

**WPLYW KWASU GLUTAMINOWEGO NA WYDZIELANIE
GLIKOKORTYKOIDÓW PRZEZ NADNERCZA KRÓLIKÓW
(*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*) W WARUNKACH *IN VITRO* – BADANIA
WSTĘPNE***

Izabela Szpręgiel^{1*}, Danuta Wrońska¹, Sylwia Pałka², Bogdan F. Kania³

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

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

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

³Institut Weterynarii, Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR, Uniwersytet Rolniczy
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

*Kwas glutaminowy jest głównym neuroprzebieźnikiem odpowiedzialnym za pobudzenie ośrodkowego układu nerwowego. Uwalniany przez nerwowe komórki zazwojowe układu nerwowego dociera do wszystkich organów i narządów, na które może działać dzięki obecności specyficznych receptorów. Obecność receptorów dla kwasu glutaminowego wykazano również w nadnerczach, co wskazuje, że może on modulować ich aktywność hormonalną. Celem podjętych badań było sprawdzenie w warunkach *in vitro* wpływu kwasu glutaminowego na nadnercza królików w odniesieniu do ilości wydzielanego kortyzolu i kortykosteronu. Wyniki eksperymentu potwierdziły bezpośredni wpływ kwasu glutaminowego na endokrynną aktywność kory nadnerczy królików w wydzielaniu kortyzolu i kortykosteronu. Zastosowanie do inkubacji tkanki nadnerczy ketaminy, niespecyficznego antagonisty receptorów jonotropowych dla kwasu glutaminowego, wskazuje pośrednio na obecność tego typu receptorów w nadnerczach królików oraz ich udział w modulowaniu aktywności hormonalnej w wydzielaniu glikokortykoidów. Zróżnicowana reakcja i proporcje uwalniania kortyzolu i kortykosteronu sugerują uczestnictwo kwasu glutaminowego w różnych szlakach procesu steroidogenezy nadnerczowej. Wyniki badań wskazują na zasadność wykorzystywania ketaminy w anestezji u tych gatunków zwierząt, których nadnercza syntezują kortyzol.*

Słowa kluczowe: kwas glutaminowy, kortyzol, kortykosteron, nadnercza, króliki

Kwas glutaminowy (Glu) jest głównym neuroprzebieźnikiem odpowiedzialnym za pobudzenie ponad 50% neuronów wchodzących w skład ośrodkowego układu ner-

wowego (OUN). Glu oddziałuje na komórki docelowe przez dwa zasadnicze typy receptorów. Do pierwszych zaliczają się receptory jonotropowe: NMDA (N-metylo-D-asparaginowy), AMPA (α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy) oraz receptory kainianowe, które związane są z przepływem jonów wapnia, sodu i potasu. Drugą grupę tworzą receptory metabotropowe, które dzielą się na trzy podgrupy scharakteryzowane na podstawie wzajemnego podobieństwa sekwencji aminokwasowych oraz sposobem przekazywania sygnału. Glu, oddziałując na komórki docelowe w OUN, jak i na obwodzie pełni szereg istotnych funkcji: odpowiada za wiązanie i usuwanie nadmiaru amoniaku przez barierę krew–mózg, działa antydepresyjnie, usuwa objawy ogólnego zmęczenia organizmu, przyczynia się również pośrednio do poprawy ogółu czynności trawiennych. Badania wykazują, że zarówno niedobór, jak i nadmiar glutamianu może przyczyniać się do powstawania takich chorób jak m.in.: afektywna choroba dwubiegunowa, schizofrenia, depresja, choroba Alzheimera (Hyde i in., 2011; Jin i in., 2018).

Jednoznacznie wykazano, że Glu jest uwalniany z komórek rdzenia nadnerczy (Romero i in., 2003), a także może bezpośrednio oddziaływać na nadnercza. Potwierdza to obecność jego wielu receptorów w tym gruczole wewnętrznego wydzielania u gryzoni, a także u ludzi. Sterowanie ich aktywnością skutkuje zwiększonym uwalnianiem katecholamin z rdzenia nadnerczy w przypadku aktywacji receptorów NMDA u myszy (Watanabe i in., 1994), ale także wpływa na korę nadnerczy, gdzie zlokalizowano receptory AMPA (Kristensen, 1993). Od wielu lat prowadzone są badania nad stresem oraz skomplikowanymi reakcjami kształtowania się procesów adaptacyjnych organizmu. Ustalono, że w kontekście endokrynej reakcji organizmu na stres niezbędnymi gruczołami są nadnercza. Warunkują one odpowiednią reakcję metaboliczną, a także dostarczają organizmowi energię niezbędną do przeciwdziałania stresowi. Z kolei kontrola czynności wszystkich narządów jest warunkowana aktywnością układu nerwowego, którego zadaniem jest integracja funkcjonowania organizmu, rejestrowanie bodźców i przetwarzanie zawartych w nich informacji. Organizm wyposażony jest w dwa układy regulujące jego reakcje na czynniki stresotwórcze. Pierwszym z nich jest autonomiczny układ nerwowy wraz z rdzeniem nadnerczy (*sympathetic adrenal system*; SAS). Zostaje on uruchomiony już w pierwszym momencie reakcji stresowej, a celem jego działania jest natychmiastowa reakcja na działanie czynnika stresotwórczego (Sapolsky i in., 2000). Wyniki zespołu Llewellyn-Smith (1992, 1995) wykazały obecność unerwienia glutaminergicznego w neuronach współczulno-nadnerczowych.

Drugim, a zarazem kluczowym układem regulującym reakcje organizmu na działanie czynników stresotwórczych jest odpowiadająca za kontrolę ilości uwalnianych glikokortykoidów neuroendokryna oś podwzgórze–przysadka–nadnercza (HPA, *hypothalamic–pituitary–adrenal axis*). Poza przygotowaniem organizmu do funkcjonowania w sytuacji zaburzonej homeostazy układ ten nazywany osią stresu kontroluje intensywność przebiegu reakcji stresowej poprzez regulowanie jej aktywności, a także wysyła sygnał do jej zakończenia. Stopień pobudzenia obu tych układów zależy od rodzaju działającego na organizm czynnika stresotwórczego, jego częstotliwości, intensywności oraz czasu trwania (Hardy i Pollard, 2006). Każde nadnercze zbudowane jest z dwóch zasadniczych części: wewnętrznej – rdzenia oraz zewnętrznej – kory.

Rdzeń nadnerczy zbudowany jest z komórek chromochłonnych, odpowiedzialnych za syntezę amin katecholowych, głównie adrenaliny, ale także noradrenaliny. Kora stanowi zasadniczą część gruczołu i składa się z trzech warstw z wyróżnieniem: warstwy kłębkowatej syntetyzującej mineralokortykoidy (aldosteron), warstwy pasmowatej syntetyzującej glikokortykoidosteroidy (kortyzol, kortykosteron oraz kortyzon), warstwy siateczkowatej sąsiadującej bezpośrednio z rdzeniem nadnerczy syntetyzującą androgeny oraz estrogeny (Challis i in., 2000). U większości ssaków głównym glikokortykosteroidem, mającym znaczący wpływ na tempo i kierunek metabolizmu, w tym przede wszystkim gospodarkę białkową i tłuszczową, jest kortyzol, a u ptaków czy gryzoni kortykosteron. Synteza i zwiększone uwalnianie kortyzoli i kortykosteronu do układu krążenia w sytuacjach stresowych ułatwia metaboliczną adaptację do zmienionych warunków otoczenia, a warunkowane jest bezpośrednio poprzez działanie na organizm czynników stresotwórczych. Do stresorów zaliczamy rozliczne bodźce fizyczne oraz psychiczne, które wywołają emocje: strach, lęk, niepokój czy wymuszony kontakt z człowiekiem (Rosol i in., 2001).

W świetle powyższych faktów dotyczących właściwości kwasu glutaminowego interesującym wydaje się określenie jego udziału w regulacji czynności nadnerczy w wydzielaniu glikokortykoidosteroidów. Od wielu lat stosuje się w klinice ketaminę, niespecyficznego antagonistę glutaminergicznych receptorów jonotropowych, mającą zastosowanie analgetyczne oraz anestetyczne. Lek ten nasila działanie dopaminy i pobudza układ nagrody mózgu, ale także działa przeciwbólowo, u ludzi antydepresyjnie i ma zastosowanie w terapii leczenia uzależnień (Wolff i Winstock, 2006).

Celem podjętych badań było określenie w warunkach *in vitro* ilości wydzielanych do medium inkubacyjnego glikokortykoidosteroidów – kortyzolu i kortykosteronu z tkanki nadnerczy królików po zastosowaniu trzech dawek kwasu glutaminowego, a także po zahamowaniu aktywności receptorów jonotropowych dla tego neurotransmitera.

Material i metody

Doświadczenie zostało przeprowadzone na 7 niedojrzałych samicach królików (*Oryctolagus cuniculus*) w wieku 12 tygodni. Zwierzęta utrzymywane były w systemie bateryjnym, pojedynczo w klatkach o wymiarach zgodnych z zaleceniami, a następnie po odsadzeniu w 35. dniu ich życia w indywidualnych klatkach (system bateryjny) ze swobodnym dostępem do wody i paszy (gotowa mieszanka pełnoporcjowa firmy DeHeus, dedykowana tej grupie wiekowej). Zastosowany cykl świetlny wynosił 10D: 14L. Materiał do analiz (tkanka nadnerczy) otrzymano dzięki uprzejmości Katedry Genetyki i Metod Doskonalenia Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, wykorzystującej tuszki królików do prowadzonych badań własnych. Króliki dekapitowano, a następnie pozyskane od nich nadnercza umieszczano w szalkach Petriego na lodzie, w roztworze soli fizjologicznej. Następnie nadnercza od każdego królika pocięto na mniejsze fragmenty, o zbliżonej masie (ok. 50 mg), obejmujące warstwę korową i rdzenną tego gruczołu. Skrawki tkanki nadnerczy umieszczano w dołkach inkubacyjnych płytki wielodołkowej (*cell culture*; Sigma-Aldrich, St. Lo-

uis, USA) zawierających 1 ml medium inkubacyjnego (bufor fosforanowy Krebsa z dodatkiem glukozy 0,3% i albuminy bydłowej BSA 0,1%). Inkubację tkanek prowadzono w atmosferze karbogenu – 95% O₂ i 5% CO₂ w temperaturze 38°C w inkubatorze firmy Sanyo (Japonia). Dawka została wcześniej doświadczalnie ustalona; są to dane nieopublikowane oraz dane pochodzące z poprzedniego doświadczenia (Szpręgiel i in., 2020). Po 10 minutach inkubacji w podłożu Krebsa skrawki tkanki nadnerczy przenoszono do kolejnych dołków zawierających czyste podłoże Krebsa oraz 3 różne dawki kwasu glutaminowego (*L-glutamic acid monosodium salt hydrate*; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA): I – 5 μM, II – 50 μM, III – 200 μM w objętości 1 ml podłoża Krebsa, po czym ten sam skrawek nadnerczy co 30 minut przenoszono do kolejnych dołków inkubacyjnych zawierających medium inkubacyjne z kwasem glutaminowym. Medium zebrane z dołków po 30, 60 i 90 minutach inkubacji tkanki nadnerczy królików zamrażano do czasu wykonania analiz. Kolejne skrawki nadnerczy pozyskane od każdego królika umieszczano w 1 ml buforu Krebsa w dołkach inkubacyjnych z trzema dawkami ketaminy w stężeniu: I – 1 μM, II – 10 μM oraz III – 20 μM (Bioketan, Lure, Francja) na okres 60 minut (preinkubacja), po czym tak jak poprzednio przenoszono skrawek tkanki nadnerczy do kolejnych dołków, co 30 min, które zawierały tylko czysty bufor Krebsa. Medium zebrane z dołków po 30, 60 i 90 minutach doświadczenia zamrażano do czasu wykonania analiz. W medium inkubacyjnym oznaczano metodą radioimmunologiczną (RIA) stężenie kortyzolu przy użyciu gotowych zestawów Cortisol-RIA-CT (DIASource, Louvain-la-Neuve, Belgia). Radioaktywność prób mierzono w sprzężonym z komputerem liczniku promieniowania gamma „Wizard” (LKB, Austria). Czulość metody oznaczania tego hormonu wynosiła 0,9 μg/L, błąd wewnątrzseryjny 11,5%, a błąd zewnątrzseryjny 6,2%. Stężenie kortykosteronu w medium inkubacyjnym zostało oznaczone metodą immunoenzymatyczną (ELISA) przy użyciu gotowego zestawu Corticosterone-EIA-4164 (DRG, Marburg, Niemcy). Wyniki zostały podane analizie spektrofotometrycznej przy długości fali 450 nm przy użyciu spektrofotometru Epoch 2 (BioTek, USA). Czulość oznaczania tego hormonu wynosiła 0,56 ng/ml, błąd wewnątrzseryjny 6,1%, a błąd zewnątrzseryjny 3,6%. Uzyskane wyniki przeliczano na 1 mg tkanki nadnerczy.

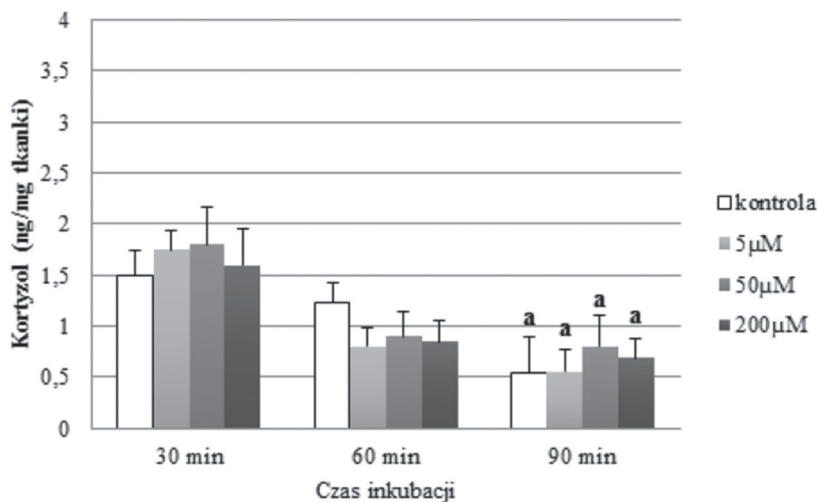
Analiza statystyczna

Wyniki poddano analizie statystycznej, stosując dwuczynnikową analizę wariancji w blokach kompletnie zrandomizowanych. Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi określano testem Duncana. Obliczenia przeprowadzono z użyciem programu komputerowego SigmaStat 2,03 (SPSS Science Software GmbH, Niemcy). Prawdopodobieństwo na poziomie 0,05 i 0,01 wskazywało na statystycznie istotne i wysoko statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami średnimi.

Wyniki

W grupie kontrolnej w trakcie 90-minutowego doświadczenia wykazano stopniowy spadek wydzielania kortyzolu z wartości $1,5 \pm 0,25$ ng/mg tkanki po pierwszych 30 min do $0,54 \pm 0,22$ ng/mg tkanki po 90 min, dopiero ta wartość okazała się istotnie

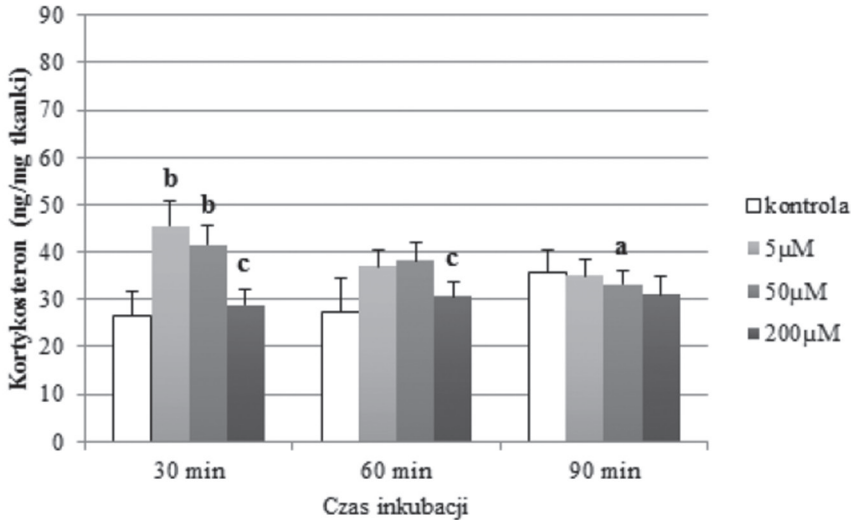
niższa od początkowej ($P < 0,01$; rys. 1). We wszystkich trzech grupach doświadczalnych nie stwierdzono istotnych różnic w każdym z pomiarów (30 min, 60 min, 90 min) w jednakowym stopniu po zastosowaniu kwasu glutaminowego w stężeniu 5, 50 i 200 μM ($P > 0,05$).



Rys.1. Wpływ kwasu glutaminowego na wydzielanie kortyzolu z tkanki nadnerczy królików
 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
 Fig. 1. Effect of glutamic acid on cortisol secretion from rabbit adrenal tissue
 a – significantly different values ($P < 0.01$) compared to the values after 30 min of incubation
 b – significantly different values ($P < 0.01$) compared to the control group value

Ilość wydzielanego z tkanki nadnerczy królików kortykosteronu w grupie kontrolnej nie zmieniała się w czasie trwania eksperymentu, stwierdzone wartości: $26,4 \pm 5,4$ po 30 min, $27,4 \pm 7,2$ po 60 min oraz $35,6 \pm 4,8$ ng/mg tkanki nie różniły się statystycznie ($P > 0,05$). Zastosowanie najniższej dawki kwasu glutaminowego 5 μM spowodowało istotny wzrost uwalniania kortykosteronu do medium inkubacyjnego w porównaniu z grupą kontrolną ($45,5 \pm 5,2$ ng/mg tkanki $P < 0,01$). Wyższa dawka kwasu glutaminowego 50 μM , w takim samym stopniu spowodowała wzrost uwalniania kortykosteronu ($41,6 \pm 3,9$ ng/mg tkanki; $P < 0,01$). Wartości w grupie traktowanej najwyższą dawką kwasu glutaminowego nie różniły się istotnie od stwierdzonych w tym czasie inkubacji w grupie kontrolnej ($28,8 \pm 3,2$ ng/mg tkanki $P > 0,05$). Po 60 minutach doświadczenia wartości dwóch pierwszych grup doświadczalnych były niższe, ale określone wielkości nie różniły się istotnie ze stwierdzonymi w tym czasie w grupie kontrolnej ($P > 0,05$). Jedynie wartość określona w grupie traktowanej 200 μM kwasu glutaminowego okazała się istotnie niższa w porównaniu z dwiema pozostałymi grupami doświadczalnymi ($30,6 \pm 2,9$ ng/mg tkanki; $P < 0,05$). W ostatnim pomiarze po 90 minutach nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy wszystkimi grupami ($P > 0,05$) (rys. 2). Zastosowanie ketaminy w trzech dawkach (1, 10 i 20 μM) nie zmieniło ilości wydzielanego kortyzolu po pierwszych 30 min eksperymentu

(rys. 3). W dalszych minutach eksperymentu zaobserwowano istotny spadek wydzielania kortyzolu z tkanki nadnerczy królików we wszystkich trzech grupach doświadczalnych ($P < 0,01$). Po 90 minutach eksperymentu ilość wydzielanego kortyzolu była niższa, ale ze względu na podobne wartości stwierdzone w tym czasie inkubacji w grupie kontrolnej wyniki okazały się nieistotne statystycznie ($P > 0,05$; ryc. 3).



Rys. 2. Wpływ kwasu glutaminowego na wydzielanie kortykosteronu z tkanki nadnerczy królików

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

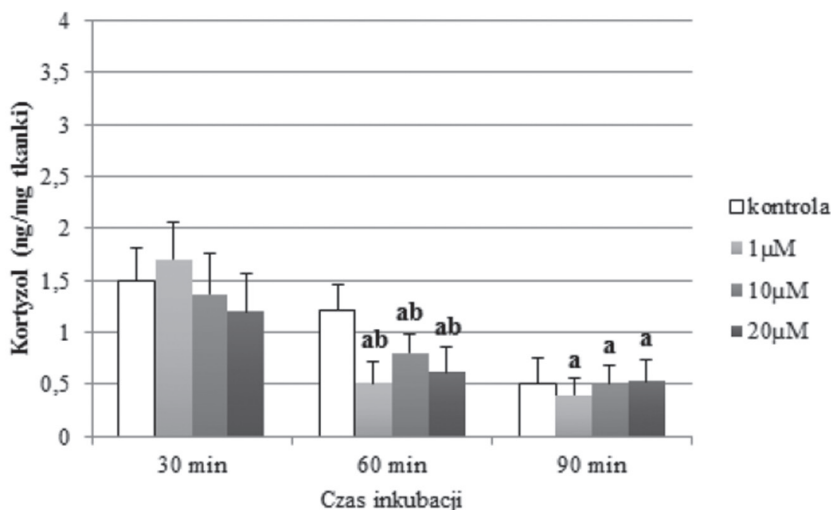
Fig. 2. Effect of glutamic acid on corticosterone secretion from rabbit adrenal tissue

a – significantly different values ($P < 0.01$) compared to the values after 30 min of incubation

b – significantly different values ($P < 0.01$) compared to the control group value

c – significantly different values ($P < 0.01$) between experimental groups in a given time

Natomiast zastosowanie ketaminy do inkubacji tkanki nadnerczy pozyskanych od królików spowodowało istotny wzrost wydzielania kortykosteronu do medium inkubacyjnego we wszystkich grupach doświadczalnych, szczególnie po pierwszych 30 min eksperymentu (ryc. 4). Najmocniejszy efekt stwierdzono przy najwyższej zastosowanej dawce ketaminy 20 μ M, ilość wydzielanego do medium kortykosteronu wzrosła ponad trzykrotnie w porównaniu z wartością grupy kontrolnej ($26,4 \pm 5,4$ vs $74,4 \pm 7,3$ ng/mg tkanki; $P < 0,01$). Efekt w dwóch pozostałych grupach był słabszy ($54,2 \pm 6,1$ oraz $44,00 \pm 4,2$ ng/mg tkanki), ale wartości były nadal istotnie wyższe w porównaniu z kontrolą ($P < 0,01$). W kolejnych 30 minutach we wszystkich grupach doświadczalnych stwierdzono istotny spadek wydzielania tego hormonu, chociaż w grupie traktowanej ketaminą 20 μ M określona wartość była nadal istotnie wyższa w porównaniu z dwiema pozostałymi grupami doświadczalnymi i grupą kontrolną ($50,3$ ng/mg tkanki; $P < 0,01$). W ostatnim pomiarze po 90 min stwierdzono wzrost ($P < 0,01$) wydzielanego do medium kortykosteronu ($62,4 \pm 7,1$ ng/mg tkanki), podobnie jak w kolejnej grupie doświadczalnej otrzymującej 10 μ M ketaminy ($50,3 \pm 6,0$ ng/mg tkanki). Przy zastosowaniu 20 μ M ketaminy określona wartość ($35,1 \pm 5,8$ ng/mg tkanki) była taka sama jak w grupie kontrolnej (rys. 4).



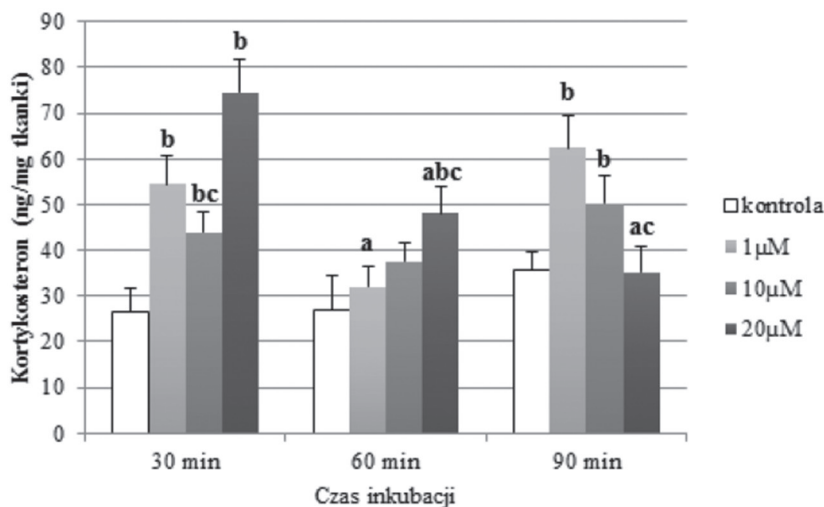
Rys. 3. Wpływ ketaminy na wydzielanie kortyzolu z tkanki nadnerczy królików
 a – wartości istotnie różne ($P < 0,01$) w porównaniu z wartościami określonymi po 30 min inkubacji

b – wartości istotnie różne ($P < 0,01$) w porównaniu z wartością w grupie kontrolnej

Fig. 3. Effect of ketamine on cortisol secretion from rabbit adrenal tissue

a – significantly different values ($P < 0,01$) compared to the values after 30 min of incubation

b – significantly different values ($P < 0,01$) compared to the control group value



Rys. 4. Wpływ ketaminy na wydzielanie kortykosteronu z tkanki nadnerczy królików
 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

Fig. 4. Effect of ketamine on corticosterone secretion from rabbit adrenal tissue

a – significantly different values ($P < 0,01$) compared to the values after 30 min of incubation

b – significantly different values ($P < 0,01$) compared to the control group value

c – significantly different values ($P < 0,01$) between experimental groups in a given time

Omówienie wyników

Badania własne opisywane w prezentowanej pracy wykazały, że w warunkach *in vitro* Glu może oddziaływać bezpośrednio na nadnercza, w odniesieniu do ilości wydzielanych obydwu glikokortykoidów z tkanki nadnerczy królików. Glu jest najbardziej pobudzającym neurotransmiterem w układzie nerwowym, naturalnie występującym w organizmie ssaków, a jego stężenie we krwi obwodowej jest stabilne i wynosi od 20 do 50 μM (Hediger i Welbourne, 1999). Liczne wyniki badań naukowych jednoznacznie dowodzą kluczowej roli, jaką kwas glutaminowy pełni w procesie przewodzenia impulsów nerwowych przez komórki nerwowe. Jednak pełna i obiektywna charakterystyka tego neuroprzekaźnika wymaga zwrócenia uwagi na negatywne skutki związane z jego nadmiernym występowaniem w organizmie. Konsekwencją zbyt dużej ilości Glu, spowodowanej nadmiernym napływem jonów wapnia i sodu do wnętrza komórek nerwowych, może być ich obrzęk, zmiany strukturalne, a nawet śmierć neuronów (Waelsch, 1951). Nadmierna ilość kwasu glutaminowego uwalnianego do przestrzeni zewnątrzkomórkowej w OUN powoduje znacznie szybsze przekazywanie informacji pomiędzy komórkami. Procesowi temu może towarzyszyć również apoptoza, czego efektem jest powstanie „fali”, w której ginie znacznie więcej neuronów niż w przypadku prawidłowych stężeń kwasu glutaminowego (Koyama i in., 1997).

W organizmach ssaków odpowiednie stężenie glikokortykoidów w osoczu krwi jest wynikiem stopnia pobudzenia czynności neuroendokrynnej osi podwzgórze–przysadka mózgowa–nadnercza. Podwzgórze reaguje na niekorzystne czynniki fizyczne lub emocjonalne i aktywuje ten neuroendokrynną układ, czego końcowym efektem jest zwiększenie syntezy i uwalniania do układu krążenia glikokortykosteroidów: kortyzolu i/lub kortykosteronu (Buttgereit i in., 2004). Króliki zdolne są do syntezy obu tych hormonów, a ich fizjologiczne właściwości są podobne (Szeto i in., 2004). Eksperyment własny opisywany w prezentowanej pracy wykazał, że nadnercza królików wydzielają znacznie mniej kortyzolu, potwierdzając, że szlak steroidogenezy u tych zwierząt jest znacznie bardziej ukierunkowany na syntezę kortykosteronu (Buckingham, 2006). Skierowanie syntezy glikokortykoidów w kierunku kortykosteronu związane jest z większą aktywnością enzymu dehydrogenazy 3β -hydroksysteroidowej (3β -HSD) (Rasmussen i in., 2013). Równocześnie stwierdzono zróżnicowaną reakcję nadnerczy na kwas glutaminowy w odniesieniu do obydwu omawianych glikokortykosteroidów. W przypadku kortyzolu nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy wartościami określonymi po pierwszych 30 minutach eksperymentu dla wszystkich trzech zastosowanych dawek kwasu glutaminowego w stosunku do grupy kontrolnej.

Na podstawie analizy uwalnianego kortyzolu do medium inkubacyjnego zaobserwowano jedynie trend wyższych wartości zanotowanych we wszystkich trzech grupach doświadczalnych. W dalszych minutach eksperymentu stwierdzono spadek wydzielanego do medium inkubacyjnego kortyzolu, we wszystkich grupach trend większego hamowania wydzielania tego hormonu był bardziej zauważalny w grupach doświadczalnych, mimo że różnice nadal nie były istotnie różne.

Profil wydzielania kortykosteronu z tkanki nadnerczy królików wykazał, że po pierwszych 30 minutach eksperymentu stwierdzono istotne, w porównaniu z warto-

ściami grupy kontrolnej, zwiększenie ilości wydzielanego do medium inkubacyjnego kortykosteronu. Po 30 i 60 minutach eksperymentu zaobserwowano efekt dawkozależności, chociaż w 60. minucie eksperymentu wartości były istotnie mniejsze w porównaniu z wartościami odnotowanymi po pierwszych 30 minutach. Wykazano zaskakujący efekt kwasu glutaminowego na uwalnianie tego hormonu po 90 minutach inkubacji tkanki nadnerczy. Określone w tym czasie wartości stężenia kortyzolu nieoczekiwanie okazały się odwrotnie proporcjonalne przy zwiększaniu dawki kwasu glutaminowego.

Reakcja nadnerczy królików na działanie kwasu glutaminowego wiąże się z koniecznością obecności w tym narządzie określonych receptorów dla tego neurotransmitera. Kwas glutaminowy oddziałuje na komórki docelowe przez dwa typy receptorów – metabotropowe oraz jonotropowe. Obydwa typy receptorów są napięciowo zależne oraz odpowiedzialne za przesyłanie sygnałów w centralnym układzie nerwowym i tkankach obwodowych (Julio-Pieper i in., 2011). Wykazano, że wymienione receptory obecne są zarówno w podwzgórzu, przysadce mózgowej, ale i w nadnerczach, co może sugerować ich rolę w neuroendokrynej regulacji aktywności osi HPA (Mahesh i in., 1999; Coutinho i Knopfel, 2002; Pokusa i in., 2014). Stwierdzona w badaniach własnych reakcja nadnerczy na podanie kwasu glutaminowego na ogół nie wyrażała się w istotnych statystycznie zmianach w ilości wydzielanego do medium kortyzolu, co być może wiązało się ze słabym pobudzeniem lub brakiem odpowiednich receptorów Glu w nadnerczach. W badaniach własnych zablokowano aktywność receptorów NMDA w tkance nadnerczy królików przez użycie ich niespecyficznego antagonisty, jakim jest ketamina. Jest to wielofunkcyjny, organiczny związek chemiczny, zaliczany do substancji psychoaktywnych, niekonkurencyjnych antagonistów receptorów NMDA, który współdziała z zależnymi od napięcia kanałami jonowymi Ca^{2+} (Hirota i Lambert, 1996). Ketamina jest stosowana powszechnie w medycynie i medycynie weterynaryjnej jako lek służący do znieczulania przedoperacyjnego; oprócz wywoływania narkozy ma także silne działanie przeciwbólowe. Wykorzystywana jest również w anestezji do wprowadzenia pacjenta w stan znieczulenia złożonego. Ketamina wywołuje specyficzny rodzaj narkozy, jej działanie polega na selektywnym hamowaniu określonych struktur OUN, co prowadzi do utraty przytomności. Wyniki badań klinicznych dowodzą, że odpowiednie dawkowanie ketaminy łagodzi objawy ostrej depresji (Zarate i in., 2006). Przeprowadzone badania własne wykazały, że ketamina zmienia aktywność endokrynną nadnerczy królików w warunkach *in vitro*. Podanie tego związku chemicznego we wszystkich trzech zastosowanych dawkach (1, 10, i 20 μ M) powodowało na ogół zmniejszenie ilości wydzielanego kortyzolu z tkanki nadnerczy królików. Efekt ten był najbardziej widoczny po 60 minutach doświadczenia. Po 90 minutach eksperymentu ilość wydzielanego kortyzolu nadal zmniejszała się, jednak ze względu na zasadniczo podobne wartości stwierdzone w tym czasie inkubacji w grupie kontrolnej wyniki okazały się nieistotne. Natomiast analiza wyników ilustrujących wpływ ketaminy na wydzielanie kortykosteronu z nadnerczy królików wykazała, że zastosowanie tego związku chemicznego spowodowało istotny wzrost wydzielania kortykosteronu do medium inkubacyjnego we wszystkich grupach doświadczalnych. Efekt ten był najbardziej widoczny po zastosowaniu najwyższej dawki ketaminy (20 μ M) po pierwszych

30 minutach inkubacji. W kolejnych minutach eksperymentu (60 i 90 min) tendencja była podobna, ale słabsza. Można zatem przypuszczać, że ketamina może wpływać na końcowy etap procesu steroidogenezy jako czynnik hamujący aktywność cytochromu P450c17 odpowiedzialnego za przekształcenie pregnenolonu w 17-OH-pregnenolon oraz progesteronu do 17-OH-progesteronu. Ponadto można domniemywać, że ketamina powoduje wzrost aktywności enzymu 3β -HSD lub innych enzymów zawierających cytochrom P450 odpowiedzialnych za przekształcenie 11-deoksykortykosteronu w kortykosteron.

Badania własne wykazały zmienny wpływ kwasu glutaminowego na sekrecję kortyzolu i kortykosteronu z tkanki nadnerczy, natomiast równoległe prowadzone badania wykazały także zmienny wpływ kwasu glutaminowego na wydzielanie amin katecholowych z tkanki nadnerczy. Wykazano, że pod wpływem różnych dawek kwasu glutaminowego następuje hamowanie uwalniania adrenaliny z nadnerczy królików, w przeciwieństwie do noradrenaliny, gdzie zmiany tych nie zaobserwowano (Szpręgiel i in., 2020). Rdzeń nadnerczy zbudowany jest z komórek chromatofilnych, odpowiedzialnych za syntezę amin katecholowych – głównie adrenaliny, ale także noradrenaliny. Oba wymienione hormony biorą udział w mobilizacji organizmu do ucieczki lub walki w sytuacjach stresowych. Oprócz wymienionych funkcji, po pobudzeniu nerwu trzewnego wpływają w sposób bezpośredni na wyrzut hormonów kory nadnerczy, w tym kortyzolu i kortykosteronu (Rosol, 2001).

Powyższe rozważania skłaniają do istotnej sugestii, w odniesieniu do uzyskanych wyników doświadczenia własnego, że należałoby dodatkowo zbadać aktywność nadnerczy królików poddanych działaniu czynnika stresotwórczego, co z pewnością spowodowałoby zmiany w stopniu pobudzenia osi HPA. Warto także podkreślić cykl dobowy sekrecji glikokortykoidosteroidów, ponieważ cechuje je wyraźna zależność czasowa – okołodobowa, jak i szybka pulsacyjna. Okołodobowy szczyt wydzielania glikokortykoidów jest ściśle powiązany z aktywnością zwierząt. U zwierząt dziennych przypada on na wczesne godziny poranne, natomiast pulsacyjne wydzielanie glikokortykoidów odbywa się średnio 1-2 razy w ciągu godziny (Dickmeis, 2009). Takie pulsacyjne wydzielanie glikokortykoidosteroidów, wynikające najprawdopodobniej z indywidualnych cech osobniczych występuje również u królików. Stwierdzono, że samce królika wydzielają kortykosteron i kortyzol w rytmie dobowym, osiągając szczyt sekrecji popołudniu, natomiast najniższe dobowe stężenie tego hormonu zaobserwowano po godzinie 06:00. Oznacza to, że króliki różnią się fazą z ludzkim rytmem wydzielania glikokortykoidów (Szeto i in., 2004).

Podsumowując, przeprowadzony eksperyment wykazał, że nadnercza znajdują się także pod kontrolą układu nerwowego i uwalnianych mediatorów. Stwarza to możliwość dodatkowej regulacji aktywności tego gruczołu wewnętrznego wydzielania. Paradoksalnie, to hormony steroidowe syntetyzowane przez ten gruczoł są uwalniane w każdym znaczącym zaburzeniu homeostazy organizmu. Wyniki badań własnych skłaniają do podjęcia kolejnych eksperymentów w ramach omawianego tematu, np. w czasie działania na organizm czynników stresotwórczych. Przy istnieniu licznych receptorów dla tego neurotransmitera dalsze badania powinny dotyczyć wyjaśnienia udziału innych rodzajów receptorów dla kwasu glutaminowego, również na poziomie molekularnym.

Piśmiennictwo

- Buckingham J.C. (2006). Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br. J. Pharmacol.*, 147(1): 258–268.
- Buttgereit F, Straub R.H., Wehling M., Burmester G.R. (2004). Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis and Rheumatism*, 50 (11): 3408–3417.
- Challis J.R.G., Matthews S.G., Gibb W., Lye S.J. (2000). Endocrine and paracrine regulation on birth at term and preterm. *Endocr. Rev.*, 21 (5): 514–550.
- Coutinho V, Knopfel T. (2002). Metabotropic glutamate receptors: electrical and chemical signaling properties. *Neuroscientist*, 8 (6): 551–561.
- Dickmeis T. (2009). Glucocorticoids and the circadian clock. *J. Endocrinol.*, 200 (1): 3–22.
- Hardy K., Pollard H. (2006). The organization of the stress response, and its relevance to chiropractors: a commentary. *Chiropractic & Osteopathy*, 14 (25): 1–13.
- Hediger M.A., Welbourne T.C. (1999). Introduction: glutamate transport, metabolism, and physiological responses. *Am. J. Physiol.*, 277 (4): F477–F480.
- Hirota K., Lambert D.J. (1996). Ketamine: its mechanisms of action and unusual clinical uses. *Br. J. Anaesth.*, 77 (4): 441–444.
- Hyde T.M., Lipska B.K., Ali T., Mathew S.V., Law A.J., Metitiri O.E., Straub R.E., Ye T., Colantuoni C., Herman M.M., Bigelow L.B., Weinberger D.R., Kleinman J.E. (2011). Expression of GABA signaling molecules KCC2, NKCC1, and GAD1 in cortical development and schizophrenia. *J. Neurosci.*, 31 (30): 11088–11095.
- Jin P., Pan Y., Pan Z., Xu J., Lin M., Sun Z., Chen M., Xu M. (2018). Alzheimer-like brain metabolic and structural features in cholesterol-fed rabbit detected by magnetic resonance imaging. *Lipids Health Dis.*, 17 (1): 61.
- Julio-Pieper M., Flor P.J., Dinan T.G., Cryan J.F. (2011). Exciting times beyond the brain: metabotropic glutamate receptors in peripheral and non-neural tissues. *Pharmacol. Rev.*, 63 (1): 35–58.
- Koyama Y., Kimura Y., Baba A. (1997). Induction of glutamine synthetase by L-alpha-aminoadipate in developmental stages of cultured astrocytes. *Neurosci. Lett.*, 223 (1): 65–68.
- Kristensen P. (1993). Differential expression of AMPA glutamate receptor mRNAs in the rat adrenal gland. *FEBS Letters*, 332 (1-2): 14–18.
- Llewellyn-Smith I.J., Phend K.D., Minson J.B., Pilowsky P.M., Chalmers J.P. (1992). Glutamate-immunoreactive synapses on retrogradely-labelled sympathetic preganglionic neurons in rat thoracic spinal cord. *Brain Res.*, 581 (1): 67–80.
- Llewellyn-Smith I.J., Minson J.B., Pilowsky P.M., Arnold L.F., Chalmers J.P. (1995). The one hundred percent hypothesis: glutamate or GABA in synapses on sympathetic preganglionic neurons. *Clin. Exp. Hypertens.*, 17 (1-2): 323–333.
- Mahesh V.B., Zamorano P., De Sevilla P., Lewis D., Brann D.W. (1999). Characterization of ionotropic glutamate receptors in rat hypothalamus, pituitary and immortalized gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons (GT1-7 cells). *Neuroendocrinology*, 69: 397–407.
- Pokusa M., Prokopova B., Hlavacova N., Makatsori A., Jezova D. (2014). Effect of blockade of mGluR5 on stress hormone release and its gene expression in the adrenal gland. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 92 (8): 686–692.
- Rasmussen M.K., Ekstrand B., Zamaratskaia G. (2013). Regulation of 3β-hydroxysteroid dehydrogenase/Δ⁵-Δ⁴ isomerase: a review. *Int. J. Mol. Sci.*, 14 (9): 17926–17942.
- Romero O., Figueroa S., Vicente S., González M.P., Oset-Gasque M.J. (2003). Molecular mechanisms of glutamate release by bovine chromaffin cells in primary culture. *Neuroscience*, 116 (3): 817–829.
- Rosol T.J., DeLellis R.A., Harvey P.W., Sutcliffe C. (2001). Endocrine System. In: Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition), Haschek W.M., Rousseaux C.G., Wallig M.A. (eds). Academic Press, Cambridge, USA, pp. 2391–2492.
- Sapolsky R.M., Romero L.M., Munck A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.*, 21: 55–89.

- Szeto A., Gonzales J.A., Spitzer S.B., Levine J.E., Zaias J., Saab P.G., Schneiderman N., McCabe P.M. (2004). Circulating levels of glucocorticoid hormones in WHHL and NZW rabbits: circadian cycle and response to repeated social encounter. *Psychoneuroendocrinology*, 29 (7): 861–866.
- Szpręgiel I., Wrońska D., Pałka S., Kmieciak Ł., Kania B.F. (2020). Udział kwasu glutaminowego w regulacji aktywności nadnerczy królików w wydzielaniu amin katecholowych – badania wstępne. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 47 (1): 99–110.
- Waelsh H. (1951). Glutamic acid and cerebral function. *Advances in Protein Chemistry*, 6: 299–341.
- Watanabe M., Mishina M., Inoue Y. (1994). Distinct gene expression of the N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit in peripheral neurons of the mouse sensory ganglia and adrenal gland. *Neurosci. Lett.*, 165 (1-2): 183–186.
- Wolff K., Winstock A.R. (2006). Ketamine: from medicine to misuse. *CNS Drugs*, 20 (3): 199–218.
- Zarate Jr C.A., Singh J.B., Carson P.J., Brutshe N.E., Ameli R., Luckenbaugh D.A. (2006). A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch. Gen. Psychiatry*, 63 (8): 856–864.

Zatwierdzono do druku: 24 XI 2020

IZABELA SZPRĘGIEL, DANUTA WRÓŃSKA, SYLWIA PAŁKA, BOGDAN F. KANIA

Effect of glutamic acid *in vitro* on the secretion of glucocorticoids by the adrenal glands of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) – preliminary studies

SUMMARY

Glutamic acid is the main neurotransmitter responsible for stimulating the central nervous system. Released by the postganglionic cells of the nervous system, it reaches all organs it can interact with through specific receptors. The presence of glutamic acid receptors has also been demonstrated in the adrenal glands, which indicates that it may modulate their hormonal activity. The aim of the study was to determine the *in vitro* effects of glutamic acid in relation to adrenocortical secretion of cortisol and corticosterone of rabbits. The results of the experiment confirmed the direct influence of glutamic acid on the endocrine activity of the adrenal cortex of rabbits in the secretion of cortisol and, to a large extent, corticosterone. The use of ketamine, a nonspecific ionotropic receptor antagonist for glutamic acid for the incubation of adrenal tissue, indirectly indicates the presence of this type of receptors in the adrenal glands of rabbits and their participation in the modulation of hormonal activity in the secretion of glucocorticoids. Varied reaction and the proportions of the release of cortisol and corticosterone implicate the role of glutamic acid in various pathways of adrenal steroidogenesis. The results prove the validity of the use of ketamine for anaesthesia in the species, the adrenal glands of which synthesise cortisol.

Key words: glutamic acid, cortisol, corticosterone, adrenal glands, rabbit