

## UDZIAŁ KWASU GLUTAMINOWEGO W REGULACJI AKTYWNOŚCI NADNERCZY KRÓLIKÓW W WYDZIELANIU AMIN KATECHOLOWYCH – BADANIA WSTĘPNE\*

Izabela Szpręgiel<sup>1\*</sup>, Danuta Wrońska<sup>1</sup>, Sylwia Pałka<sup>2</sup>, Michał Kmiecik<sup>2</sup>,  
Bogdan F. Kania<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt,  
al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

<sup>2</sup>Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Katedra Genetyki, Hodowli i Etologii Zwierząt,  
al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

<sup>3</sup>Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Instytut Weterynarii, Uniwersyteckie Centrum Medycyny  
Weterynaryjnej UJ-UR, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

\*E-mail: izabela.szprzegiel@student.urk.edu.pl

*Kwas glutaminowy (Glu) jest najważniejszym neuroprzebieżnikiem pobudzającym w óśrodkowym układzie nerwowym (OUN). Odgrywa ważną rolę w wielu procesach fizjologicznych, takich jak rozwój neuronów, połączeń synaptycznych czy przewodzenie impulsów nerwowych. Obecność rozlicznych receptorów dla tego mediatora układu nerwowego wykazano w wielu narządach organizmu. Celem podjętych badań było określenie wpływu kwasu glutaminowego w warunkach in vitro na aktywność nadnerczy królików w wydzielaniu amin katecholowych. Wyniki badań opisywanych w prezentowanej pracy wykazały hamujący wpływ kwasu glutaminowego na wydzielanie obydwu katecholamin z tkanki nadnerczy. Brak dawkozależności w uwalnianiu noradrenaliny, jak i adrenaliny stwierdzony w badaniach własnych sugeruje, że kwas glutaminowy w stopniu warunkowanym stężeniem moduluje hormonalną czynność nadnerczy. Inaktywacja receptorów NMDA (jonotropowych) dla kwasu glutaminowego w tkance nadnerczy królików przez zastosowanie antagonisty tych receptorów – ketaminy wykazała, że ten rodzaj receptorów w nadnerczach w mniejszym stopniu steruje aktywnością tych gruczołów wewnętrznego wydzielania w warunkach bazalnych. Wyniki badań własnych wskazują, że stosowanie w anestezji ketaminy nie zaburza hormonalnej czynności nadnerczy w wydzielaniu noradrenaliny i adrenaliny.*

*Słowa kluczowe: kwas glutaminowy, aminy katecholowe, nadnercza*

Homeostaza jest kluczowym wyznacznikiem prawidłowego funkcjonowania organizmu, definiowana jest jako zdolność do utrzymania względnie stałego środowiska wewnętrznego. Podstawowymi zadaniami homeostazy są kontrola oraz regulacja

parametrów życiowych. Jednym z najważniejszych mechanizmów regulacyjnych jest układ nerwowy i uwalniane mediatory, nie tylko w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), ale także na obwodzie. Kwas glutaminowy (Glu) jest najbardziej pobudzającym neuroprzekaźnikiem w ośrodkowym układzie nerwowym, o szerokim spektrum działania (Gass i Olive, 2008). Bierze bowiem udział w procesie dojrzewania neuronów, poprzez regulacje procesów ich proliferacji i migracji w okresie rozwoju układu nerwowego, a także sprawnego funkcjonowania tego układu w życiu osobniczym (Lujan i in., 2005; Gass i Olive, 2008). Kwas glutaminowy oddziałuje na komórki docelowe, zarówno w ośrodkowym układzie nerwowym, jak i na obwodzie przez dwa zasadnicze typy receptorów – jonotropowe oraz metabotropowe. Do pierwszych zalicza się receptor NMDA (*N*-metylo-*D*-asparaginowy), AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolepropionowy) oraz receptor kainianowy, które związane są z przepływem jonów wapnia, sodu i potasu. Natomiast w skład receptorów metabotropowych wchodzi trzy podgrupy scharakteryzowane na podstawie wzajemnego podobieństwa sekwencji aminokwasowych (Kania i Wrońska, 2016). Kumulacja amoniaku w mózgu jest wyjątkowo szkodliwa dla organizmu, bowiem skutecznie hamuje procesy zapamiętywania, stąd kolejna szczególnie istotna funkcja kwasu glutaminowego, jaką jest wiązanie i usuwanie amoniaku przez barierę krew-mózg (Beck i in., 2007). Kwas glutaminowy jest także niezbędnym składnikiem protoplazmy komórek nerwowych i pobudza wydzielanie enzymów trzustkowych oraz przyczynia się pośrednio do poprawy przyswajania białek pokarmowych oraz ogółu czynności trawiennych organizmu (Sills i Loo, 1998)

Od kilkudziesięciu lat stosuje się w klinice ketaminę, niespecyficznego antagonistę glutaminergicznych receptorów jonotropowych, mającą zastosowanie analgetyczne, a w dużych dawkach anestetyczne. Lek ten nasila działanie dopaminy i pobudza układ nagrody mózgu, ale także działa przeciwbólowo, antydepresyjnie u ludzi oraz ma zastosowanie w terapii leczenia uzależnień (Wolff i Winstock, 2006).

Czynniki stresogenne różnego pochodzenia zawsze wpływają na zaburzenie podstawowych funkcji organizmu, a gdy oddziaływanie tych czynników jest wydłużone w czasie, może stanowić zagrożenie dla homeostazy. W reakcji organizmu na stres fundamentalne znaczenie mają układ współczulno-nadnerczowy (ang. sympathetic adrenal system; SAS) oraz neuroendokrynną oś podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. hypothalamic-pituitary-adrenal axis; HPA) (Carrasco i Van de Kar, 2003). Efektem aktywności tego pierwszego jest synteza katecholamin (adrenalina, noradrenalina), które stanowią pierwszy front uruchomienia reakcji adaptacyjnych w celu przywrócenia względnej równowagi organizmu (Gunnar i Quevedo, 2007).

Rdzeń nadnerczy, gdzie są syntetyzowane obydwie katecholaminy, jest gruczołem endokrynnym uwalniającym hormony bezpośrednio do krwiobiegu w odpowiedzi na pobudzenie włókien nerwowych współczulnych przedzwojowych. Głównym neuroprzekaźnikiem biorącym udział w przekazywaniu pobudzenia pomiędzy komórkami nerwowymi zazwojowymi a narządami elektorowymi jest noradrenalina (NA), natomiast jednoznacznie wykazano, że ilość wydzielanej adrenaliny z nadnerczy jest znacząco większa w porównaniu z noradrenaliną (Eisenhofer i in., 2004; Arnsten i Li, 2005). Oba wymienione hormony biorą udział w mobilizacji organizmu do ucieczki lub walki w sytuacjach stresowych, uruchamiając procesy metabolicznej adaptacji

w warunkach zaburzenia homeostazy organizmu. Powodują przyspieszenie akcji serca, wzrost ciśnienia krwi, rozszerzenie źrenic oraz oskrzeli. Zwiększają stężenie glukozy we krwi, dzięki nasileniu rozkładu glikogenu w wątrobie, a także bezpośrednio wpływają na modulowanie aktywności nadnerczy w uwalnianiu hormonów warstwy korowej – glikokortykoidosteroidów, których właściwości także ułatwiają adaptację do zmienionych warunków otoczenia (Rosol i in., 2001; Morys i in., 2005).

W świetle powyższych faktów dotyczących właściwości kwasu glutaminowego interesującym wydaje się określenie jego udziału w regulacji czynności nadnerczy w wydzielaniu noradrenaliny i adrenaliny, tym bardziej że wszystkie te trzy media-tory występują także w OUN. Celem podjętych badań było określenie w warunkach *in vitro* ilości wydzielanych do medium inkubacyjnego obydwu amin katecholowych – noradrenaliny i adrenaliny z tkanki nadnerczy królików po zastosowaniu trzech dawek kwasu glutaminowego, a także po zahamowaniu aktywności receptorów jonotropowych dla tego neurotransmitera.

### Material i metody

Doświadczenie wykonano na 7 królikach płci żeńskiej, rasy popieliańskiej białej, w wieku 12 tygodni. Zwierzęta przybywały w specjalnych drewnianych klatkach od momentu urodzenia do chwili rozpoczęcia eksperymentu, początkowo przebywały wraz z matkami, a po odsadzeniu ich od matek w 35. dniu ich życia w indywidualnych klatkach (system bateryjny). Wodę oraz paszę otrzymywały *ad libitum* (gotowa mieszanka pełnoporcjowa firmy DeHeus, dedykowana tej grupie wiekowej). Zastosowany cykl świetlny wynosił 10D:14L. Materiał do analiz (tkanka nadnerczy) został udostępniony dzięki uprzejmości Katedry Genetyki i Metod Doskonalenia Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Króliki dekapitowano, a następnie pozyskane od nich nadnercza umieszczano w szalkach Petriego na lodzie, w roztworze soli fizjologicznej. Nadnercza pozyskane od każdego królika pocięto na mniejsze fragmenty, o zbliżonej masie (ok. 50 mg), obejmujące warstwę korową i rdzenną tego gruczołu. Rozdrobnione fragmenty (skrawki) tkanki nadnerczy umieszczano w studzienkach inkubacyjnych (*cell culture Sigma*), do których wcześniej dodano 1 ml medium inkubacyjnego (bufor fosforanowy Krebsa z dodatkiem glukozy 0,3% i albuminy bydlęcej BSA 0,1%). Inkubacja tkanek przebiegała w atmosferze karbogenu – 95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub> w temperaturze 38°C w inkubatorze Sanyo (MCO-18AIC). Stabilizacja skrawków tkanki nadnerczy trwała 10 min, następnie skrawki tkanki nadnerczy przenoszono do kolejnych dołków zawierających czyste podłoże Krebsa oraz 3 różne dawki kwasu glutaminowego (*L-glutamic acid monosodium salt hydrate; Sigma*): I – 5 μM, II – 50 μM, III – 200 μM w objętości 1 ml podłoża Krebsa. Kontrole stanowiły skrawki inkubowane jedynie czystym buforze Krebsa. Każdy skrawek nadnerczy należący do grupy kontrolnej i grup eksperymentalnych, co 30 minut przekładano do kolejnych studzienek inkubacyjnych. Medium z grup kontrolnych i eksperymentalnych zebrane ze studzienek po upływie 30, 60 i 90 minut inkubacji tkanki nadnerczy królików zostało zamrożone do czasu wykonania analiz. Kolejne skrawki tkanki nadnerczy pozyskane od każdego królika zostały umieszczone w studzienkach inkubacyjnych

zawierających 1 ml buforu Krebsa z trzema dawkami ketaminy w stężeniu: I – 1  $\mu\text{M}$ , II – 10  $\mu\text{M}$  oraz III – 20  $\mu\text{M}$  (Bioketan, Vetoquinol S.A., Magny-Vernois, BP 189, 70200 Lure, Francja), preinkubacja wynosiła 60 min, i tak jak poprzednio, przekładano każdy skrawek tkanki nadnerczy co 30 min do kolejnych dołków inkubacyjnych. Medium z grupy kontrolnej i grup eksperymentalnych zebrane ze studzienek po upływie 30, 60 i 90 minut doświadczenia zostało zamrożone do momentu wykonania planowanych analiz. Metodą radioimmunologiczną (RIA) wykonano oznaczenia stężeń amin katecholowych – adrenaliny i noradrenaliny, używając do tego gotowych zestawów 2 CATFast Tract firmy Labor Diagnostica Nord (Niemcy). Czułość metody oznaczania poszczególnych amin katecholowych wynosiła 19 pg/ml dla adrenaliny, gdzie błąd wewnętrzseryjny wynosił 8,8%, a błąd zewnętrzseryjny 10,1%. Dla noradrenaliny wartości te wynosiły odpowiednio: 42 pg/ml, 10,9% oraz 12,3%.%. Użyte wyniki przeliczano na 1 mg tkanki nadnerczy.

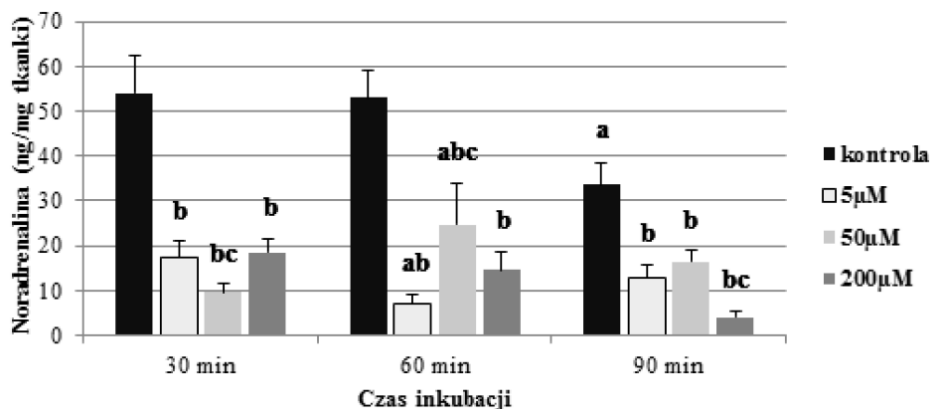
### Analiza statystyczna

Wyniki poddano analizie statystycznej, stosując dwuczynnikową analizę wariancji w blokach kompletnie zrandomizowanych, a istotność różnic pomiędzy średnimi wartościami określano testem Duncana. Obliczenia wykonano, wykorzystując program komputerowy SigmaStat 2,03 (SPSS Science Software GmbH, Niemcy). Prawdopodobieństwo na poziomie 0,05 i 0,01 wskazywało na statystycznie istotne i statystycznie wysoko istotne różnice pomiędzy średnimi wartościami.

## Wyniki

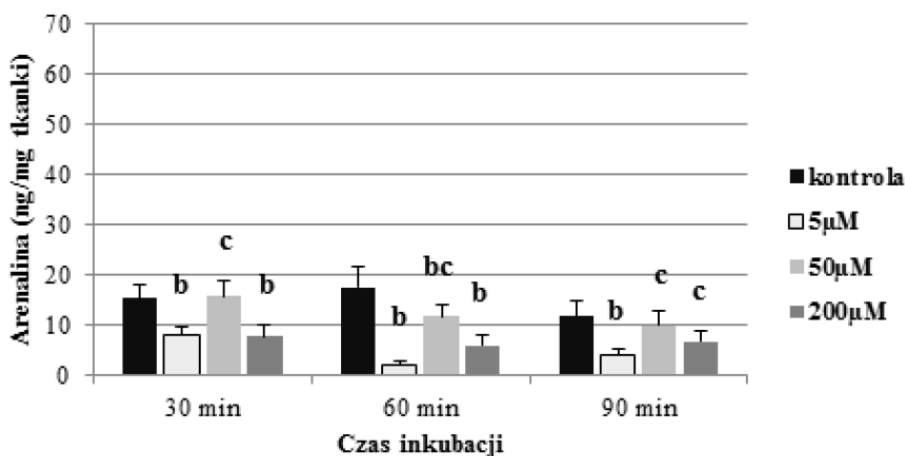
W czasie inkubacji tkanki nadnerczy królików w czystym podłożu Krebsa nie stwierdzono zmian w ilości uwalnianej noradrenaliny w ciągu pierwszych 60 minut doświadczenia, wartości były bardzo podobne (54,0 $\pm$ 8,4 oraz 53,0 $\pm$ 5,9 ng/mg tkanki,  $P>0,05$ ; rys. 1). Ostatni pomiar po 90 minutach eksperymentu wykazał istotnie zmniejszenie się ilości wydzielania noradrenaliny, wartość 33,6 $\pm$ 4,8 ng/mg tkanki okazała się istotnie mniejsza od zanotowanych wcześniej ( $P<0,01$ ). Zastosowanie do inkubacji kwasu glutaminowego w dawce 5  $\mu\text{M}$  spowodowało istotne zmniejszenie wydzielania noradrenaliny do medium inkubacyjnego, stwierdzona po pierwszych 30 min doświadczenia wartość 17,3 $\pm$ 3,8 ng/mg tkanki okazała się istotnie mniejsza od zanotowanej w tym czasie wartości w grupie kontrolnej ( $P<0,01$ ). W czasie kolejnych 30 minut ilość uwalnianej noradrenaliny nadal się zmniejszała i osiągnęła wartość 7,1 $\pm$ 2,1 ng/mg tkanki nadnerczy ( $P<0,01$ ), a ostatni pomiar po 90 minutach inkubacji wykazał zwiększenie się ilości wydzielania tej katecholaminy (12,7 $\pm$ 3,1 ng/mg tkanki). Wartość ta była nadal istotnie mniejsza od stwierdzonej w grupie kontrolnej ( $P<0,01$ ). Dawka 50  $\mu\text{M}$  kwasu glutaminowego dodana do medium inkubacyjnego spowodowała po pierwszych 30 minutach doświadczenia ponad pięciokrotne zmniejszenie się ilości wydzielania noradrenaliny w porównaniu z wartością grupy kontrolnej stwierdzonej w tym czasie inkubacji (9,6 $\pm$ 1,9 ng/mg tkanki;  $P<0,01$ ). W kolejnych 30 minutach istotnie się zwiększyła (24,6 $\pm$ 9,1 ng/mg tkanki;  $P<0,01$ ),

a po 90 minutach zmniejszyła się do 16,4 ng/mg tkanki. Wszystkie stwierdzone wartości w tej grupie różniły się istotnie ( $P<0,01$ ).



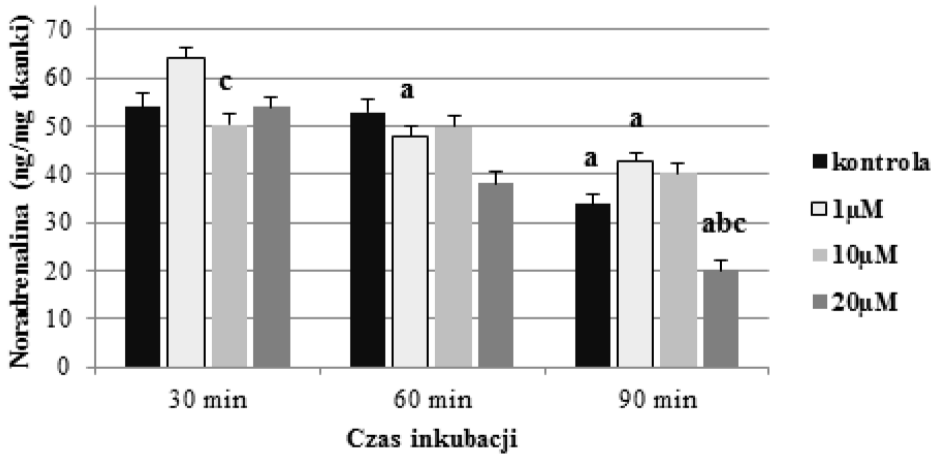
- a – wartości istotnie różne ( $P<0,01$ ) w porównaniu z wartościami określonymi po 30 min inkubacji.  
 b – wartości istotnie różne ( $P<0,01$ ) w porównaniu z wartością w grupie kontrolnej.  
 c – wartości istotnie różne ( $P<0,01$ ) pomiędzy grupami doświadczalnymi w danym czasie.  
 a – values are significantly different ( $P<0.01$ ) from values determined after 30 min of incubation  
 b – values are significantly different ( $P<0.01$ ) from control values  
 c – values are significantly different ( $P<0.01$ ) between experimental groups in a given time.

Rys. 1. Wpływ kwasu glutaminowego na wydzielanie noradrenaliny z tkanki nadnerczy królików  
 Fig. 1. Effect of glutamic acid on noradrenaline secretion from rabbit adrenal tissue



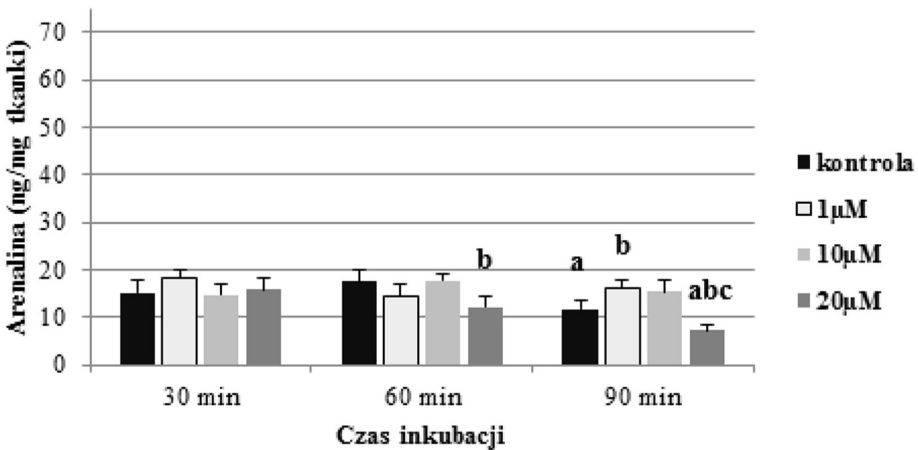
- b – wartości istotnie różne ( $P<0,01$ ) w porównaniu z wartością w grupie kontrolnej.  
 c – wartości istotnie różne ( $P<0,01$ ) pomiędzy grupami doświadczalnymi w danym czasie.  
 b – values are significantly different ( $P<0.01$ ) from control values  
 c – values are significantly different ( $P<0.01$ ) between experimental groups in a given time.

Rys. 2. Wpływ kwasu glutaminowego na wydzielanie adrenaliny z tkanki nadnerczy królików  
 Fig. 2. Effect of glutamic acid on adrenaline secretion from rabbit adrenal tissue



- a – wartości istotnie różne ( $P < 0,01$ ) w porównaniu z wartościami określonymi po 30 min inkubacji.  
 b – wartości istotnie różne ( $P < 0,01$ ) w porównaniu z wartością w grupie kontrolnej.  
 c – wartości istotnie różne ( $P < 0,01$ ) pomiędzy grupami doświadczalnymi w danym czasie.  
 a – values are significantly different ( $P < 0,01$ ) from values determined after 30 min of incubation.  
 b – values are significantly different ( $P < 0,01$ ) from control values.  
 c – values are significantly different ( $P < 0,01$ ) between experimental groups in a given time.

Rys. 3. Wpływ ketaminy na wydzielanie noradrenaliny z tkanki nadnerczy królików  
 Fig. 3. Effect of ketamine on noradrenaline secretion from rabbit adrenal tissue



- a – wartości istotnie różne ( $P < 0,01$ ) w porównaniu z wartościami określonymi po 30 min inkubacji.  
 b – wartości istotnie różne ( $P < 0,01$ ) w porównaniu z wartością w grupie kontrolnej.  
 c – wartości istotnie różne ( $P < 0,01$ ) pomiędzy grupami doświadczalnymi w danym czasie.  
 a – values are significantly different ( $P < 0,01$ ) from values determined after 30 min of incubation  
 b – values are significantly different ( $P < 0,01$ ) from control values  
 c – values are significantly different ( $P < 0,01$ ) between experimental groups in a given time.

Rys. 4. Wpływ ketaminy na wydzielanie adrenaliny z tkanki nadnerczy królików  
 Fig. 4. Effect of ketamine on adrenaline secretion from rabbit adrenal tissue

Najwyższa zastosowana dawka kwasu glutaminowego 200  $\mu\text{M}$  podobnie jak w pozostałych grupach doświadczalnych spowodowała zmniejszenie ilości wydzielanej noradrenaliny do medium inkubacyjnego. W ciągu 90 minut doświadczenia zaobserwowano stopniowe zmniejszanie się wydzielania tej katecholaminy z wartości  $18,5 \pm 3,1$  do  $4,0 \pm 1,2$  ng/mg tkanki. Tylko wartość określona w ostatnim pomiarze, po 90 min doświadczenia okazała się istotnie mniejsza w porównaniu z określonymi po 30 i 60 minutach ( $P < 0,01$ ). Profil wydzielania adrenaliny z tkanki nadnerczy królików po zastosowaniu kwasu glutaminowego przedstawiono na rysunku 2. Nie stwierdzono istotnych zmian w ilości wydzielanej adrenaliny do medium inkubacyjnego w grupie kontrolnej ( $P > 0,05$ ).

Zastosowanie kwasu glutaminowego w dawce 5  $\mu\text{M}$  spowodowało zmniejszenie ilości wydzielanej adrenaliny, stwierdzone wartości  $15,4 \pm 2,8$  po pierwszych 30 min,  $17,6 \pm 4,2$  po 60 min oraz 11,8 ng/mg tkanki po 90 minutach były istotnie mniejsze w porównaniu ze stwierdzonymi w grupie kontrolnej ( $P < 0,01$ ). Wyższa dawka kwasu glutaminowego 50  $\mu\text{M}$  w najmniejszym stopniu spowodowała hamowanie wydzielania tej katecholaminy, tylko wartość stwierdzona po 60 minutach inkubacji okazała się istotnie mniejsza w porównaniu z wartościami grupy kontrolnej ( $P < 0,01$ ). Zastosowana dawka 200  $\mu\text{M}$  spowodowała także zmniejszenie ilości wydzielania adrenaliny z tkanki nadnerczy królików, wartości stwierdzone w terminach pomiarów  $7,7 \pm 2,2$  po 30 min,  $6,0 \pm 1,9$  po 60 min oraz  $6,8 \pm 2,0$  ng/mg tkanki nie różniły się statystycznie ( $P > 0,05$ ), natomiast tylko wartość stwierdzona po 90 min nie różniła się istotnie od stwierdzonej w tym czasie w grupie kontrolnej ( $P > 0,05$ ).

Użycie ketaminy w trzech dawkach 1, 10 i 20  $\mu\text{M}$  do inkubacji tkanki nadnerczy królików nie spowodowało istotnych zmian w ilości wydzielanej noradrenaliny po 30 i 60 minutach doświadczenia w porównaniu z wartościami określonymi w grupie kontrolnej, dopiero po 90 min eksperymentu stwierdzone wartości w grupie kontrolnej i trzech grupach doświadczalnych okazały się istotnie mniejsze w porównaniu z określonymi po 30 minutach eksperymentu. Dodatkowo najwyższa użyta dawka ketaminy 20  $\mu\text{M}$  spowodowała istotne zmniejszenie się ilości wydzielanej noradrenaliny w porównaniu ze wszystkimi pozostałymi grupami ( $P < 0,01$ ; rys. 3). Ilość wydzielanej do medium inkubacyjnego adrenaliny po zastosowaniu trzech dawek ketaminy przedstawiono na rysunku 4. W grupie kontrolnej obserwowano nieistotne różnice ( $15,4 \pm 2,5$  po 30 min,  $17,6 \pm 2,3$  po 60 min oraz  $11,8 \pm 1,9$  ng/mg tkanki po 90 min;  $P > 0,05$ ). Nie stwierdzono istotnych różnic w ilości wydzielanej adrenaliny we wszystkich grupach doświadczalnych w porównaniu z grupą kontrolną po pierwszych 60 minutach eksperymentu. Dopiero po 90 minutach wartość stwierdzona w grupie 1  $\mu\text{M}$  okazała się istotnie większa w porównaniu z grupą kontrolną ( $11,8 \pm 1,9$  vs  $16,6 \pm 1,9$  ng/mg tkanki;  $P < 0,05$ ), natomiast ilość określona w grupie otrzymującej 20  $\mu\text{M}$  w tym czasie inkubacji była istotnie mniejsza od wszystkich pozostałych grup ( $7,2 \pm 1,0$  ng/mg tkanki;  $P < 0,01$ ).

### Omówienie wyników

Wyniki eksperymentu *in vitro* opisywanego w prezentowanej pracy, przeprowadzone na tkance nadnerczy pozyskanej od królików, wykazały, że kwas glutaminowy,

główny mediator pobudzający układu nerwowego, dociera także do tego gruczołu wewnętrznego wydzielania i moduluje wydzielanie amin katecholowych.

Kwas glutaminowy odgrywa bardzo ważną rolę w procesach fizjologicznych oraz patofizjologicznych, takich jak rozwój neuronów oraz połączeń synaptycznych. Jest także powiązany ze stanami emocjonalnymi, poprzez kontakt z innymi neuroprzekaznikami odgrywa bardzo ważne funkcje w ośrodkowym układzie nerwowym (Maciejak i in., 2001). Działanie kwasu glutaminowego jest przede wszystkim warunkowane obecnością specyficznych dla niego receptorów umożliwiających efekt działania na komórki docelowe w danym narządzie, obecność takich receptorów wykazano także w nadnerczach (Felizola i in., 2014; Evanson i Herman, 2015). Kwas glutaminowy oddziałuje na komórki docelowe, przez dwa typy receptorów: jono- i metabotropowe. Najważniejszym receptorem układu glutaminergicznego jest receptor NMDA, przy czym chroniczne pobudzanie tego receptora przez dłuższy okres w zbyt silnych dawkach może przyczynić się do uszkodzenia neuronów (Garcia i in., 2009).

Podczas gdy noradrenalina i dopamina są syntetyzowane zarówno w centralnym układzie nerwowym, jak i w rdzeniu nadnerczy, adrenalina u ssaków jest syntetyzowana przede wszystkim w rdzeniu nadnerczy (Eisenhofer i in., 2004). Noradrenalina uwalniana jest do szczeliny synaptycznej, skąd jej duża część zostaje wychwytywana ponownie do zakończeń presynaptycznych oraz komórek pozaneuronalnych, gdzie podlega magazynowaniu (Dziedzic i in., 2008). Można zatem przypuszczać, że kwas glutaminowy aktywując oś HPA będzie także oddziaływał na układ współczulno-nadnerczowy (Eisenhofer i in., 2004).

Wyniki eksperymentu opisywanego w prezentowanej pracy wykazały zmniejszenie wydzielania noradrenaliny z tkanki rdzenia nadnerczy królików pod wpływem kwasu glutaminowego. Traktowanie w warunkach *in vitro* tkanki rdzenia nadnerczy kwasem glutaminowym w 30 min odstępach czasu wykazało prawie dwukrotne zmniejszenie ilości wydzielanej noradrenaliny do medium inkubacyjnego w każdym terminie pomiarów w porównaniu z wartościami określonymi w tym czasie w grupie kontrolnej. Stwierdzono, że kwas glutaminowy wpływa na sekrecję noradrenaliny, ale niejednoznacznie i nie jest to efekt dawkozależny. Dawka 5  $\mu\text{M}$  kwasu glutaminowego wykazuje podobny efekt na wydzielanie noradrenaliny jak dawka 200  $\mu\text{M}$  (rys. 1). Wyniki przedstawione w prezentowanej pracy dotyczyły wpływu kwasu glutaminowego na wydzielanie adrenaliny z rdzenia nadnerczy wykazały, że aktywność rdzenia nadnerczy w najmniejszym stopniu hamowana była przy zastosowaniu dawki 50  $\mu\text{M}$  kwasu glutaminowego (rys. 2). Po zastosowaniu najmniejszej dawki kwasu glutaminowego 5  $\mu\text{M}$  można zauważyć dwukrotne zmniejszenie wydzielania adrenaliny w stosunku do wartości stwierdzonej w wydzielaniu kontrolnym, po upływie 1h ilość adrenaliny wydzielanej do medium inkubacyjnego zmniejszyła się prawie 8-krotnie w stosunku do kontroli i do końca eksperymentu nie zmieniała się. Zastosowanie dawki 50  $\mu\text{M}$  w początkowej fazie inkubacji nie spowodowało zmniejszenia wydzielania adrenaliny, można stwierdzić jedynie delikatny trend zwiększania się wydzielania tej katecholaminy pod wpływem tej dawki kwasu glutaminowego. Przy zastosowanej dawce 200  $\mu\text{M}$  zauważono 2-krotne zmniejszenie wydzielania adrenaliny i utrzymanie się takiego poziomu w stosunku do kontroli. Po 60 min inkubacji wydzielanie adrenaliny pod wpływem kwasu glutaminowego zmniejszyło się 2-krotnie, a następ-



nie po 90 min ponownie zwiększyło się. Brak jest w dostępnej literaturze doniesień na temat wpływu kwasu glutaminowego na wydzielanie noradrenaliny uwalnianej z zakończeń nerwowych obwodowego układu noradrenergicznego. W niniejszej pracy należy zwrócić uwagę na wyraźne zmniejszenie sekrecji wydzielania noradrenaliny z rdzenia nadnerczy pod wpływem kwasu glutaminowego. Przyjęte przez autorów porównanie w wydzielaniu noradrenaliny pod wpływem najważniejszego antagonisty, jakim jest ketamina, pozwala przybliżyć, jaki efekt mógłby wywołać kwas glutaminowy w stosunku do noradrenaliny pochodzącej z obwodowego układu nerwowego. Zastanawiający jest efekt działania dawki 50  $\mu\text{M}$  kwasu glutaminowego w wydzielaniu zarówno noradrenaliny, jak i adrenaliny, który w najmniejszym stopniu hamuje uwalnianie adrenaliny. Można to tłumaczyć faktem, że działanie kwasu glutaminowego warunkowane jest jego stężeniem, jak również sugeruje kontrolę aktywności danego narządu dostosowaną do pojawienia się określonego stężenia działającego substancji. Ewidentnie są zauważalne podobne proporcje uwalnianej noradrenaliny i adrenaliny. Można także dostrzec, że poziom uwalniania noradrenaliny jest około 3–4-krotnie wyższy niż adrenaliny – głównego hormonu będącego efektem hormonalnej aktywności rdzenia nadnerczy. W przedstawionym eksperymencie zaobserwowano, że dawka 50  $\mu\text{M}$  działa wyraźnie pobudzająco, jak należało się spodziewać, natomiast przy zastosowaniu dawki najwyższej efekt hamowania wynikał prawdopodobnie z zadziałania endogennych mechanizmów uniemożliwiających nadmierne pobudzenie tego gruczołu, a nawet toksyczności tego mediatora.

W celu określenia wpływu kwasu glutaminowego na nadnercza zastosowano jego najważniejszego antagonistę (hamowanie aktywności receptorów NMDA), jakim jest ketamina (Javitt, 2004). W wielu publikacjach wykazano, że hormony rdzenia nadnerczy są czynnikiem wpływającym na działanie ketaminy w organizmie (Launo i in., 2004). Ketamina to substancja, która w małych dawkach stosowana jest jako środek przeciwbólowy, natomiast w większych może być stosowana jako środek znieczulający w krótkich zabiegach operacyjnych. Charakteryzuje się działaniem przeciwbólowym, psychotropowym oraz silnie oddziaływującym na współczulny układ nerwowy poprzez hamujący wpływ na metabolizm noradrenaliny oraz tłumieniu oddziaływania na poszczególne komórki układu nerwowego (Garty i in., 1990; Graf i in., 1995). Wielokrotnie wykazano inhibicyjne działanie ketaminy w odniesieniu do sekrecji katecholamin, np. po zablokowaniu w nadnerczach psów receptorów dla acetylocholiny (Sumikawa i in., 1982), czy przez użycie agonistów receptorów nikotynowych w komórkach chromochłonnych w nadnerczach krów (Purifoy i Holz, 1984). Badania przeprowadzone przez zespół Ko z 2008 roku wykazały dużą zależność pomiędzy dawką i czasem podania dożylnie ketaminy a sekrecją katecholamin. Wyniki te potwierdziły wcześniej poznaną teorię hamowania wydzielania katecholamin przez antagonistów receptora nikotynowego w komórkach chromochłonnych nadnerczy u krów. Badania opisywane w prezentowanej pracy nie wykazały istotnych różnic w wydzielaniu noradrenaliny z rdzenia nadnerczy pod wpływem ketaminy po zastosowaniu mniejszych dawek (1 i 10  $\mu\text{M}$ ). Zdaniem autorów brak reakcji na wielkość uwalniania noradrenaliny z rdzenia nadnerczy wynika z faktu, że synteza katecholamin w rdzeniu nadnerczy przebiega w pełnym szlaku od L-tyrozyny do adrenaliny. Brak wpływu na wydzielanie amin katecholowych z rdzenia nadnerczy może wynikać

także z niewystarczającej ilości lub braku pobudzenia takimi dawkami ketaminy receptorów NMDA w rdzeniu nadnerczy, których jest ona niespecyficznym antagonistą.

Wyniki eksperymentu dotyczącego wpływu ketaminy na sekrecje adrenaliny wykazały brak różnicy w ilości wydzielonej do medium inkubacyjnego adrenaliny uwalnianej z rdzenia nadnerczy (rys. 4). Jednakże można zauważyć, że wpływ tego związku na wydzielanie adrenaliny nie jest dawkozależny. Wydzielanie adrenaliny pod wpływem ketaminy w niskich dawkach (1 i 10  $\mu\text{M}$ ) nie wpływa zasadniczo na jej uwalnianie, natomiast można zauważyć, że podanie dużej dawki ketaminy (20  $\mu\text{M}$ ) powoduje zmniejszenie o 1/3 ilości wydzielanej adrenaliny, zauważalna różnica jest widoczna dopiero po godzinnej inkubacji tkanki rdzenia nadnerczy. Można zatem sądzić, że zastosowanie dużej dawki tej substancji może wpływać toksycznie na rdzeń nadnerczy i przyczyniać się zaburzeń w pracy tego narządu. Podanie ketaminy przywróciło ilość uwalnianych katecholamin oraz powrót do wartości kontrolnych. Można zatem domniemywać, że przy zablokowaniu receptorów NMDA inne receptory kompensacyjnie się aktywują. Wielu autorów w swych publikacjach zwraca uwagę na fakt tłumienia wychwytu noradrenaliny w synaptycznych tkankach nerwowych pod wpływem ketaminy (Garty i in., 1990; Azzoro i Smith, 1997; Graf i in., 1995).

Lingen i in. (1994) określili ekspresję, jak i farmakologię transportera noradrenaliny (NAT) w rdzeniu nadnerczy krów, który jest bardzo podobny do występującego u ludzi (Pacholczyk i in., 1991). Właściwości farmakologiczne transportera noradrenaliny pochodzącego z rdzenia nadnerczy, w porównaniu z NAT pochodzącego z obwodowych noradrenergicznych neuronów cechują się dużym podobieństwem, ale wykazano kilka zasadniczych różnic, stwierdzono bowiem, że różnica w działaniu ketaminy na poziom syntezy i/lub uwalniania noradrenaliny zależy od miejsca jej uwalniania (Bonisch i Bruss, 1994).

Aksoy i in. (2014) opisali wpływ adrenaliny na czas działania i stężenie ketaminy we krwi. Rezultaty były zaskakujące, bowiem u szczurów, którym podawano mniejszą dawkę, przy jednoczesnym tłumieniu syntezy adrenaliny w nadnerczach zaobserwowano szybki efekt jej działania, natomiast przy zastosowaniu większej dawki zauważono 3–4-krotnie dłuższe działanie tego antagonisty. Eksperyment ten wyraźnie wskazuje na dawkozależny efekt ketaminy przy wcześniejszym stłumieniu aktywności hormonalnej nadnerczy.

### **Podsumowanie**

Wyniki eksperymentu *in vitro* opisywanego w prezentowanej pracy, przeprowadzone na tkance nadnerczy pozyskanej od królików, wykazały, że kwas glutaminowy, główny mediator pobudzający układu nerwowego, oraz receptory kwasu glutaminowego modulują wydzielanie adrenaliny i noradrenaliny. Badania opisane w prezentowanej pracy były wykonywane na tkance nadnerczy w stanie bazalnym, bez ich pobudzenia wywołanego np. działaniem czynników stresotwórczych, co z pewnością zmieniłoby hormonalną aktywność nadnerczy, także w wydzielaniu amin katecholowych. Jednoznacznie wykazano hamujący wpływ kwasu glutaminowego na wydzielanie obydwu katecholamin z tkanki nadnerczy. Brak dawkozależności w uwalnianiu noradrenaliny, jak i adrenaliny stwierdzony w badaniach własnych sugeruje, że kwas glutaminowy w stopniu warunkowanym stężeniem moduluje hormonalną czynność

nadnerczy. Inaktywacja receptorów NMDA dla kwasu glutaminowego w tkance nadnerczy królików przez zastosowanie ketaminy wykazała, że ten rodzaj receptorów w nadnerczach w mniejszym stopniu steruje aktywnością tych gruczołów wewnętrznego wydzielania w warunkach bazalnych. Wyniki badań własnych wskazują, że stosowanie w anestezji ketaminy nie zaburza hormonalnej czynności nadnerczy w wydzielaniu noradrenaliny i adrenaliny.

### Piśmiennictwo

- Aksoy M., Ilker I., Ahiskalioglu A., Dostbil A., Celik M., Turan M., Cetin N., Suleyman B., Alp H., Suleyman H. (2014). The suppression of endogenous adrenalin in the prolongation of ketamine anesthesia. *Med. Hypotheses*, 83: 103–107.
- Arnsten A.F., Li B.M. (2005). Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol. Psychiatry*, 57: 1377–1384.
- Azzoro A., Smith D. (1977). The inhibitory action of ketamine HCl on [<sup>3</sup>H]5-hydroxytryptamine accumulation by rat brain synaptosomal-rich fractions: Comparison with [<sup>3</sup>H]catecholamine and [<sup>3</sup>H]γ-aminobutyric acid uptake. *Neuropharmacology*, 16: 349–356.
- Beck B., Karpe J., Królak-Olejnik B., Ciszek M., Arendt J., Król W. (2007). Aktywność aldolazy oraz dehydrogenazy glutaminianowej w surowicy i wątrobie szczurów w czasie zaburzonego odpływu chłonki z tego narządu. *Med. Weter.*, 63: 604–608.
- Bonisch H., Bruss M. (1994). Catecholamine transporter of the plasma membrane. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 733: 193–202.
- Carrasco G., Van de Kar L. (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur. J. Pharmacol.*, 463: 235–272.
- Dziedzic M., Czukiewska E., Solski J. (2008). Aminy katecholowe – zarys właściwości biochemicznych. *Farm. Przegl. Nauk.*, 5: 43–48.
- Eisenhofer G., Kopin I.J., Goldstein D.S. (2004). Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol. Rev.*, 56: 331–349.
- Evanson N., Herman J. (2015). Metabotropic glutamate receptor-mediated signaling dampens the HPA axis response to restraint stress. *Physiol. Behav.*, 15: 91–98.
- Felizola S., Nakamura Y., Satoh F., Morimoto R., Kikuchi K., Nakamura T., Hozawa A., Wang L., Onodera Y., Ise K., McNamara K., Midorikawa S., Suzuki S., Sasano H. (2014). Glutamate receptors and the regulation of steroidogenesis in the human adrenal gland: the metabotropic pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 382: 170–177.
- Garcia L.S., Comim C.M., Valvassori S.S., Réus G.Z., Stertz L., Kapczinski F., Gavioli E.C., Quevedo J. (2009). Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 33: 450–455.
- Garty M., Deka-Starosta A., Stull R., Kopin I., Goldstein D. (1990). Effects of general anesthetics on plasma levels of catechols in intact and in adrenal demedullated rats. *Biog. Amines*, 7: 435–443.
- Gass J.T., Olive M.F. (2008). Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem. Pharmacol.*, 75: 218–265.
- Graf B., Vicenzi M., Martin E., Bosnjak Z., Stowe D. (1995). Ketamine has stereospecific effects in the isolated perfused guinea pig heart. *Anesthesiology*, 82: 1426–1437.
- Gunnar M., Quevedo K. (2007). The neurobiology of stress and development. *Annu. Rev. Psychol.*, 58: 145–173.
- Javitt D.C. (2004). Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Mol. Psychiatry*, 9: 984–997.
- Kania B.F., Wrońska D. (2016). Rola glutaminianu w agresji u zwierząt. *Med. Weter.*, 72: 740–744.
- Ko Y.Y., Jeong Y.H., Lim D.Y. (2008). Influence of ketamine on catecholamine secretion in the perfused rat adrenal medulla. *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, 12: 101–109.

- Launo C., Bassi C., Spagnolo L., Badano S., Ricci C., Lizzi A. (2004). Preemptive ketamine during general anesthesia for postoperative analgesia in patients undergoing laparoscopic cholecystectomy. *Minerva Anesthesiol.*, 70: 727–738.
- Lingen B., Bruss M., Bonisch H. (1994). Cloning and expression of the bovine sodium- and chloride-dependent noradrenaline transporter. *FEBS Letters*, 342: 235–238.
- Lujan R., Shigemoto R., Lopez-Bendito G. (2005). Glutamate and GABA receptor signaling in the developing brain. *Neuroscience*, 86: 125–137.
- Maciejak P., Rokicki D., Członkowska A., Siemiątkowski M., Sienkiewicz-Jarosz H., Szyndler J., Płażnik A. (2001). Receptory metabotropowe dla kwasu glutaminowego: rola fizjologiczna i znaczenie w stanach chorobowych o.u.n. *Postępy Psychiatrii i Neurologii*, 10: 199–217.
- Moryś J., Jeżewska M., Rynkiewicz A. (2005). Znaczenie stresu w patogenezie nadciśnienia tętniczego. Część I. Nadciśnienie tętnicze. *Pomorski Magazyn Lekarski*, 142: 16–18.
- Pacholczyk T., Blakely R., Amara S. (1991). Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter. *Nature*, 350: 350–354.
- Purifoy J., Holz R. (1984). The effects of ketamine, phencyclidine and lidocaine on catecholamine secretion from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Life Sci.*, 35: 1851–1857.
- Rosol T.J., Yarrington J.T., Latendresse J., Capen C.C. (2001). Adrenal gland: structure, function, and mechanisms of toxicity. *Toxicol. Pathol.*, 29: 41–48.
- Sills M.A., Loo P.S. (1989). Tricyclic antidepressants and dextromethorphan bind with higher affinity to the phencyclidine receptor in the absence of magnesium and L glutamate. *Mol. Pharmacol.*, 36:160–168.
- Sumikawa K., Matsumoto T., Amenomori Y., Hkano H., Amakata Y. (1982). Selective actions of intravenous anesthetics on nicotinic- and muscarinic-receptor-mediated response of the dog adrenal medulla. *Anesthesiology*, 59: 412–416.
- Wolff K., Winstock A.R. (2006). Ketamine: from medicine to misuse. *CNS Drugs*, 20: 199–218.

Zatwierdzono do druku: 10 VII 2020

IZABELA SZPRĘGIEL, DANUTA WROŃSKA, SYLWIA PAŁKA, MICHAŁ KMIECIK,  
BOGDAN F. KANIA

**The role of glutamic acid in the regulation of rabbit adrenal activity in the secretion of catecholamines – preliminary research**

SUMMARY

Glutamic acid is the most important excitatory neurotransmitter in the central nervous system. It plays an important role in many physiological processes, such as the development of neurons, synaptic connections, or conduction of nerve impulses. The aim of the study was to determine the effect of glutamic acid *in vitro* on the activity of the adrenal glands of rabbits in the secretion of catecholamines. The results of the studies described in this work have shown the inhibitory effect of glutamic acid on the secretion of both catecholamines from the adrenal tissue. The lack of dose dependence in the release of noradrenaline as well as adrenaline found in our own research suggests that glutamic acid modulates, in a concentration-dependent manner, hormonal adrenal function. Inactivation of NMDA (ionotropic) receptors for glutamic acid in the adrenal tissue of rabbits by the use of an antagonist of these receptors – ketamine has shown that this type of receptor in the adrenal glands controls to a lesser extent the activity of these endocrine glands under basal conditions. The results of our own research indicate that the use of ketamine in anesthesia does not interfere with the adrenal hormone function in the secretion of noradrenaline and adrenaline.

Key words: glutamic acid, catecholamines, adrenal glands