutkimuksessa havaitsimme histamiinisäikeiden hermottavan myös mielihyvää ja aversiota säätelevää VTA:ta. On siis myös mahdollista, että nigrostriataalisen ja mesolimbisen hermoradan toimintaa säätelevät H<sub>3</sub>-reseptorit ovat pääsääntöisesti eri alamuotoja (Drutel ym. 2001), ja JNJ-39220675:lla on voimakkaampi affiniteetti nigrostriataalisen hermoradan toimintaa sääteleviin H<sub>3</sub>-reseptorialamuotoihin.

Teoriassa JNJ-39220675 voi vaikuttaa VTA:n dopamiinisolujen toimintaan myös epäsuorasti SuM:n histaminergisten hermopäätteiden H<sub>3</sub>-reseptoreihin sitoutumalla (Pollard ym. 1993). Tällöin JNJ-39220675:n vaikutuksesta vapautunut histamiini voisi lisätä SuM:n GABAergista aktiivisuutta (Korotkova ym. 2002), jonka on arveltu puolestaan säätelevän VTA:n dopamiinisolujen aktiivisuutta (Ikemoto ym. 2004; Ikemoto 2005; Shin ja Ikemoto 2010). Tämä JNJ-39220675:n hypoteettinen vaikutus ei ole kuitenkaan,

ainakaan tämän erikoistyön kokeellisen osan tutkimustulosten perusteella, riittävän voimakas kumoamaan amfetamiinin aiheuttamaa mielihyvää.

JNJ-39220675:n on osoitettu estävän alkoholin mielihyvävaikutusta (Galici ym. 2011; Vanhanen ym. 2013) Alkoholin mielihyvävaikutus välittyy osittain elimistön opioidijärjestelmän kautta (Herz 1997). Opioidijärjestelmään kuuluu VTA, accumbens-tumake ja mahdollisesti myös PAG:n alue (Wise 1989; Brandao 1993). PAG:n alueelta lähtee glutamatergisiä ja GABAergisiä hermosäikeitä, jotka muodostavat synapseja VTA:n dopaminergisten hermosolujen kanssa (Geisler ym. 2007; Omelchenko ja Sesack 2010). Tutkimustuloksemme osoittivat histaminergisen hermostuksen olevan erityisen voimakasta PAG:n alueella. On siis mahdollista, että JNJ-39220675 välittää alkoholin mielihyvää estävän vaikutuksensa myös osittain PAG:n GABAergistä ja/tai glutamatergistä aktivaatiota muuttamalla toistaiseksi tuntemattoman mekanismin kautta. Amfetamiinin pääasiallinen farmakologinen vaikutus perustuu DAT-proteiinin toiminnan estoon/kääntämiseen accumbens-tumakkeessa (Seiden ym. 1993). Sen vaikutuksia elimistön opioidijärjestelmään ei tunneta kovin hyvin (Guterstam ym. 2013). Muun muassa tämä alkoholin ja amfetamiinin vaikutusmekanismien eroavaisuus voi olla yksi selittävästä tekijöistä, miksi JNJ-39220675 estää alkoholin aiheuttamaa mielihyvää, mutta ei nykyisten tutkimustulosten perusteella vaikuta amfetamiinin aiheuttamaan mielihyvävaikutukseen.

## 5 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimustuloksemme vahvistavat histaminergisen ja dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän neuroanatomian linkittyvän toisiinsa nisäkkään aivoissa. Havaitimme hiiren aivoissa näiden hermovälittäjäainejärjestelmien mahdollisia synaptisia yhteyksiä muun muassa mustatumakkeessa, supramammillaarisessa tumakkeessa, dorsomediaalisen hypotalamuksen alueella sekä ventraalisessa periakveduktaalisessa harmaassa aineessa. Histaminergiset hermosäikeet hermottavat vahvasti myös liikeaktiivisuutta ja mielihyvää säätelevää striatumia.

Käyttäytymiskokeissa osoitimme H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistin JNJ-39220675:n estävän amfetamiinin aiheuttamaa liikeaktiivisuuden lisääntymistä akuutisti sekä hillitsevän kvinpirolin toistettujen antojen aikaansaamaa liikeaktiivisuuden vähenemisen desensitisaatiota. Nämä tutkimustulokset viittaavat histaminergisen ja dopaminergisen hermovälittäjäainejärjestelmän reseptoritason yhteisvaikutuksiin. JNJ-39220675:lla ei ollut kuitenkaan vaikutusta amfetamiinin mielihyväväikutukseen eikä kvinpirolin aversiiviseen vaikutukseen. Mikäli H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistit päätyvät tulevaisuudessa kliiniseen käyttöön, on kuitenkin tärkeää tietää, että ne eivät voimista keskushermoston dopaminergistä aktiivisuutta muuttavien lääkeaineiden mielihyvää/aversiota aiheuttavaa vaikutusta.

H<sub>3</sub>-reseptorin antagonistit eivät välttämättä ole riittävän tehokkaita estämään voimakasta riippuvuutta aiheuttavan amfetamiinin mielihyväväikutusta, vaikka ne ovat prekliinisissä tutkimuksissa estäneet alkoholin mielihyväväikutusta. Alkoholi ei vaikuta aivoissa pelkästään dopaminergiseen hermovälittäjäainejärjestelmään, ja näin ollen H<sub>3</sub>-reseptorien antagonistien alkoholin mielihyväväikutusta estävä vaikutus voikin siis välittyä myös muiden keskushermoston hermovälittäjäainejärjestelmien kautta. Tulevaisuudessa on mielenkiintoista nähdä, onko H<sub>3</sub>-reseptorissa potentiaalia uusien lääkeainekandidaattien vaikutuskohteeksi eri keskushermostosairauksien sekä riippuvuuksien hoidossa.

## 6 KIITOKSET

Kiitokset prof. Pertti Panulalle, erikoistyöohjaajilleni FT Maria Sundvikille ja proviisori Jenni Kononoffille (os. Vanhanen)

## KIRJALLISUUSLUETTELO

Agid Y, Blin J: Nerve cell death in degenerative diseases of the central nervous system: clinical aspects. *Ciba Found Symp* 126: 3-29, 1987

Airaksinen MS, Paetau A, Paljarvi L, Reinikainen K, Riekkinen P, Suomalainen R, Panula P: Histamine neurons in human hypothalamus: anatomy in normal and Alzheimer diseased brains. *Neuroscience* 44: 465-481, 1991

Akhtar M, Uma Devi P, Ali A, Pillai KK, Vohora D: Antipsychotic-like profile of thioperamide, a selective H<sub>3</sub>-receptor antagonist in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 20: 373-378, 2006

Akil M, Pierri JN, Whitehead RE, Edgar CL, Mohila C, Sampson AR, Lewis DA: Lamina-specific alterations in the dopamine innervation of the prefrontal cortex in schizophrenic subjects. *Am J Psychiatry* 156: 1580-1589, 1999

Alewijnse AE, Smit MJ, Rodriguez Pena MS, Verzijl D, Timmerman H, Leurs R: Modulation of forskolin-mediated adenylyl cyclase activation by constitutively active G(S)-coupled receptors. *FEBS Lett* 419: 171-174, 1997

Anden NE, Larsson K, Steg G: The influence of the nigro-neostriatal dopamine pathway on spinal motoneuron activity. *Acta Physiol Scand* 82: 268-271, 1971

Anichtchik OV, Peitsaro N, Rinne JO, Kalimo H, Panula P: Distribution and modulation of histamine H<sub>3</sub> receptors in basal ganglia and frontal cortex of healthy controls and patients with Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 8: 707-716, 2001

Applications for new human medicines under evaluation by the Committee for Medicinal Products for Human Use. EMA/465005/2014. Procedure Management and Business Support Division. 30 July 2014, United Kingdom. European Medicines Agency. Saatavilla Internetistä: [www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Report/2014/07/WC500170276.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2014/07/WC500170276.pdf)

Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC: Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H<sub>3</sub>) of histamine receptor. *Nature* 302: 832-837, 1983

Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC: Autoinhibition of histamine synthesis mediated by presynaptic H<sub>3</sub>-receptors. *Neuroscience* 23: 149-157, 1987a

Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC: Selective stimulation of histamine H<sub>3</sub> autoreceptors. *C R Acad Sci III* 304: 11-14, 1987b

Auvinen S, Panula P: Development of histamine-immunoreactive neurons in the rat brain. *J Comp Neurol* 276: 289-303, 1988

Baik JH: Dopamine signaling in reward-related behaviors. *Front Neural Circuits* 7: 152, 2013

- Bakker RA, Wieland K, Timmerman H, Leurs R: Constitutive activity of the histamine H(1) receptor reveals inverse agonism of histamine H(1) receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 387: 5-7, 2000
- Barke KE, Hough LB: Simultaneous measurement of opiate-induced histamine release in the periaqueductal gray and opiate antinociception: an in vivo microdialysis study. *J Pharmacol Exp Ther* 266: 934-942, 1993
- Barton AC, Black LE, Sibley DR: Agonist-induced desensitization of D2 dopamine receptors in human Y-79 retinoblastoma cells. *Mol Pharmacol* 39: 650-658, 1991
- Basar K, Sesia T, Groenewegen H, Steinbusch HW, Visser-Vandewalle V, Temel Y: Nucleus accumbens and impulsivity. *Prog Neurobiol* 92: 533-557, 2010
- Baudry M, Martres MP, Schwartz JC: H1 and H2 receptors in the histamine-induced accumulation of cyclic AMP in guinea pig brain slices. *Nature* 253: 362-364, 1975
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR: The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 63: 182-217, 2011
- Beavan MS, Schapira AH: Glucocerebrosidase mutations and the pathogenesis of Parkinson disease. *Ann Med* 45: 511-521, 2013
- Beninger RJ, Rinaldi R: The effects of amphetamine, apomorphine, SKF 38393, quinpirole and bromocriptine on responding for conditioned reward in rats. *Behav Pharmacol* 3: 155-163, 1992
- Bental B, Tirosh E: The relationship between attention, executive functions and reading domain abilities in attention deficit hyperactivity disorder and reading disorder: a comparative study. *J Child Psychol Psychiatry* 48: 455-463, 2007
- Berger B, Gaspar P, Verney C: Dopaminergic innervation of the cerebral cortex: unexpected differences between rodents and primates. *Trends Neurosci* 14: 21-27, 1991
- Bergson C, Mrzljak L, Smiley JF, Pappy M, Levenson R, Goldman-Rakic PS: Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *J Neurosci* 15: 7821-7836, 1995
- Bertocci B, Miggiano V, Da Prada M, Dembic Z, Lahm HW, Malherbe P: Human catechol-O-methyltransferase: cloning and expression of the membrane-associated form. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 1416-1420, 1991
- Blandina P, Giorgetti M, Cecchi M, Leurs R, Timmerman H, Giovannini MG: Histamine H3 receptor inhibition of K(+)-evoked release of acetylcholine from rat cortex in vivo. *Inflamm Res* 45 Suppl 1: S54-5, 1996

- Bongers G, Sallmen T, Passani MB, Mariottini C, Wendelin D, Lozada A, Marle A, Navis M, Blandina P, Bakker RA, Panula P, Leurs R: The Akt/GSK-3 $\beta$  axis as a new signaling pathway of the histamine H(3) receptor. *J Neurochem* 103: 248-258, 2007
- Bonhomme N, Cador M, Stinus L, Le Moal M, Spampinato U: Short and long-term changes in dopamine and serotonin receptor binding sites in amphetamine-sensitized rats: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res* 675: 215-223, 1995
- Bouthenet ML, Ruat M, Sales N, Garbarg M, Schwartz JC: A detailed mapping of histamine H1-receptors in guinea-pig central nervous system established by autoradiography with [<sup>125</sup>I]iodobolpyramine. *Neuroscience* 26: 553-600, 1988
- Bouthenet ML, Souil E, Martres MP, Sokoloff P, Giros B, Schwartz JC: Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res* 564: 203-219, 1991
- Bowersox SS, Kilduff TS, Faull KF, Zeller-DeAmicis L, Dement WC, Ciaranello RD: Brain dopamine receptor levels elevated in canine narcolepsy. *Brain Res* 402: 44-48, 1987
- Brabant C, Charlier Y, Quertemont E, Tirelli E: The H3 antagonist thioperamide reveals conditioned preference for a context associated with an inactive small dose of cocaine in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res* 160: 161-168, 2005
- Brabant C, Alleva L, Grisar T, Quertemont E, Lakaye B, Ohtsu H, Lin JS, Jatlow P, Picciotto MR, Tirelli E: Effects of the H3 receptor inverse agonist thioperamide on cocaine-induced locomotion in mice: role of the histaminergic system and potential pharmacokinetic interactions. *Psychopharmacology (Berl)* 202: 673-687, 2009
- Brandao ML: Involvement of opioid mechanisms in the dorsal periaqueductal gray in drug abuse. *Rev Neurosci* 4: 397-405, 1993
- Bravo SA, Rangel-Barajas C, Garduño BF: Pathophysiology of L-dopa induced dyskinesia - Changes in D<sub>1</sub>/D<sub>3</sub> receptors and their signaling pathway. *Kirjassa: A synopsis of Parkinson's disease*. Toim. Abdul Qayyum, In tech, 2014
- Brisch R, Saniotis A, Wolf R, Biela H, Bernstein HG, Steiner J, Bogerts B, Braun AK, Jankowski Z, Kumaritlake J, Henneberg M, Gos T: The Role of Dopamine in Schizophrenia from a Neurobiological and Evolutionary Perspective: Old Fashioned, but Still in Vogue. *Front Psychiatry* 5: 47, 2014
- Brown RE, Stevens DR, Haas HL: The physiology of brain histamine. *Prog Neurobiol* 63: 637-672, 2001
- Burgess CR, Scammell TE: Narcolepsy: neural mechanisms of sleepiness and cataplexy. *J Neurosci* 32: 12305-12311, 2012

- Cador M, Bjjou Y, Cailhol S, Stinus L: D-amphetamine-induced behavioral sensitization: implication of a glutamatergic medial prefrontal cortex-ventral tegmental area innervation. *Neuroscience* 94: 705-721, 1999
- Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G: The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia. *Trends Neurosci* 19: 19-24, 1996
- Carlsson A: Detection and assay of dopamine. *Pharmacol Rev* 11: 300-304, 1959
- Carlsson A, Falck B, Hillarp NA, Thieme G, Torp A: A new histochemical method for visualization of tissue catechol amines. *Med Exp Int J Exp Med* 4: 123-125, 1961
- Caron MG, Beaulieu M, Raymond V, Gagne B, Drouin J, Lefkowitz RJ, Labrie F: Dopaminergic receptors in the anterior pituitary gland. Correlation of [3H]dihydroergocryptine binding with the dopaminergic control of prolactin release. *J Biol Chem* 253: 2244-2253, 1978
- Castellan Baldan L, Williams KA, Gallezot JD, Pogorelov V, Rapanelli M, Crowley M, Anderson GM, Loring E, Gorczyca R, Billingslea E, Wasylink S, Panza KE, Ercan-Sencicek AG, Krusong K, Leventhal BL, Ohtsu H, Bloch MH, Hughes ZA, Krystal JH, Mayes L, de Araujo I, Ding YS, State MW, Pittenger C: Histidine decarboxylase deficiency causes tourette syndrome: parallel findings in humans and mice. *Neuron* 81: 77-90, 2014
- Centonze D, Gubellini P, Usiello A, Rossi S, Tscherter A, Bracci E, Erbs E, Tognazzi N, Bernardi G, Pisani A, Calabresi P, Borrelli E: Differential contribution of dopamine D2S and D2L receptors in the modulation of glutamate and GABA transmission in the striatum. *Neuroscience* 129: 157-166, 2004
- Chang RS, Tran VT, Snyder SH: Heterogeneity of histamine H1-receptors: species variations in [3H]mepyramine binding of brain membranes. *J Neurochem* 32: 1653-1663, 1979
- Chen J, Liu C, Lovenberg TW: Molecular and pharmacological characterization of the mouse histamine H3 receptor. *Eur J Pharmacol* 467: 57-65, 2003
- Chen J, Rusnak M, Luedtke RR, Sidhu A: D1 dopamine receptor mediates dopamine-induced cytotoxicity via the ERK signal cascade. *J Biol Chem* 279: 39317-39330, 2004
- Chien WT, Yip AL: Current approaches to treatments for schizophrenia spectrum disorders, part I: an overview and medical treatments. *Neuropsychiatr Dis Treat* 9: 1311-1332, 2013
- Ciccarone D: Stimulant abuse: pharmacology, cocaine, methamphetamine, treatment, attempts at pharmacotherapy. *Prim Care* 38: 41-58, 2011
- Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK: Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33: 281-307, 1993

- Clark EA, Hill SJ: Sensitivity of histamine H3 receptor agonist-stimulated [35S]GTP gamma[S] binding to pertussis toxin. *Eur J Pharmacol* 296: 223-225, 1996
- Clark KL, Noudoost B: The role of prefrontal catecholamines in attention and working memory. *Front Neural Circuits* 8: 33, 2014
- Coge F, Guenin SP, Audinot V, Renouard-Try A, Beauverger P, Macia C, Ouvry C, Nagel N, Rique H, Boutin JA, Galizzi JP: Genomic organization and characterization of splice variants of the human histamine H3 receptor. *Biochem J* 355: 279-288, 2001
- Connelly WM, Shenton FC, Lethbridge N, Leurs R, Waldvogel HJ, Faull RL, Lees G, Chazot PL: The histamine H4 receptor is functionally expressed on neurons in the mammalian CNS. *Br J Pharmacol* 157: 55-63, 2009
- Connolly BS, Lang AE: Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA* 311: 1670-1683, 2014
- Costa C, Sgobio C, Siliquini S, Tozzi A, Tantucci M, Ghiglieri V, Di Filippo M, Pendlino V, de Iure A, Marti M, Morari M, Spillantini MG, Latagliata EC, Pascucci T, Puglisi-Allegra S, Gardoni F, Di Luca M, Picconi B, Calabresi P: Mechanisms underlying the impairment of hippocampal long-term potentiation and memory in experimental Parkinson's disease. *Brain* 135: 1884-1899, 2012
- Creed MC, Ntamati NR, Tan KR: VTA GABA neurons modulate specific learning behaviors through the control of dopamine and cholinergic systems. *Front Behav Neurosci* 8: 8, 2014
- Cuello AC, Hiley R, Iversen LL: Use of catechol O-methyltransferase for the enzyme radiochemical assay of dopamine. *J Neurochem* 21: 1337-1340, 1973
- Cunningham CL, Gremel CM, Groblewski PA: Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nat Protoc* 1: 1662-1670, 2006
- Dahlström A, Fuxe K: Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20: 398-399, 1964
- Dai H, Kaneko K, Kato H, Fujii S, Jing Y, Xu A, Sakurai E, Kato M, Okamura N, Kuramasu A, Yanai K: Selective cognitive dysfunction in mice lacking histamine H1 and H2 receptors. *Neurosci Res* 57: 306-313, 2007
- Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD, Seeburg PH: The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J* 8: 4025-4034, 1989
- Dale HH, Laidlaw PP: The physiological action of beta-aminazolyethylamine. *J Physiol* 41: 318-344, 1910



Daubner SC, Le T, Wang S: Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys* 508: 1-12, 2011

De Camilli P, Macconi D, Spada A: Dopamine inhibits adenylate cyclase in human prolactin-secreting pituitary adenomas. *Nature* 278: 252-254, 1979

de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG: The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 322-327, 1998

De Mei C, Ramos M, Iitaka C, Borrelli E: Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Curr Opin Pharmacol* 9: 53-58, 2009

Dearry A, Gingrich JA, Falardeau P, Fremeau RT, Jr, Bates MD, Caron MG: Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* 347: 72-76, 1990

Dehay B, Martinez-Vicente M, Caldwell GA, Caldwell KA, Yue Z, Cookson MR, Klein C, Vila M, Bezaud E: Lysosomal impairment in Parkinson's disease. *Mov Disord* 28: 725-732, 2013

Deutch AY, Goldstein M, Baldino F, Jr, Roth RH: Telencephalic projections of the A8 dopamine cell group. *Ann N Y Acad Sci* 537: 27-50, 1988

Di Marzo V, Vial D, Sokoloff P, Schwartz JC, Piomelli D: Selection of alternative G-mediated signaling pathways at the dopamine D2 receptor by protein kinase C. *J Neurosci* 13: 4846-4853, 1993

Diaz J, Levesque D, Griffon N, Lammers CH, Martres MP, Sokoloff P, Schwartz JC: Opposing roles for dopamine D2 and D3 receptors on neurotensin mRNA expression in nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 6: 1384-1387, 1994

Dickstein SG, Bannon K, Castellanos FX, Milham MP: The neural correlates of attention deficit hyperactivity disorder: an ALE meta-analysis. *J Child Psychol Psychiatry* 47: 1051-1062, 2006

Domesick VB: Neuroanatomical organization of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Ann N Y Acad Sci* 537: 10-26, 1988

Doreulee N, Yanovsky Y, Flaggmeyer I, Stevens DR, Haas HL, Brown RE: Histamine H(3) receptors depress synaptic transmission in the corticostriatal pathway. *Neuropharmacology* 40: 106-113, 2001

DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. Law V, Knox C, Djoumbou Y, Jewison T, Guo AC, Liu Y, Maciejewski A, Arndt D, Wilson M, Neveu V, Tang A, Gabriel G, Ly C, Adamjee S, Dame ZT, Han B, Zhou Y, Wishart DS. *Nucleic Acids Res* 42: 1091-1097, 2014

- Drutel G, Peitsaro N, Karlstedt K, Wieland K, Smit MJ, Timmerman H, Panula P, Leurs R: Identification of rat H3 receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. *Mol Pharmacol* 59: 1-8, 2001
- Ducasse D, Boyer L, Michel P, Loundou A, Macgregor A, Micoulaud-Franchi JA, Courtet P, Abbar M, Leboyer M, Fond G: D2 and D3 dopamine receptor affinity predicts effectiveness of antipsychotic drugs in obsessive-compulsive disorders: a metaregression analysis. *Psychopharmacology (Berl)* 231: 3765-3770, 2014
- Eggermann E, Serafin M, Bayer L, Machard D, Saint-Mleux B, Jones BE, Muhlethaler M: Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurones. *Neuroscience* 108: 177-181, 2001
- Eilam D, Szechtman H: Biphase effect of D2 agonist quinpirole on locomotion and movements. *Eur J Pharmacol* 161: 151-157, 1989
- Einat H, Szechtman H: Longlasting consequences of chronic treatment with the dopamine agonist quinpirole for the undrugged behavior of rats. *Behav Brain Res* 54: 35-41, 1993
- Ellenbroek BA: Histamine H(3) receptors, the complex interaction with dopamine and its implications for addiction. *Br J Pharmacol* 170: 46-57, 2013
- Elsworth JD, Roth RH: Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 144: 4-9, 1997
- Emond V, Joyal C, Poissant H: Structural and functional neuroanatomy of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Encephale* 35: 107-114, 2009
- Ercan-Sencicek AG, Stillman AA, Ghosh AK, Bilguvar K, O'Roak BJ, Mason CE, Abbott T, Gupta A, King RA, Pauls DL, Tischfield JA, Heiman GA, Singer HS, Gilbert DL, Hoekstra PJ, Morgan TM, Loring E, Yasuno K, Fernandez T, Sanders S, Louvi A, Cho JH, Mane S, Colangelo CM, Biederer T, Lifton RP, Gunel M, State MW: L-histidine decarboxylase and Tourette's syndrome. *N Engl J Med* 362: 1901-1908, 2010
- Ericson H, Watanabe T, Kohler C: Morphological analysis of the tuberomammillary nucleus in the rat brain: delineation of subgroups with antibody against L-histidine decarboxylase as a marker. *J Comp Neurol* 263: 1-24, 1987
- Ericson H, Blomqvist A, Kohler C: Brainstem afferents to the tuberomammillary nucleus in the rat brain with special reference to monoaminergic innervation. *J Comp Neurol* 281: 169-192, 1989
- Eriksson KS, Sergeeva O, Brown RE, Haas HL: Orexin/hypocretin excites the histaminergic neurons of the tuberomammillary nucleus. *J Neurosci* 21: 9273-9279, 2001
- Everitt BJ, Robbins TW: Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 8: 1481-1489, 2005

- Faraone SV, Mick E: Molecular genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin North Am* 33: 159-180, 2010
- Ferrada C, Ferre S, Casado V, Cortes A, Justinova Z, Barnes C, Canela EI, Goldberg SR, Leurs R, Lluís C, Franco R: Interactions between histamine H<sub>3</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors and the implications for striatal function. *Neuropharmacology* 55: 190-197, 2008
- Ferrada C, Moreno E, Casado V, Bongers G, Cortes A, Mallol J, Canela EI, Leurs R, Ferre S, Lluís C, Franco R: Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D<sub>1</sub> and histamine H<sub>3</sub> receptors. *Br J Pharmacol* 157: 64-75, 2009
- Fish EW, DiBerto JF, Krouse MC, Robinson JE, Malanga CJ: Different contributions of dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor activity to alcohol potentiation of brain stimulation reward in C57BL/6J and DBA/2J mice. *J Pharmacol Exp Ther* 350: 322-329, 2014
- Fishburn CS, Belleli D, David C, Carmon S, Fuchs S: A novel short isoform of the D<sub>3</sub> dopamine receptor generated by alternative splicing in the third cytoplasmic loop. *J Biol Chem* 268: 5872-5878, 1993
- Fleckenstein AE, Lookingland KJ, Moore KE: Differential effects of histamine on the activity of hypothalamic dopaminergic neurons in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 270-276, 1994
- Ford CP: The role of D<sub>2</sub>-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. *Neuroscience* 282: 13-22, 2014
- Fox GB, Pan JB, Esbenshade TA, Bennani YL, Black LA, Faghieh R, Hancock AA, Decker MW: Effects of histamine H<sub>3</sub> receptor ligands GT-2331 and ciproxifan in a repeated acquisition avoidance response in the spontaneously hypertensive rat pup. *Behav Brain Res* 131: 151-161, 2002
- Fox GB, Esbenshade TA, Pan JB, Browman KE, Zhang M, Ballard ME, Radek RJ, Miner H, Bitner RS, Krueger KM, Yao BB, Faghieh R, Rueter LE, Komater VA, Drescher KU, Buckley MJ, Sullivan JP, Cowart MD, Decker MW, Hancock AA: Selective H<sub>3</sub> receptor (H<sub>3</sub>R) blockade: broad efficacy in cognition and schizophrenia. *Inflamm Res* 54 Suppl 1: S23-4, 2005
- Franck J, Jayaram-Lindström N: Pharmacotherapy for alcohol dependence: status of current treatments. *Curr Opin Neurobiol* 23: 692-699, 2013
- Franklin KBJ, Paxinos G: The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego, 1997
- Freeze BS, Kravitz AV, Hammack N, Berke JD, Kreitzer AC: Control of basal ganglia output by direct and indirect pathway projection neurons. *J Neurosci* 33: 18531-18539, 2013

Freneau RT, Jr, Duncan GE, Fornaretto MG, Dearry A, Gingrich JA, Breese GR, Caron MG: Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 3772-3776, 1991

Fuxe K, Hokfelt T: Further evidence for the existence of tubero-infundibular dopamine neurons. *Acta Physiol Scand* 66: 245-246, 1966

Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Levin ED, Jaber M, Caron MG: Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science* 283: 397-401, 1999

Galici R, Boggs JD, Aluisio L, Fraser IC, Bonaventure P, Lord B, Lovenberg TW: JNJ-10181457, a selective non-imidazole histamine H(3) receptor antagonist, normalizes acetylcholine neurotransmission and has efficacy in translational rat models of cognition. *Neuropharmacology* 56: 1131-1137, 2009

Galici R, Rezvani AH, Aluisio L, Lord B, Levin ED, Fraser I, Boggs J, Welty N, Shoblock JR, Motley ST, Letavic MA, Carruthers NI, Dugovic C, Lovenberg TW, Bonaventure P: JNJ-39220675, a novel selective histamine H3 receptor antagonist, reduces the abuse-related effects of alcohol in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 214: 829-841, 2011

Garbarg M, Javoy-Agid F, Schwartz JC, Agid Y: Brain histidine decarboxylase activity in Parkinson's disease. *Lancet* 1: 74-75, 1983

Garbutt JC: The state of pharmacotherapy for the treatment of alcohol dependence. *J Subst Abuse Treat* 36: S15-23; quiz S24-5, 2009

Gardner EL: Addiction and brain reward and antireward pathways. *Adv Psychosom Med* 30: 22-60, 2011

Garduno-Torres B, Trevino M, Gutierrez R, Arias-Montano JA: Pre-synaptic histamine H3 receptors regulate glutamate, but not GABA release in rat thalamus. *Neuropharmacology* 52: 527-535, 2007

Gaspar P, Berger B, Febvret A, Vigny A, Henry JP: Catecholamine innervation of the human cerebral cortex as revealed by comparative immunohistochemistry of tyrosine hydroxylase and dopamine-beta-hydroxylase. *J Comp Neurol* 279: 249-271, 1989

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: Protean agonism at histamine H3 receptors in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11086-11091, 2003

Gbahou F, Rouleau A, Arrang JM: The histamine autoreceptor is a short isoform of the H(3) receptor. *Br J Pharmacol* 166: 1860-1871, 2012

- Geisler S, Derst C, Veh RW, Zahm DS: Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *J Neurosci* 27: 5730-5743, 2007
- Gerald MC, Skau KA, Maickel RP: Effects of various antihistamines on oxotremorine-induced hypothermia in mice. *Eur J Pharmacol* 17: 189-193, 1972
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr, Sibley DR: D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250: 1429-1432, 1990
- German DC, Manaye KF: Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): three-dimensional reconstruction in the rat. *J Comp Neurol* 331: 297-309, 1993
- Gesi M, Santinami A, Ruffoli R, Conti G, Fornai F: Novel aspects of dopamine oxidative metabolism (confounding outcomes take place of certainties). *Pharmacol Toxicol* 89: 217-224, 2001
- Geuzaine A, Tyhon A, Grisar T, Brabant C, Lakaye B, Tirelli E: Amphetamine reward in food restricted mice lacking the melanin-concentrating hormone receptor-1. *Behav Brain Res* 262: 14-20, 2014
- Giannoni P, Passani MB, Nosi D, Chazot PL, Shenton FC, Medhurst AD, Munari L, Blandina P: Heterogeneity of histaminergic neurons in the tuberomammillary nucleus of the rat. *Eur J Neurosci* 29: 2363-2374, 2009
- Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Riou JF, Emorine LJ, Schwartz JC: Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature* 342: 923-926, 1989
- Goldman JG, Williams-Gray C, Barker RA, Duda JE, Galvin JE: The spectrum of cognitive impairment in Lewy body diseases. *Mov Disord* 29: 608-621, 2014
- Goldschmidt RC, Hough LB, Glick SD, Padawer J: Mast cells in rat thalamus: nuclear localization, sex difference and left-right asymmetry. *Brain Res* 323: 209-217, 1984
- Goldstein DB, Kakihana R: Circadian rhythms of ethanol consumption by mice: a simple computer analysis for chronopharmacology. *Psychopharmacology (Berl)* 52: 41-45, 1977
- González-Sepúlveda M, Rosell S, Hoffman HM, del Mar Castillo-Ruiz M, Mignon V, Moreno-Delgado D, Vignes M, Díaz J, Sabria J, Ortiz J: Cellular distribution of the histamine H<sub>3</sub> receptor in the basal ganglia: Functional modulation of dopamine and glutamate neurotransmission. *Basal Ganglia* 3: 109-121, 2013
- Graham DL, Hoppenot R, Hendryx A, Self DW: Differential ability of D1 and D2 dopamine receptor agonists to induce and modulate expression and reinstatement of cocaine place preference in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 191: 719-730, 2007
- Green AS, Grahame NJ: Ethanol drinking in rodents: is free-choice drinking related to the reinforcing effects of ethanol? *Alcohol* 42: 1-11, 2008

- Green MD, Cox B, Lomax P: Sites and mechanisms of action of histamine in the central thermoregulatory pathways of the rat. *Neuropharmacology* 15: 321-324, 1976
- Greengard P: The neurobiology of dopamine signaling. *Biosci Rep* 21: 247-269, 2001
- Greif GJ, Lin YJ, Liu JC, Freedman JE: Dopamine-modulated potassium channels on rat striatal neurons: specific activation and cellular expression. *J Neurosci* 15: 4533-4544, 1995
- Griebel G, Pichat P, Pruniaux MP, Beeske S, Lopez-Grancha M, Genet E, Terranova JP, Castro A, Sanchez JA, Black M, Varty GB, Weiner I, Arad M, Barak S, De Levie A, Guillot E: SAR110894, a potent histamine H(3)-receptor antagonist, displays procognitive effects in rodents. *Pharmacol Biochem Behav* 102: 203-214, 2012
- Guterstam J, Jayaram-Lindström N, Cervenka S, Frost JJ, Farde L, Halldin C, Franck J: Effects of amphetamine on the human brain opioid system--a positron emission tomography study. *Int J Neuropsychopharmacol* 16: 763-769, 2013
- Gysling K, Wang RY: Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in the rat. *Brain Res* 277: 119-127, 1983
- Haas H, Panula P: The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 4: 121-130, 2003
- Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O: Histamine in the nervous system. *Physiol Rev* 88: 1183-1241, 2008
- Halberda JP, Middaugh LD, Gard BE, Jackson BP: DAD1- and DAD2-like agonist effects on motor activity of C57 mice: differences compared to rats. *Synapse* 26: 81-92, 1997
- Hancock AA, Esbenshade TA, Krueger KM, Yao BB: Genetic and pharmacological aspects of histamine H3 receptor heterogeneity. *Life Sci* 73: 3043-3072, 2003
- Hancock AA, Brune ME: Assessment of pharmacology and potential anti-obesity properties of H3 receptor antagonists/inverse agonists. *Expert Opin Investig Drugs* 14: 223-241, 2005  
hernandezHasue RH, Shammah-Lagnado SJ: Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 454: 15-33, 2002
- Hayashi H, Takagi H, Takeda N, Kubota Y, Tohyama M, Watanabe T, Wada H: Fine structure of histaminergic neurons in the caudal magnocellular nucleus of the rat as demonstrated by immunocytochemistry using histidine decarboxylase as a marker. *J Comp Neurol* 229: 233-241, 1984
- Hegstrand LR, Kanof PD, Greengard P: Histamine-sensitive adenylate cyclase in mammalian brain. *Nature* 260: 163-165, 1976

- Hernandez-Lopez S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A, Galarraga E: D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca<sup>2+</sup> conductance. *J Neurosci* 17: 3334-3342, 1997
- Herz A: Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology (Berl)* 129: 99-111, 1997
- Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H, Schwartz JC, Shankley NP, Young JM, Schunack W, Levi R, Haas HL: International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev* 49: 253-278, 1997
- Hoffman DC, Beninger RJ: The D1 dopamine receptor antagonist, SCH 23390 reduces locomotor activity and rearing in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 22: 341-342, 1985
- Hoffman IS, Cubeddu LX: Presynaptic effects of tetrahydropapaveroline on striatal dopaminergic neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 220: 16-22, 1982
- Hoffman DC, Dickson PR, Beninger RJ: The dopamine D2 receptor agonists, quinpirole and bromocriptine produce conditioned place preferences. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 12: 315-322, 1988
- Hokfelt T, Everitt BJ, Theodorsson-Norheim E, Goldstein M: Occurrence of neurotensinlike immunoreactivity in subpopulations of hypothalamic, mesencephalic, and medullary catecholamine neurons. *J Comp Neurol* 222: 543-559, 1984
- Horvitz JC, Williams G, Joy R: Time-dependent actions of D2 family agonist quinpirole on spontaneous behavior in the rat: dissociation between sniffing and locomotion. *Psychopharmacology (Berl)* 154: 350-355, 2001
- Hosp JA, Luft AR: Dopaminergic Meso-Cortical Projections to M1: Role in Motor Learning and Motor Cortex Plasticity. *Front Neurol* 4: 145, 2013
- Hough LB, Domino EF: Tele-methylhistamine oxidation by type B monoamine oxidase. *J Pharmacol Exp Ther* 208: 422-428, 1979
- Huang Q, Zhou D, Chase K, Gusella JF, Aronin N, DiFiglia M: Immunohistochemical localization of the D1 dopamine receptor in rat brain reveals its axonal transport, pre- and postsynaptic localization, and prevalence in the basal ganglia, limbic system, and thalamic reticular nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 11988-11992, 1992
- Huntley GW, Morrison JH, Prikhozhan A, Sealfon SC: Localization of multiple dopamine receptor subtype mRNAs in human and monkey motor cortex and striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 15: 181-188, 1992
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ: Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29: 565-598, 2006

Ikemoto S: The supramammillary nucleus mediates primary reinforcement via GABA(A) receptors. *Neuropsychopharmacology* 30: 1088-1095, 2005

Ikemoto S, Witkin BM, Zangen A, Wise RA: Rewarding effects of AMPA administration into the supramammillary or posterior hypothalamic nuclei but not the ventral tegmental area. *J Neurosci* 24: 5758-5765, 2004

Inoue I, Yanai K, Kitamura D, Taniuchi I, Kobayashi T, Niimura K, Watanabe T, Watanabe T: Impaired locomotor activity and exploratory behavior in mice lacking histamine H1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13316-13320, 1996

Jin CY, Anichtchik O, Panula P: Altered histamine H3 receptor radioligand binding in post-mortem brain samples from subjects with psychiatric diseases. *Br J Pharmacol* 157: 118-129, 2009

Johnson SW, North RA: Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* 12: 483-488, 1992

Jones SR, Gainetdinov RR, Jaber M, Giros B, Wightman RM, Caron MG: Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4029-4034, 1998

Jorgensen EA, Knigge U, Warberg J, Kjaer A: Histamine and the regulation of body weight. *Neuroendocrinology* 86: 210-214, 2007

Joseph JD, Wang YM, Miles PR, Budygin EA, Picetti R, Gainetdinov RR, Caron MG, Wightman RM: Dopamine autoreceptor regulation of release and uptake in mouse brain slices in the absence of D(3) receptors. *Neuroscience* 112: 39-49, 2002

Kanbayashi T, Kodama T, Kondo H, Satoh S, Inoue Y, Chiba S, Shimizu T, Nishino S: CSF histamine contents in narcolepsy, idiopathic hypersomnia and obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep* 32: 181-187, 2009

Kaslin J, Panula P: Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol* 440: 342-377, 2001

Kebabian JW, Calne DB: Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277: 93-96, 1979

Kebabian JW, Petzold GL, Greengard P: Dopamine-sensitive adenylate cyclase in caudate nucleus of rat brain, and its similarity to the "dopamine receptor". *Proc Natl Acad Sci U S A* 69: 2145-2149, 1972

Kerr JN, Wickens JR: Dopamine D-1/D-5 receptor activation is required for long-term potentiation in the rat neostriatum in vitro. *J Neurophysiol* 85: 117-124, 2001

Kessler RM, Woodward ND, Riccardi P, Li R, Ansari MS, Anderson S, Dawant B, Zald D, Meltzer HY: Dopamine D2 receptor levels in striatum, thalamus, substantia nigra, limbic regions, and cortex in schizophrenic subjects. *Biol Psychiatry* 65: 1024-1031, 2009



- Kienast T, Heinz A: Dopamine and the diseased brain. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5: 109-131, 2006
- Kobayashi T, Inoue I, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Watanabe T: Cloning, RNA expression, and chromosomal location of a mouse histamine H2 receptor gene. *Genomics* 37: 390-394, 1996
- Komater VA, Browman KE, Curzon P, Hancock AA, Decker MW, Fox GB: H3 receptor blockade by thioperamide enhances cognition in rats without inducing locomotor sensitization. *Psychopharmacology (Berl)* 167: 363-372, 2003
- Koob GF, Le Moal M: Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278: 52-58, 1997
- Koob GF, Nestler EJ: The neurobiology of drug addiction. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 9: 482-497, 1997
- Kopin IJ, White JH, Bankiewicz K: A new approach to biochemical evaluation of brain dopamine metabolism. *Cell Mol Neurobiol* 8: 171-179, 1988
- Korotkova TM, Haas HL, Brown RE: Histamine excites GABAergic cells in the rat substantia nigra and ventral tegmental area in vitro. *Neurosci Lett* 320: 133-136, 2002
- Kostrzewa RM, Kostrzewa JP, Nowak P, Kostrzewa RA, Brus R: Dopamine D2 agonist priming in intact and dopamine-lesioned rats. *Neurotox Res* 6: 457-462, 2004
- Koyano F, Okatsu K, Ishigaki S, Fujioka Y, Kimura M, Sobue G, Tanaka K, Matsuda N: The principal PINK1 and Parkin cellular events triggered in response to dissipation of mitochondrial membrane potential occur in primary neurons. *Genes Cells* 18: 672-681, 2013
- Kreek MJ, LaForge KS, Butelman E: Pharmacotherapy of addictions. *Nat Rev Drug Discov* 1: 710-726, 2002
- Kroeze WK, Hufeisen SJ, Popadak BA, Renock SM, Steinberg S, Ernsberger P, Jayathilake K, Meltzer HY, Roth BL: H1-histamine receptor affinity predicts short-term weight gain for typical and atypical antipsychotic drugs. *Neuropsychopharmacology* 28: 519-526, 2003
- Kuhne S, Wijtmans M, Lim HD, Leurs R, de Esch IJ: Several down, a few to go: histamine H3 receptor ligands making the final push towards the market? *Expert Opin Investig Drugs* 20: 1629-1648, 2011
- Kwiatkowski H: Observations on the relation of histamine to reactive hyperaemia. *J Physiol* 100: 147-158, 1941
- Kwiatkowski H: Histamine in nervous tissue. *J Physiol* 102: 32-41, 1943

Landwehrmeyer B, Mengod G, Palacios JM: Dopamine D3 receptor mRNA and binding sites in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 18: 187-192, 1993

Le Moine C, Bloch B: D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J Comp Neurol* 355: 418-426, 1995

Lejoyeux M, Solomon J, Ades J: Benzodiazepine treatment for alcohol-dependent patients. *Alcohol Alcohol* 33: 563-575, 1998

Letavic MA, Aluisio L, Atack JR, Bonaventure P, Carruthers NI, Dugovic C, Everson A, Feinstein MA, Fraser IC, Hoey K, Jiang X, Keith JM, Koudriakova T, Leung P, Lord B, Lovenberg TW, Ly KS, Morton KL, Motley ST, Nepomuceno D, Rizzolio M, Rynberg R, Sepassi K, Shelton J: Pre-clinical characterization of aryloxypropylidene amides as histamine H3 receptor antagonists: identification of candidates for clinical development. *Bioorg Med Chem Lett* 20: 4210-4214, 2010

Leurs R, Traiffort E, Arrang JM, Tardivel-Lacombe J, Ruat M, Schwartz JC: Guinea pig histamine H1 receptor. II. Stable expression in Chinese hamster ovary cells reveals the interaction with three major signal transduction pathways. *J Neurochem* 62: 519-527, 1994

Levant B, Grigoriadis DE, DeSouza EB: Characterization of [3H]quinpirole binding to D2-like dopamine receptors in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 262: 929-935, 1992

Levi R, Seyedi N, Schaefer U, Estephan R, Mackins CJ, Tyler E, Silver RB: Histamine H3-receptor signaling in cardiac sympathetic nerves: Identification of a novel MAPK-PLA2-COX-PGE2-EP3R pathway. *Biochem Pharmacol* 73: 1146-1156, 2007

Levitt M, Spector S, Sjoerdsma A, Udenfried S: Elucidation of the Rate-Limiting Step in Norepinephrine Biosynthesis in the Perfused Guinea-Pig Heart. *J Pharmacol Exp Ther* 148: 1-8, 1965

Lewis DA, Sesack SR, Levey AI, Rosenberg DR: Dopamine axons in primate prefrontal cortex: specificity of distribution, synaptic targets, and development. *Adv Pharmacol* 42: 703-706, 1998

Ligneau X, Landais L, Perrin D, Piriou J, Uguen M, Denis E, Robert P, Parmentier R, Anaclet C, Lin JS, Burbán A, Arrang JM, Schwartz JC: Brain histamine and schizophrenia: potential therapeutic applications of H3-receptor inverse agonists studied with BF2.649. *Biochem Pharmacol* 73: 1215-1224, 2007a

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 JM, Ganellin CR, Stark H, Schunack W, Schwartz JC: BF2.649 [1-{3-[3-(4-Chlorophenyl)propoxy]propyl}piperidine, hydrochloride], a

nonimidazole inverse agonist/antagonist at the human histamine H3 receptor: Preclinical pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 320: 365-375, 2007b

Lima MS, Reisser AA, Soares BG, Farrell M: Antidepressants for cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev* 2: 2950, 2003

Lin JS, Fort P, Kitahama K, Panula P, Denney RM, Jouvet M: Immunohistochemical evidence for the presence of type B monoamine oxidase in histamine-containing neurons in the posterior hypothalamus of cats. *Neurosci Lett* 128: 61-65, 1991

Lin JS, Dauvilliers Y, Arnulf I, Bastuji H, Anaclet C, Parmentier R, Kocher L, Yanagisawa M, Lehert P, Ligneau X, Perrin D, Robert P, Roux M, Lecomte JM, Schwartz JC: An inverse agonist of the histamine H(3) receptor improves wakefulness in narcolepsy: studies in orexin-/- mice and patients. *Neurobiol Dis* 30: 74-83, 2008

Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E: The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98: 365-376, 1999

Lindgren N, Xu ZQ, Herrera-Marschitz M, Haycock J, Hokfelt T, Fisone G: Dopamine D(2) receptors regulate tyrosine hydroxylase activity and phosphorylation at Ser40 in rat striatum. *Eur J Neurosci* 13: 773-780, 2001

Lindvall O, Björklund A: Dopaminergic innervation of the globus pallidus by collaterals from the nigrostriatal pathway. *Brain Res* 172: 169-173, 1979

Liu C, Wilson SJ, Kuei C, Lovenberg TW: Comparison of human, mouse, rat, and guinea pig histamine H4 receptors reveals substantial pharmacological species variation. *J Pharmacol Exp Ther* 299: 121-130, 2001

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

Lovenberg TW, Pyati J, Chang H, Wilson SJ, Erlander MG: Cloning of rat histamine H(3) receptor reveals distinct species pharmacological profiles. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 771-778, 2000

Lovinger DM: Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum. *Neuropharmacology* 58: 951-961, 2010

Lu J, Zhou TC, Saper CB: Identification of wake-active dopaminergic neurons in the ventral periaqueductal gray matter. *J Neurosci* 26: 193-202, 2006

Lu W, Wolf ME: Expression of dopamine transporter and vesicular monoamine transporter 2 mRNAs in rat midbrain after repeated amphetamine administration. *Brain Res Mol Brain Res* 49: 137-148, 1997

- Lundius EG, Sanchez-Alavez M, Ghochani Y, Klaus J, Tabarean IV: Histamine influences body temperature by acting at H1 and H3 receptors on distinct populations of pre-optic neurons. *J Neurosci* 30: 4369-4381, 2010
- Luque-Rojas MJ, Galeano P, Suarez J, Araos P, Santin LJ, de Fonseca FR, Calvo EB: Hyperactivity induced by the dopamine D2/D3 receptor agonist quinpirole is attenuated by inhibitors of endocannabinoid degradation in mice. *Int J Neuropsychopharmacol* 16: 661-676, 2013
- Malaty IA, Akbar U: Updates in medical and surgical therapies for Tourette syndrome. *Curr Neurol Neurosci Rep* 14: 1-13, 2014
- Malmlof K, Zaragoza F, Golozoubova V, Refsgaard HH, Cremers T, Raun K, Wulff BS, Johansen PB, Westerink B, Rimvall K: Influence of a selective histamine H3 receptor antagonist on hypothalamic neural activity, food intake and body weight. *Int J Obes (Lond)* 29: 1402-1412, 2005
- Mariani JJ, Levin FR: Psychostimulant treatment of cocaine dependence. *Psychiatr Clin North Am* 35: 425-439, 2012
- Martino D, Madhusudan N, Zis P, Cavanna AE: An introduction to the clinical phenomenology of Tourette syndrome. *Int Rev Neurobiol* 112: 1-33, 2013
- Matsumoto M, Weickert CS, Akil M, Lipska BK, Hyde TM, Herman MM, Kleinman JE, Weinberger DR: Catechol O-methyltransferase mRNA expression in human and rat brain: evidence for a role in cortical neuronal function. *Neuroscience* 116: 127-137, 2003
- Meador-Woodruff JH, Mansour A, Bunzow JR, Van Tol HH, Watson SJ, Jr, Civelli O: Distribution of D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7625-7628, 1989
- Mercer L, del Fiacco M, Cuello AC: The smooth endoplasmic reticulum as a possible storage site for dendritic dopamine in substantia nigra neurones. *Experientia* 35: 101-103, 1979
- Meynard MM, Valdes JL, Recabarren M, Seron-Ferre M, Torrealba F: Specific activation of histaminergic neurons during daily feeding anticipatory behavior in rats. *Behav Brain Res* 158: 311-319, 2005
- Minzer K, Lee O, Hong JJ, Singer HS: Increased prefrontal D2 protein in Tourette syndrome: a postmortem analysis of frontal cortex and striatum. *J Neurol Sci* 219: 55-61, 2004
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG: Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78: 189-225, 1998
- Mitler MM, Soave O, Dement WC: Narcolepsy in seven dogs. *J Am Vet Med Assoc* 168: 1036-1038, 1976

- Mochizuki T, Yamatodani A, Okakura K, Horii A, Inagaki N, Wada H: Circadian rhythm of histamine release from the hypothalamus of freely moving rats. *Physiol Behav* 51: 391-394, 1992
- Molina-Hernandez A, Nunez A, Arias-Montano JA: Histamine H3-receptor activation inhibits dopamine synthesis in rat striatum. *Neuroreport* 11: 163-166, 2000
- Molina-Hernandez A, Nunez A, Sierra JJ, Arias-Montano JA: Histamine H3 receptor activation inhibits glutamate release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology* 41: 928-934, 2001
- Money KM, Stanwood GD: Developmental origins of brain disorders: roles for dopamine. *Front Cell Neurosci* 7: 260, 2013
- Monnier M, Fallert M, Battacharya IC: The waking action of histamine. *Experientia* 23: 21-22, 1967
- Monsma FJ,Jr, Mahan LC, McVittie LD, Gerfen CR, Sibley DR: Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 6723-6727, 1990
- Moreno E, Hoffmann H, Gonzalez-Sepulveda M, Navarro G, Casado V, Cortes A, Mallol J, Vignes M, McCormick PJ, Canela EI, Lluís C, Moratalla R, Ferre S, Ortiz J, Franco R: Dopamine D1-histamine H3 receptor heteromers provide a selective link to MAPK signaling in GABAergic neurons of the direct striatal pathway. *J Biol Chem* 286: 5846-5854, 2011
- Morisset S, Rouleau A, Ligneau X, Gbahou F, Tardivel-Lacombe J, Stark H, Schunack W, Ganellin CR, Schwartz JC, Arrang JM: High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature* 408: 860-864, 2000
- 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, Monsma FJ,Jr: Cloning and characterization of a novel human histamine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 296: 1058-1066, 2001
- Mrzljak L, Bergson C, Pappy M, Huff R, Levenson R, Goldman-Rakic PS: Localization of dopamine D4 receptors in GABAergic neurons of the primate brain. *Nature* 381: 245-248, 1996
- Munzar P, Tanda G, Justinova Z, Goldberg SR: Histamine h3 receptor antagonists potentiate methamphetamine self-administration and methamphetamine-induced accumbal dopamine release. *Neuropsychopharmacology* 29: 705-717, 2004
- Nakai T, Kitamura N, Hashimoto T, Kajimoto Y, Nishino N, Mita T, Tanaka C: Decreased histamine H1 receptors in the frontal cortex of brains from patients with chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry* 30: 349-356, 1991

- Nakamura S, Ohnishi K, Nishimura M, Suenaga T, Akiguchi I, Kimura J, Kimura T: Large neurons in the tuberomammillary nucleus in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Neurology* 46: 1693-1696, 1996
- Nakanishi S, Hikida T, Yawata S: Distinct dopaminergic control of the direct and indirect pathways in reward-based and avoidance learning behaviors. *Neuroscience* 282: 49-59, 2014
- Neame KD: Uptake of Histidine, Histamine and Other Imidazole Derivatives by Brain Slices. *J Neurochem* 11: 655-662, 1964
- Neff NH, Goridis C: Neuronal monoamine oxidase: specific enzyme types and their rates of formation. *Adv Biochem Psychopharmacol* 5: 307-323, 1972
- Nelson AJ, Killcross S: Accelerated habit formation following amphetamine exposure is reversed by D1, but enhanced by D2, receptor antagonists. *Front Neurosci* 7: 76, 2013
- Ng GY, Mouillac B, George SR, Caron M, Dennis M, Bouvier M, O'Dowd BF: Desensitization, phosphorylation and palmitoylation of the human dopamine D1 receptor. *Eur J Pharmacol* 267: 7-19, 1994
- Nguyen T, Shapiro DA, George SR, Setola V, Lee DK, Cheng R, Rauser L, Lee SP, Lynch KR, Roth BL, O'Dowd BF: Discovery of a novel member of the histamine receptor family. *Mol Pharmacol* 59: 427-433, 2001
- Nicola SM, Kombian SB, Malenka RC: Psychostimulants depress excitatory synaptic transmission in the nucleus accumbens via presynaptic D1-like dopamine receptors. *J Neurosci* 16: 1591-1604, 1996
- Nimitvilai S, Brodie MS: Reversal of prolonged dopamine inhibition of dopaminergic neurons of the ventral tegmental area. *J Pharmacol Exp Ther* 333: 555-563, 2010
- Nimitvilai S, McElvain MA, Brodie MS: Reversal of dopamine D2 agonist-induced inhibition of ventral tegmental area neurons by Gq-linked neurotransmitters is dependent on protein kinase C, G protein-coupled receptor kinase, and dynamin. *J Pharmacol Exp Ther* 344: 253-263, 2013
- Nirenberg MJ, Chan J, Liu Y, Edwards RH, Pickel VM: Ultrastructural localization of the vesicular monoamine transporter-2 in midbrain dopaminergic neurons: potential sites for somatodendritic storage and release of dopamine. *J Neurosci* 16: 4135-4145, 1996
- Nishino S, Sakurai E, Nevsimalova S, Yoshida Y, Watanabe T, Yanai K, Mignot E: Decreased CSF histamine in narcolepsy with and without low CSF hypocretin-1 in comparison to healthy controls. *Sleep* 32: 175-180, 2009
- Nowak P, Noras L, Jochem J, Szkilnik R, Brus H, Korossy E, Drab J, Kostrzewa RM, Brus R: Histaminergic activity in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 15: 246-251, 2009

- Nuutinen S, Karlstedt K, Aitta-Aho T, Korpi ER, Panula P: Histamine and H3 receptor-dependent mechanisms regulate ethanol stimulation and conditioned place preference in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 208: 75-86, 2010
- Nuutinen S, Lintunen M, Vanhanen J, Ojala T, Rozov S, Panula P: Evidence for the role of histamine H3 receptor in alcohol consumption and alcohol reward in mice. *Neuropsychopharmacology* 36: 2030-2040, 2011a
- Nuutinen S, Vanhanen J, Pigni MC, Panula P: Effects of histamine H3 receptor ligands on the rewarding, stimulant and motor-impairing effects of ethanol in DBA/2J mice. *Neuropharmacology* 60: 1193-1199, 2011b
- Olds ME, Olds J: Approach-avoidance analysis of rat diencephalon. *J Comp Neurol* 120: 259-295, 1963
- O'Malley KL, Harmon S, Tang L, Todd RD: The rat dopamine D4 receptor: sequence, gene structure, and demonstration of expression in the cardiovascular system. *New Biol* 4: 137-146, 1992
- Omelchenko N, Sesack SR: Periaqueductal gray afferents synapse onto dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area. *J Neurosci Res* 88: 981-991, 2010
- Onali P, Olanas MC, Gessa GL: Characterization of dopamine receptors mediating inhibition of adenylate cyclase activity in rat striatum. *Mol Pharmacol* 28: 138-145, 1985
- Onodera K, Yamatodani A, Watanabe T, Wada H: Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioral disorders. *Prog Neurobiol* 42: 685-702, 1994
- Ookuma K, Yoshimatsu H, Sakata T, Fujimoto K, Fukagawa F: Hypothalamic sites of neuronal histamine action on food intake by rats. *Brain Res* 490: 268-275, 1989
- Ookuma K, Sakata T, Fukagawa K, Yoshimatsu H, Kurokawa M, Machidori H, Fujimoto K: Neuronal histamine in the hypothalamus suppresses food intake in rats. *Brain Res* 628: 235-242, 1993
- Panula P, Nuutinen S: The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. *Nat Rev Neurosci* 14: 472-487, 2013
- Panula P, Yang HY, Costa E: Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 2572-2576, 1984
- Panula P, Pirvola U, Auvinen S, Airaksinen MS: Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neuroscience* 28: 585-610, 1989
- Panula P, Airaksinen MS, Pirvola U, Kotilainen E: A histamine-containing neuronal system in human brain. *Neuroscience* 34: 127-132, 1990

- Panula P, Karlstedt K, Sallmen T, Peitsaro N, Kaslin J, Michelsen KA, Anichtchik O, Kukko-Lukjanov T, Lintunen M: The histaminergic system in the brain: structural characteristics and changes in hibernation. *J Chem Neuroanat* 18: 65-74, 2000
- Panula P, Sundvik M, Karlstedt K: Developmental roles of brain histamine. *Trends Neurosci* 37: 159-168, 2014
- Passani MB, Lin JS, Hancock A, Crochet S, Blandina P: The histamine H3 receptor as a novel therapeutic target for cognitive and sleep disorders. *Trends Pharmacol Sci* 25: 618-625, 2004
- Perreault ML, Hasbi A, Alijaniam M, Fan T, Varghese G, Fletcher PJ, Seeman P, O'Dowd BF, George SR: The dopamine D1-D2 receptor heteromer localizes in dynorphin/enkephalin neurons: increased high affinity state following amphetamine and in schizophrenia. *J Biol Chem* 285: 36625-36634, 2010
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS: Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18: 9996-10015, 1998
- Pickel VM, Joh TH, Field PM, Becker CG, Reis DJ: Cellular localization of tyrosine hydroxylase by immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 23: 1-12, 1975
- Piek JP, Pitcher TM, Hay DA: Motor coordination and kinaesthesia in boys with attention deficit-hyperactivity disorder. *Dev Med Child Neurol* 41: 159-165, 1999
- Pillot C, Heron A, Cochois V, Tardivel-Lacombe J, Ligneau X, Schwartz JC, Arrang JM: A detailed mapping of the histamine H(3) receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience* 114: 173-193, 2002a
- Pillot C, Ortiz J, Heron A, Ridray S, Schwartz JC, Arrang JM: Ciproxifan, a histamine H3-receptor antagonist/inverse agonist, potentiates neurochemical and behavioral effects of haloperidol in the rat. *J Neurosci* 22: 7272-7280, 2002b
- Pollard H, Moreau J, Arrang JM, Schwartz JC: A detailed autoradiographic mapping of histamine H3 receptors in rat brain areas. *Neuroscience* 52: 169-189, 1993
- Prast H, Heistracher M, Philippu A: In vivo modulation of the histamine release in the hypothalamus by adrenoceptor agonists and antagonists. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 344: 183-186, 1991
- Prast H, Heistracher M, Philippu A: Modulation by dopamine receptors of the histamine release in the rat hypothalamus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 347: 301-305, 1993
- Prast H, Prast M, Philippu A: H3 autoreceptors and muscarinic acetylcholine receptors modulate histamine release in the anterior hypothalamus of freely moving rats. *Agents Actions* 41 Spec No: C64-5, 1994



- Prell GD, Green JP, Kaufmann CA, Khandelwal JK, Morrishow AM, Kirch DG, Linnoila M, Wyatt RJ: Histamine metabolites in cerebrospinal fluid of patients with chronic schizophrenia: their relationships to levels of other aminergic transmitters and ratings of symptoms. *Schizophr Res* 14: 93-104, 1995
- Quintero GC: Role of nucleus accumbens glutamatergic plasticity in drug addiction. *Neuropsychiatr Dis Treat* 9: 1499-1512, 2013
- Rampello L, Alvano A, Battaglia G, Bruno V, Raffaele R, Nicoletti F: Tic disorders: from pathophysiology to treatment. *J Neurol* 253: 1-15, 2006
- Rappaport MS, Sealton SC, Prikhozhan A, Huntley GW, Morrison JH: Heterogeneous distribution of D1, D2 and D5 receptor mRNAs in monkey striatum. *Brain Res* 616: 242-250, 1993
- Reid MS, Tafti M, Nishino S, Sampathkumaran R, Siegel JM, Mignot E: Local administration of dopaminergic drugs into the ventral tegmental area modulates cataplexy in the narcoleptic canine. *Brain Res* 733: 83-100, 1996
- Reilly MA, Schayer RW: In vivo studies on histamine catabolism and its inhibition. *Br J Pharmacol* 38: 478-489, 1970
- Reith ME, Xu C, Chen NH: Pharmacology and regulation of the neuronal dopamine transporter. *Eur J Pharmacol* 324: 1-10, 1997
- Renno WM, Mullett MA, Beitz AJ: Systemic morphine reduces GABA release in the lateral but not the medial portion of the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Brain Res* 594: 221-232, 1992
- Rinne JO, Anichtchik OV, Eriksson KS, Kaslin J, Tuomisto L, Kalimo H, Roytta M, Panula P: Increased brain histamine levels in Parkinson's disease but not in multiple system atrophy. *J Neurochem* 81: 954-960, 2002
- Robinson TE, Becker JB: Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res* 396: 157-198, 1986
- Ross ME, Reis DJ, Joh TH: Monoclonal antibodies to tyrosine hydroxylase: production and characterization. *Brain Res* 208: 493-498, 1981
- Rouleau A, Heron A, Cochois V, Pillot C, Schwartz JC, Arrang JM: Cloning and expression of the mouse histamine H3 receptor: evidence for multiple isoforms. *J Neurochem* 90: 1331-1338, 2004
- Ryu JH, Yanai K, Iwata R, Ido T, Watanabe T: Heterogeneous distributions of histamine H3, dopamine D1 and D2 receptors in rat brain. *Neuroreport* 5: 621-624, 1994

Sakata T, Yoshimatsu H, Kurokawa M: Hypothalamic neuronal histamine: implications of its homeostatic control of energy metabolism. *Nutrition* 13: 403-411, 1997

Salamone JD, Correa M, Farrar A, Mingote SM: Effort-related functions of nucleus accumbens dopamine and associated forebrain circuits. *Psychopharmacology (Berl)* 191: 461-482, 2007

Sander K, Kottke T, Stark H: Histamine H3 receptor antagonists go to clinics. *Biol Pharm Bull* 31: 2163-2181, 2008

Sano H, Chiken S, Hikida T, Kobayashi K, Nambu A: Signals through the striatopallidal indirect pathway stop movements by phasic excitation in the substantia nigra. *J Neurosci* 33: 7583-7594, 2013

Schlicker E, Fink K, Detzner M, Gothert M: Histamine inhibits dopamine release in the mouse striatum via presynaptic H3 receptors. *J Neural Transm Gen Sect* 93: 1-10, 1993

Schlicker E, Kathmann M, Detzner M, Exner HJ, Gothert M: H3 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release: an investigation into the involvement of Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> ions, G protein and adenylate cyclase. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 350: 34-41, 1994

Schmitz Y, Schmauss C, Sulzer D: Altered dopamine release and uptake kinetics in mice lacking D2 receptors. *J Neurosci* 22: 8002-8009, 2002

Schneider EH, Schnell D, Papa D, Seifert R: High constitutive activity and a G-protein-independent high-affinity state of the human histamine H(4)-receptor. *Biochemistry* 48: 1424-1438, 2009

Schultz W: Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol* 80: 1-27, 1998

Schultz W, Tremblay L, Hollerman JR: Reward processing in primate orbitofrontal cortex and basal ganglia. *Cereb Cortex* 10: 272-284, 2000

Schwartz JC: The histamine H3 receptor: from discovery to clinical trials with pitolisant. *Br J Pharmacol* 163: 713-721, 2011

Schwartz JC, Arrang JM, Garbarg M, Pollard H, Ruat M: Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol Rev* 71: 1-51, 1991

Schwendt M, Rocha A, See RE, Pacchioni AM, McGinty JF, Kalivas PW: Extended methamphetamine self-administration in rats results in a selective reduction of dopamine transporter levels in the prefrontal cortex and dorsal striatum not accompanied by marked monoaminergic depletion. *J Pharmacol Exp Ther* 331: 555-562, 2009

Seabrook GR, Kemp JA, Freedman SB, Patel S, Sinclair HA, McAllister G: Functional expression of human D3 dopamine receptors in differentiated neuroblastoma x glioma NG108-15 cells. *Br J Pharmacol* 111: 391-393, 1994a

- Seabrook GR, Knowles M, Brown N, Myers J, Sinclair H, Patel S, Freedman SB, McAllister G: Pharmacology of high-threshold calcium currents in GH4C1 pituitary cells and their regulation by activation of human D2 and D4 dopamine receptors. *Br J Pharmacol* 112: 728-734, 1994b
- Seeman P, Ulpian C, Chouinard G, Van Tol HH, Dwosh H, Lieberman JA, Siminovitch K, Liu IS, Wayne J, Voruganti P: Dopamine D4 receptor variant, D4GLYCINE194, in Africans, but not in Caucasians: no association with schizophrenia. *Am J Med Genet* 54: 384-390, 1994
- Seeman P, Schwarz J, Chen JF, Szechtman H, Perreault M, McKnight GS, Roder JC, Quirion R, Boksa P, Srivastava LK, Yanai K, Weinshenker D, Sumiyoshi T: Psychosis pathways converge via D2high dopamine receptors. *Synapse* 60: 319-346, 2006
- Seiden LS, Sabol KE, Ricaurte GA: Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33: 639-677, 1993
- Semenenko FM, Cuello AC, Goldstein M, Lee KY, Sidebottom E: A monoclonal antibody against tyrosine hydroxylase: application in light and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 34: 817-821, 1986
- Sethi J, Sanchez-Alavez M, Tabarean IV: Loss of histaminergic modulation of thermoregulation and energy homeostasis in obese mice. *Neuroscience* 217: 84-95, 2012
- Setlow B: The nucleus accumbens and learning and memory. *J Neurosci Res* 49: 515-521, 1997
- Seutin V, Verbanck P, Massotte L, Dresse A: Acute amphetamine-induced subsensitivity of A10 dopamine autoreceptors in vitro. *Brain Res* 558: 141-144, 1991
- Sherin JE, Elmquist JK, Torrealba F, Saper CB: Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *J Neurosci* 18: 4705-4721, 1998
- Shilling PD, Kelsoe JR, Segal DS: Dopamine transporter mRNA is up-regulated in the substantia nigra and the ventral tegmental area of amphetamine-sensitized rats. *Neurosci Lett* 236: 131-134, 1997
- Shimada S, Kitayama S, Lin CL, Patel A, Nanthakumar E, Gregor P, Kuhar M, Uhl G: Cloning and expression of a cocaine-sensitive dopamine transporter complementary DNA. *Science* 254: 576-578, 1991
- Shin R, Ikemoto S: Administration of the GABAA receptor antagonist picrotoxin into rat supramammillary nucleus induces c-Fos in reward-related brain structures. Supramammillary picrotoxin and c-Fos expression. *BMC Neurosci* 11: 101, 2010
- Siciliano CA, Calipari ES, Ferris MJ, Jones SR: Biphasic mechanisms of amphetamine action at the dopamine terminal. *J Neurosci* 34: 5575-5582, 2014

- Sigma-Aldrich®. (viitattu 1.7.2014) Saatavilla internetistä: [www.sigmaaldrich.com/finland.html](http://www.sigmaaldrich.com/finland.html)
- Skagerberg G, Lindvall O: Organization of diencephalic dopamine neurones projecting to the spinal cord in the rat. *Brain Res* 342: 340-351, 1985
- Smiley JF, Levey AI, Ciliax BJ, Goldman-Rakic PS: D1 dopamine receptor immunoreactivity in human and monkey cerebral cortex: predominant and extrasynaptic localization in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5720-5724, 1994
- Smith Y, Bennett BD, Bolam JP, Parent A, Sadikot AF: Synaptic relationships between dopaminergic afferents and cortical or thalamic input in the sensorimotor territory of the striatum in monkey. *J Comp Neurol* 344: 1-19, 1994
- Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC: Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347: 146-151, 1990
- Stone JM, Pilowsky LS: Novel targets for drugs in schizophrenia. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6: 265-272, 2007
- Stotts AL, Dodrill CL, Kosten TR: Opioid dependence treatment: options in pharmacotherapy. *Expert Opin Pharmacother* 10: 1727-1740, 2009
- Straube A, Mennicken JB, Riedel M, Eggert T, Muller N: Saccades in Gilles de la Tourette's syndrome. *Mov Disord* 12: 536-546, 1997
- Sunahara RK, Guan HC, O'Dowd BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, George SR, Torchia J, Van Tol HH, Niznik HB: Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* 350: 614-619, 1991
- Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, Girault JA, Nairn AC, Greengard P: DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 269-296, 2004
- Takahashi K, Tokita S, Kotani H: Generation and characterization of highly constitutive active histamine H3 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 307: 213-218, 2003
- Takahashi K, Lin JS, Sakai K: Neuronal activity of histaminergic tuberomammillary neurons during wake-sleep states in the mouse. *J Neurosci* 26: 10292-10298, 2006
- Takeshita Y, Watanabe T, Sakata T, Munakata M, Ishibashi H, Akaike N: Histamine modulates high-voltage-activated calcium channels in neurons dissociated from the rat tuberomammillary nucleus. *Neuroscience* 87: 797-805, 1998
- Tang L, Todd RD, Heller A, O'Malley KL: Pharmacological and functional characterization of D2, D3 and D4 dopamine receptors in fibroblast and dopaminergic cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 495-502, 1994

- Tardivel-Lacombe J, Rouleau A, Heron A, Morisset S, Pillot C, Cochois V, Schwartz JC, Arrang JM: Cloning and cerebral expression of the guinea pig histamine H3 receptor: evidence for two isoforms. *Neuroreport* 11: 755-759, 2000
- Taylor KM, Snyder SH: Histamine in rat brain: sensitive assay of endogenous levels, formation in vivo and lowering by inhibitors of histidine decarboxylase. *J Pharmacol Exp Ther* 179: 619-633, 1971
- Thanos PK, Bermeo C, Rubinstein M, Suchland KL, Wang GJ, Grandy DK, Volkow ND: Conditioned place preference and locomotor activity in response to methylphenidate, amphetamine and cocaine in mice lacking dopamine D4 receptors. *J Psychopharmacol* 24: 897-904, 2010
- Thierry AM, Blanc G, Sobel A, Stinus L, Golwinski J: Dopaminergic terminals in the rat cortex. *Science* 182: 499-501, 1973
- Torrealba F, Riveros ME, Contreras M, Valdes JL: Histamine and motivation. *Front Syst Neurosci* 6: 51, 2012
- Traiffort E, Pollard H, Moreau J, Ruat M, Schwartz JC, Martinez-Mir MI, Palacios JM: Pharmacological characterization and autoradiographic localization of histamine H2 receptors in human brain identified with [<sup>125</sup>I]iodoaminopotentidine. *J Neurochem* 59: 290-299, 1992a
- Traiffort E, Ruat M, Arrang JM, Leurs R, Piomelli D, Schwartz JC: Expression of a cloned rat histamine H2 receptor mediating inhibition of arachidonate release and activation of cAMP accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2649-2653, 1992b
- Traiffort E, Leurs R, Arrang JM, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Schwartz JC, Ruat M: Guinea pig histamine H1 receptor. I. Gene cloning, characterization, and tissue expression revealed by in situ hybridization. *J Neurochem* 62: 507-518, 1994
- Ujike H, Akiyama K, Nishikawa H, Onoue T, Otsuki S: Lasting increase in D1 dopamine receptors in the lateral part of the substantia nigra pars reticulata after subchronic methamphetamine administration. *Brain Res* 540: 159-163, 1991
- Ungerstedt U: Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl* 367: 1-48, 1971
- Usiello A, Baik JH, Rouge-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV, Borrelli E: Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* 408: 199-203, 2000
- Uutela P, Reinila R, Harju K, Piepponen P, Ketola RA, Kostianen R: Analysis of intact glucuronides and sulfates of serotonin, dopamine, and their phase I metabolites in rat brain microdialysates by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 81: 8417-8425, 2009

- Valdes JL, Sanchez C, Riveros ME, Blandina P, Contreras M, Farias P, Torrealba F: The histaminergic tuberomammillary nucleus is critical for motivated arousal. *Eur J Neurosci* 31: 2073-2085, 2010
- Vallar L, Muca C, Magni M, Albert P, Bunzow J, Meldolesi J, Civelli O: Differential coupling of dopaminergic D2 receptors expressed in different cell types. Stimulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in LtK- fibroblasts, hyperpolarization, and cytosolic-free Ca<sup>2+</sup> concentration decrease in GH4C1 cells. *J Biol Chem* 265: 10320-10326, 1990
- Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O: Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350: 610-614, 1991
- Vanhala A, Yamatodani A, Panula P: Distribution of histamine-, 5-hydroxytryptamine-, and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and nerve fibers in developing rat brain. *J Comp Neurol* 347: 101-114, 1994
- Vanhanen J, Nuutinen S, Lintunen M, Maki T, Ramo J, Karlstedt K, Panula P: Histamine is required for H(3) receptor-mediated alcohol reward inhibition, but not for alcohol consumption or stimulation. *Br J Pharmacol* 170: 177-187, 2013
- Viggiano D, Vallone D, Sadile A: Dysfunctions in dopamine systems and ADHD: evidence from animals and modeling. *Neural Plast* 11: 97-114, 2004
- Vohora D, Bhowmik M: Histamine H3 receptor antagonists/inverse agonists on cognitive and motor processes: relevance to Alzheimer's disease, ADHD, schizophrenia, and drug abuse. *Front Syst Neurosci* 6: 72, 2012
- Volkow ND: Imaging the addicted brain: from molecules to behavior. *J Nucl Med* 45: 13-24, 2004
- Watanabe T, Taguchi Y, Hayashi H, Tanaka J, Shiosaka S, Tohyama M, Kubota H, Terano Y, Wada H: Evidence for the presence of a histaminergic neuron system in the rat brain: an immunohistochemical analysis. *Neurosci Lett* 39: 249-254, 1983
- Watanabe T, Taguchi Y, Shiosaka S, Tanaka J, Kubota H, Terano Y, Tohyama M, Wada H: 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, 1984
- White T: Formation and catabolism of histamine in brain tissue in vitro. *J Physiol* 149: 34-42, 1959
- Wilens TE: Pharmacotherapy of ADHD in adults. *CNS Spectr* 13: 11-13, 2008
- Williams PJ, MacVicar BA, Pittman QJ: A dopaminergic inhibitory postsynaptic potential mediated by an increased potassium conductance. *Neuroscience* 31: 673-681, 1989

- Wise RA: Opiate reward: sites and substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 13: 129-133, 1989
- Wise RA, Bozarth MA: Brain mechanisms of drug reward and euphoria. *Psychiatr Med* 3: 445-460, 1985
- Wise RA, Leeb K: Psychomotor-stimulant sensitization: a unitary phenomenon? *Behav Pharmacol* 4: 339-349, 1993
- Wisor JP, Nishino S, Sora I, Uhl GH, Mignot E, Edgar DM: Dopaminergic role in stimulant-induced wakefulness. *J Neurosci* 21: 1787-1794, 2001
- Wolf ME: The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Prog Neurobiol* 54: 679-720, 1998
- Wolf ME, Roth RH: Autoreceptor regulation of dopamine synthesis. *Ann N Y Acad Sci* 604: 323-343, 1990
- Xia Y, Driscoll JR, Wilbrecht L, Margolis EB, Fields HL, Hjelmstad GO: Nucleus accumbens medium spiny neurons target non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 31: 7811-7816, 2011
- Yamamoto Y, Mochizuki T, Okakura-Mochizuki K, Uno A, Yamatodani A: Thioperamide, a histamine H<sub>3</sub> receptor antagonist, increases GABA release from the rat hypothalamus. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 19: 289-298, 1997
- Yamashita M, Fukui H, Sugama K, Horio Y, Ito S, Mizuguchi H, Wada H: Expression cloning of a cDNA encoding the bovine histamine H<sub>1</sub> receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 11515-11519, 1991
- Yang R, Hey JA, Aslanian R, Rizzo CA: Coordination of histamine H<sub>3</sub> receptor antagonists with human adrenal cytochrome P450 enzymes. *Pharmacology* 66: 128-135, 2002
- Yasuda T, Masaki T, Chiba S, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H: L-histidine stimulates sympathetic nerve activity to brown adipose tissue in rats. *Neurosci Lett* 362: 71-74, 2004
- Yasuda T, Masaki T, Kakuma T, Hara M, Nawata T, Katsuragi I, Yoshimatsu H: Dual regulatory effects of orexins on sympathetic nerve activity innervating brown adipose tissue in rats. *Endocrinology* 146: 2744-2748, 2005
- Yeragani VK, Tancer M, Chokka P, Baker GB: Arvid Carlsson, and the story of dopamine. *Indian J Psychiatry* 52: 87-88, 2010
- Yokel RA, Wise RA: Increased lever pressing for amphetamine after pimozide in rats: implications for a dopamine theory of reward. *Science* 187: 547-549, 1975

Zhang M, Ballard ME, Pan L, Roberts S, Faghieh R, Cowart M, Esbenshade TA, Fox GB, Decker MW, Hancock AA, Rueter LE: Lack of cataleptogenic potentiation with non-imidazole H3 receptor antagonists reveals potential drug-drug interactions between imidazole-based H3 receptor antagonists and antipsychotic drugs. *Brain Res* 1045: 142-149, 2005

Zhen X, Uryu K, Wang HY, Friedman E: D1 dopamine receptor agonists mediate activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun amino-terminal kinase by a protein kinase A-dependent mechanism in SK-N-MC human neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol* 54: 453-458, 1998

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: Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor. *Mol Pharmacol* 59: 434-441, 2001

Ziemann U, Paulus W, Rothenberger A: Decreased motor inhibition in Tourette's disorder: evidence from transcranial magnetic stimulation. *Am J Psychiatry* 154: 1277-1284, 1997

Zlomuzica A, Viggiano D, De Souza Silva MA, Ishizuka T, Gironi Carnevale UA, Ruocco LA, Watanabe T, Sadile AG, Huston JP, Dere E: The histamine H1-receptor mediates the motivational effects of novelty. *Eur J Neurosci* 27: 1461-1474, 2008

Zlomuzica A, Ruocco LA, Sadile AG, Huston JP, Dere E: Histamine H1 receptor knock-out mice exhibit impaired spatial memory in the eight-arm radial maze. *Br J Pharmacol* 157: 86-91, 2009