Wpływ glutaminianu sodu na immunoreaktywność kalretyniny w jądrze grzbiętowym szwu u dorosłych szczurów

JADWIGA JAWORSKA-ADAMU, ALEKSANDRA KRAWCZYK, KAROL RYCERZ

Katedra Anatomii i Histologii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Otrzymano 06.12.2018

Zaakceptowano 11.02.2019

Jaworska-Adamu J., Krawczyk A., Rycerz K.

Influence of monosodium glutamate on calretinin immunoreactivity in the dorsal raphe nucleus in adult rats

Summary

The aim of this study was to investigate changes of calretinin immunoreactivity in neurons and neuropil of the dorsal raphe nucleus (DRN) after subcutaneous administration of monosodium glutamate (MSG) to adult rats. Studies were conducted on 60-day-old male rats. The animals were divided into a control group (C) and two other groups receiving MSG at a dose of 2 g/kg b.w. (I) and 4 g/kg b.w. (II) subcutaneously for 3 consecutive days. Immunohistochemical peroxidase-antiperoxidase reaction was conducted with the use of a specific anti-calretinin (CR) antibody on brain slides containing DRN of 63-day-old rats. The cells and neuropil were morphologically and morphometrically analysed under the light microscope Olympus BX51. Statistically significant differences were studied with ANOVA and nonparametric Kruskal-Wallis test. In 63-day-old rats, in DRN: dorsal (DRNd), ventral (DRNv) and interfascicular (DRNif) parts, in animals receiving MSG (I and II), there was a decrease in CR- immunoreactivity in neurons and neuropil in comparison to control rats. Only in the ventrolateral part (DRNvl) a few intensively stained CR-immunoreactive cells were demonstrated. Light microscope observations were confirmed by morphometric analyses. In the DRNd and DRNv of rats receiving MSG (I and II) a decrease in average CR-immunoreactive neuron density was shown in comparison to the C group. In the DRNvl part, a statistically significant decrease in the analysed parameter was present only in I group of animals. Conversely, in DRNif no statistically significant differences were shown between studied groups of rats. In the DRN of animals receiving MSG (I and II) a decrease in average digital immunostaining intensity for CR occurred in neurons and neuropil. The obtained results demonstrated a decrease in CR immunostaining intensity level in neurons and neuropil and a decrease in density of studied protein immunoreactive cells under the influence of subcutaneous administration of MSG to adult rats. These results suggest that MSG may cause neuronal death as a result of oxidative stress or it can alter a calretinin conformation in cells after binding to calcium ions.

Keywords: calretinin, dorsal raphe nucleus, monosodium glutamate

Glutaminian sodu (MSG) jest solą sodową kwasu glutaminowego, którego formą anionową jest glutaminian (Glu) należący do biogennych aminokwasów (10). Glu jako główny, pobudzający neuroprzebieg uczestniczy w rozwoju i prawidłowej aktywności ośrodkowego układu nerwowego (OUN). W mózgowiu aminokwas ten występuje w ok. 80-90% synaps (24, 25). Glu odgrywa istotną rolę w różnych szlakach metabolicznych m.in. stanowi bezpośredni substrat do produkcji glutaminy w astrocytach, a w neuronach powstaje z niego kwas γ -aminomasłowy (GABA). Neuroprzebieg ten stymuluje receptory glutaminia-

nowe wpływające na neuronalną plastyczność zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych (24). W przestrzeni zewnątrzkomórkowej stężenie Glu wynosi od 0,5 do 2 μ M, co zapewnia prawidłowe przebieganie nerwowe. W dużym stężeniu działa on jako neurotoksyna, prowadząc do nadmiernej stymulacji, uszkodzenia, a nawet śmierci komórek nerwowych i glejowych. Jego neurotoksyczny wpływ wykazano w wielu obszarach mózgowia zwierząt otrzymujących MSG. Stopień uszkodzenia struktur jąder nerwowych zależny był od drogi, dawki i czasu podawania tego związku. Uszkodzenie komórek stwierdzono w jądrze

łukowatym podwzgórza oraz w korze przedczołowej mózgu u neonatalnych osobników (7-9, 12, 14, 17, 29, 30). Po doustnym podawaniu MSG w dawkach 40 i 80 mg/kg m.c. przez 28 dni dorosłym myszom wykazano strukturalne zmiany neuronów, jak i reaktywne astrocyty w korze mózgu, w hipokampie oraz w mózdzku (29). Zwyródnienie komórek nerwowych stwierdzono w hipokampie szczurów, które przez 10 dni otrzymywały drogą doustną i podskórną MSG (7). Inne badania ujawniły, że podawany z pokarmem przez 14 dni MSG w dawce 3 g/kg m.c./dzień wywołał zmiany degeneracyjne neuronów w mózdzku dorosłych szczurów (8).

Jądro grzbietowe szwu (dorsal raphe nucleus – DRN) jest obustronnym obszarem pnia mózgu, lokalizującym się pod brzuszną częścią istoty szarej okołowodociągowej śródmózgowia. U ssaków opisano anatomiczną i funkcjonalną topografię oraz chemoarchitekturę tego obszaru (1, 15, 26). U szczura DRN składa się z kilku części zawierających różne neurony (21, 26). W obszarze tym największą populację stanowią serotonergiczne komórki, które są źródłem unerwienia neuronów obecnych w podwzgórzu, we wzgórzu, w jądrach podstawnych, w jądrach ciała migdałowego oraz w korze mózgu. Ponadto w DRN znajdują się takie substancje, jak: Glu, dopamina, GABA, neuropeptyd Y, substancja P. Do neuronów DRN dochodzą włókna nerwowe z różnych obszarów mózgowia (6, 27). Dzięki różnorodności połączeń i obecności wielu substancji chemicznych obszar ten odgrywa rolę w fizjologicznych i behawioralnych funkcjach. DRN zaangażowane jest m.in.: w sen i w czuwanie, w pobieranie pokarmu, w pobudzenie i niepokój oraz w uczenie się i w zapamiętywanie (1, 11, 18, 27, 36).

Kalretynina (CR) należąca do rodziny „EF-hand” białek wiążących wapń pełni istotną funkcję w utrzymaniu homeostazy jonów wapnia w neuronach. CR jako buforowe i sensoryczne białko uczestniczy w biologicznych procesach (31). W DRN szczurów oraz naczelnych opisano immunoreaktywne dla CR komórki (CR-IR) o różnej wielkości i kształtach (2, 6).

Ze względu na wykazany wcześniej neurotoksyczny wpływ nadmiaru Glu w wielu obszarach mózgowia, celem niniejszych badań było prześledzenie zmian immunoreaktywności CR w DRN po podskórnym podawaniu MSG dorosłym szczurom.

Materiał i metody

Do doświadczeń użyto 15 szt. (240-250 g m.c.) 60-dniowych samców szczurów Wistar. Wszystkie zwierzęta trzymane w klatkach (temperatura 20-22°C, 60% wilgotności powietrza, cykl dobowy 12 h dzień/12 h noc). Szczury miały stały dostęp do standardowej paszy LSM i do wody. Na przeprowadzenie eksperymentów uzyskano zgodę nr 7/2011 II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Lublinie. Zwierzęta losowo podzielono na trzy grupy doświadczalne (po 5 szt.): grupę kontrolną (C) oraz dwie grupy otrzymujące przez 3 kolejne dni podskórnym podawaniem MSG dorosłym szczurom.

sodium salt monohydrate, kod produktu 49621, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) w dwóch dawkach: grupa I (I) – 2 g/kg m.c. i grupa II (II) – 4 g/kg m.c. Grupie C zwierząt podawano przez 3 kolejne dni tą samą drogą 0,9% sól fizjologiczną w objętości odpowiadającej objętości MSG. Po 24 godzinach od ostatniej iniekcji 0,9% NaCl i MSG uśmiercono 63-dniowe szczury. Natychmiast wyjmowano mózgowia, które utrwalano w świeżej, zbuforowanej 10% formalinie (pH = 7,0, temperatura 4°C przez 12 h) i zatopiono w parafinowe bloczki rutynową techniką histologiczną. Materiał pochodzący od każdego szczura krojono na 4 µm czołowe skrawki (P 160 µm-P 480 µm, zgodnie z atlasem König and Klippel) (19), po czym umieszczano je na szkiełkach podstawowych SuperFrost Plus.

W celu wykrycia CR w DRN zastosowano immunohistochemiczną pośrednią metodę peroksydaza-antyperoksydaza (PAP). Skrawki mózgowia zawierające DRN wszystkich zwierząt (C, I i II) barwiono równocześnie i w seriach. Zgodnie z rekomendacją producenta (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), wszystkie przeciwciała i reagenty rozcieńczane były w 0,5 M buforze trisowym (Tris buffered Saline kod produktu T5912) o pH = 7,6, w którym także płukano skrawki po ich zastosowaniu. Dla usunięcia aktywności endogennej peroksydazy zastosowano 3% H₂O₂ przez 30 min. w temperaturze pokojowej. Następnie skrawki inkubowano z surowicą kozią (kod produktu G9023, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) przez 20 min., w temperaturze pokojowej w celu zablokowania niespecyficznej reakcji. Kolejno zastosowano pierwszorzędowe monoklonalne królicze przeciwciało przeciwko CR (C7479, rozcieńczenie 1 : 2000) przez 24 h w 4°C. Jako drugorzędowego przeciwciała użyto koziego monoklonalnego przeciwciała przeciwko króliczym IgG (A9169, 1 : 400) przez 1 h w temperaturze pokojowej. Chromogenem zastosowanym w barwieniu był czterochlorek 3,3'-diuaminobenzydyny (DAB) przez 30 min. w temperaturze pokojowej. Następnie skrawki płukano w destylowanej H₂O, dobarwiano hematoksyliną Mayera i zamykano w DPX (Fluka, Buchs, Switzerland). Negatywną kontrolę specyficzności reakcji przeprowadzono z ominięciem pierwszorzędowego przeciwciała i zastąpieniem go surowicą kozią. Pozytywną kontrolę wykonano zgodnie z zaleceniami producenta. Immunoreaktywność dla CR w poszczególnych częściach DRN tj.: w grzbietowej (DRNd), w brzusznej (DRNv), w boczno-brzusznej (DRNvl) oraz w międzypęczkowej (DRNif) analizowano i fotografowano w mikroskopie świetlnym Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) z kamerą cyfrową (Olympus Color View III) i z oprogramowaniem Cell[^]D.

W preparatach prześledzono dystrybucję, kształty oraz wielkość CR-IR neuronów w poszczególnych częściach DRN. Ponadto określono stopień intensywności immunozabarwienia neuronów i neuropilu jako: brak, nieznaczny, umiarkowany, intensywny.

Morfometrycznie oceniano gęstość pozytywnych dla CR komórek w losowo wybranych 20 zdjęciach (35 906,44 µm²) z każdej części DRN. Wyniki porównano i przedstawiono w postaci średniej gęstości CR-IR komórek w badanym polu powierzchni. W losowo wybranych neuronach (po 50 na każdą badaną część DRN) wykonano pomiar intensywności zabarwienia cytoplazmy (w kwadracie o powierzchni

1 μm^2). Wyniki zostały odwrócone tak, aby wyższe wartości reprezentowały ciemniejszy kolor oraz wystandaryzowane, w celu uniknięcia różnic w ekspozycji światła (23, 28). Uzyskane dane przedstawiono w postaci średniej cyfrowej intensywności immunozabarwienia w $\text{ou}/\mu\text{m}^2$ (optical units/ μm^2) z odchyleniem standardowym. Pomiar intensywności zabarwienia neuropilu wykonano w 20 losowo wybranych polach o powierzchni 400 μm^2 w każdej części DRN. Wyniki odwrócono, wystandaryzowano oraz przedstawiono w postaci średniej cyfrowej intensywności immunozabarwienia w $\text{ou}/400 \mu\text{m}^2$ (optical units/400 μm^2) wraz z odchyleniem standardowym (23). Za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA uzyskane wyniki w postaci średnich z odchyleniem standardowym porównano statystycznie. Rozkład normalny danych oceniano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Dane nie spełniające warunku normalności rozkładu porównywane były za pomocą nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa. Poziom istotności wszystkich testów wynosił $\alpha = 0,05$. Analizy statystyczne przeprowadzono za pomocą programu R 3.3.1 (Free Software Foundation's GNU General Public License, <http://www.r-project.org/>).

Wyniki i omówienie

Nasze badania ujawniły obecność immunoreaktywnych dla CR neuronów w DRN we wszystkich grupach 63-dniowych szczurów. Komórki te wyrażały różni-

cowany stopień intensywności immunozabarwienia dla badanego białka oraz różną wielkość i kształty.

W DRNd szczurów pochodzących z grupy kontrolnej CR-IR neurony wykazywały brak, nieznaczny, umiarkowany oraz intensywny stopień immunozabarwienia dla badanego białka. Komórki cechowały się różnymi kształtami i wielkością. Małe neurony były okrągłe lub owalne, zaś średniej wielkości miały wrzecionowate kształty. Ponadto obserwowano pojedyncze, duże, wielokształtne komórki (ryc. 1-1A). W DRNvl zlokalizowane były małe i okrągłe, średniej wielkości i wrzecionowate oraz duże i różnokształtne komórki o nieznacznym i umiarkowanym stopniu immunozabarwienia dla CR. Niektóre małe i duże neurony nie wykazywały produktu reakcji (ryc. 1-1B). W DRNv występowały różnokształtne komórki nerwowe z nieznaczną, umiarkowaną i intensywną immunoreaktywnością dla badanego białka. Ponadto obecne były komórki bez brązowego produktu reakcji immunohistochemicznej (ryc. 1-1C). W DRNif nieznaczne i umiarkowane immunozabarwienie dla CR obserwowano we wrzecionowatych i okrągłych, o różnej wielkości neuronach. Ponadto wykazano komórki bez produktu reakcji dla CR (ryc. 1-1D). We wszystkich badanych częściach DRN neuropil charakteryzował się umiarkowaną intensywnością immunozabarwienia (ryc. 1-1A, 1B, 1C, 1D).

W DRN zwierząt otrzymujących MSG (I i II) zaobserwowano znaczny spadek immunoreaktywności dla CR, zarówno w neuronach, jak i neuropilu w porównaniu do szczurów kontrolnych. Większość komórek nie wykazywała produktu reakcji dla badanego białka (ryc. 1-2A, 2B, 2C, 2D, 3A, 3B, 3C, 3D). Jedynie w DRNvl wykazano nieliczne, owalne i wrzecionowate komórki nerwowe intensywnie immunozabarwione dla CR (ryc. 1-3B).

Analizy morfometryczne potwierdziły obserwacje w mikroskopie świetlnym. W DRNd i DRNv szczurów otrzymujących MSG (I i II) wykazano spadek średniej gęstości CR-IR neuronów w porównaniu z grupą kontrolną zwierząt. W części DRNvl istotny statystycznie spadek analizowanego parametru wystąpił tylko w grupie I zwierząt. Natomiast w DRNif nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy badanymi grupami (ryc. 2). Ponadto w DRN wszystkich szczurów,

Ryc. 1. Immunoreaktywność dla CR w neuronach i neuropilu DRN (A – DRNd, B – DRNvl, C – DRNv, D – DRNif) 63-dniowych szczurów z grup: C (1), I (2) i II (3) (400 $\times$)

którym podawano MSG (I i II), stwierdzono spadek średniej intensywności immunozabarwienia zarówno CR-IR neuronów, jak i neuropilu (ryc. 3 i ryc. 4).

Zmniejszenie immunoreaktywności CR w neuronach i neuropilu szczurów otrzymujących MSG może mieć związek ze wzrostem stężenia Glu we krwi oraz w przestrzeni zewnątrzkomórkowej w DRN. W badaniach *in vitro* ludzkich komórek śródbłonna pochodzących z włóścinek mózgowia stwierdzono, że nadmiar tego aminokwasu aktywuje receptory N-metylo-D-asparaginianowe (NMDA) i prowadzi do utraty integralności tych komórek. Powyższe zmiany mogą powodować zwiększenie przepuszczalności bariery krew–mózg i tym samym wzrost stężenia Glu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (32).

Nadmiar Glu jest cytotoksyczny, co pozostaje w ścisłym związku z długotrwałym, silnym pobudzeniem receptorów NMDA, przedłużającą się depolaryzacją błon komórkowych, dokomórkowym napływem jonów Ca^{2+} oraz aktywacją zależnych od wapnia reakcji enzymatycznych. W neuronach prowadzi to do aktywacji fosfolipazy A, syntetazy tlenku azotu oraz produkcji kwasu arachidonowego, tlenku azotu, jonów nadtlennokowych i silnie toksycznego nadtlenu azotu. Tlenek azotu uszkadza jądrowy DNA, hamuje mitochondrialne procesy tlenowe. Ponadto nadmierna produkcja reaktywnych form tlenu wywołuje stres oksydacyjny i w konsekwencji uszkodzenie oraz rozpad neuronów. Stres oksydacyjny może zatem odgrywać ważną rolę w neurodegeneracji wywołanej podawaniem MSG (16, 22, 34). Tezę tę potwierdzają liczne badania, w których dobrze udokumentowano ekscytotoksyczny wpływ MSG na struktury układu nerwowego u dorosłych zwierząt (5, 34). W korze mózgu i mózdzku oraz w hipokampie u dorosłych myszy po doustnym podawaniu MSG (w dawce 40 i 80 mg/kg m.c.) przez 28 dni wykazano zmiany w postaci uszkodzeń neuronów. Ponadto w badaniach przedstawiono spadek poziomu dysmutazy nadtlennokowej i katalazy oraz wzrost tlenku azotu wraz ze wzrostem podawanej dawki (29). Natomiast u 7-tygodniowych myszy otrzymujących przez 21 dni doustnie MSG (500 mg/kg m.c.) wzrastały poziomy dialdehydu malonowego i glutationu w mózgowiu. Autorzy sugerują wystąpienie stresu oksydacyjnego pod wpływem MSG (35).

W normalnych i patologicznych warunkach komórki zawierające CR pełnią rolę protekcyjną przeciwko nadmiarowi wapnia. Ponadto wykazano, że są one odporne na uszkodzenia. Jednakże w przebiegu dużej depresji, w niedokrwieniu, w niedotlenieniu mózgu, w epilepsji, w udarze obserwowano spadek ekspresji tego białka w korze mózgu (3). Nadmiar oraz ciągła obecność Glu w przestrzeni pozakomórkowej mogą uszkadzać neurony zawierające CR. Tym tłumaczyć można obserwowany w naszych badaniach spadek gęstości immunoreaktywnych dla CR komórek w DRN szczurów po podawaniu MSG. Natomiast zmniejszenie stopnia intensywności immunozabarwienia neuropilu

Ryc. 2. Średnia gęstość neuronów w DRNd, DRNvl, DRNv, DRNif zwierząt z grup: C, I i II z odchyleniem standardowym
Objaśnienia: *różnice istotne statystycznie ANOVA ($p < 0,05$); **różnice istotne statystycznie Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Ryc. 3. Średnia intensywność immunozabarwienia dla CR w neuronach DRNd, DRNvl, DRNv, DRNif zwierząt z grup: C, I i II z odchyleniem standardowym
Objaśnienia: jak na ryc. 2.

Ryc. 4. Średnia intensywność immunozabarwienia dla CR w neuropilu DRNd, DRNvl, DRNv, DRNif zwierząt z grup: C, I i II z odchyleniem standardowym
Objaśnienia: jak na ryc. 2.

można wiązać ze spadkiem stopnia zabarwienia CR we włóknach nerwowych i ich zakończeniach synaptycznych. CR zlokalizowane jest głównie w GABA-ergicznych hamujących interneuronach (4, 31). Dobrze poznano funkcję interneuronów zawierających CR w utrzymaniu neuronalnej homeostazy, a w szczególności dystrybucję tych komórek i połączenia w korze

mózgu u gryzoni, naczelných, w tym ludzi. Neurony zawierające CR łączą się między sobą, jak również z komórkami posiadającymi inne białka wiążące wapń, jak parwalbuminę i kalbindynę. W ten sposób odgrywają rolę w kontroli neuronalnych obiegów (33). Immunopozytywne dla CR aksony lokalnych GABA-ergicznych neuronów tworzą liczne, symetryczne synapsy wyłącznie na dendrytach innych GABA-ergicznych neuronów. Badania hipokampa z użyciem podwójnego immunobarwienia neuronów dla CR i kalbindyny D28k (CB) wykazały, że immunoreaktywne dla CR komórki bogato unerwiają interneurony z CB. Ponadto opisano włókna nerwowe zawierające CR dochodzące do wypustek GABA-ergicznych komórek koszykowych wykazujących wazoaktywny peptyd jelitowy i somatostatynę. W ten sposób immunoreaktywne dla CR neurony mogą odgrywać istotną rolę w kontroli synchronizacji aktywności innych interneuronów GABA-ergicznych, wpływając tym samym na aktywność hipokampa (13). Podobnie jak w innych obszarach można przypuszczać, że obecne w DRN neurony zawierające CR należą do populacji GABA-ergicznych interneuronów i ich utrata wpływać może na aktywność hamujących, neuronalnych sieci. Jednakże spadek immunoreaktywności CR obserwowany we własnych badaniach nie musi być związany ze śmiercią neuronów. Nadmierny napływ Ca^{2+} do komórek i przyłączanie tych jonów do CR może powodować zmiany konformacyjne białka, prowadząc do zmian jego immunoreaktywności (20, 37).

Badania własne wykazały spadek stopnia intensywności immunozabarwienia kalretyniny w neuronach i w neuropilu oraz spadek gęstości tych komórek pod wpływem podskórnego podawania MSG dorosłym szczurom. Wyniki te sugerują, że MSG może powodować śmierć neuronów na skutek stresu oksydacyjnego lub zmieniać w komórkach konformację kalretyniny po przyłączeniu jonów wapnia. W zakresie tym muszą być prowadzone dalsze badania morfologiczne, biochemiczne i fizjologiczne.

Piśmiennictwo

- Abrams J. K., Johnson P. L., Hollis J. H., Lowry C. A.: Anatomical and functional topography of the dorsal raphe nucleus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004, 1018, 46-57.
- Arai R., Winsky L., Arai M., Jacobowitz D. M.: Immunocytochemical localization of calretinin in the rat hindbrain. *J. Comp. Neurol.* 1991, 310, 21-44.
- Barinka F., Druga R.: Calretinin expression in the mammalian neocortex: a review. *Physiol. Res.* 2010, 59, 665-677.
- Billing-Marczak K., Kuźnicki J.: Calretinin-sensor or buffer-function still unclear. *Pol. J. Pharmacol.* 1999, 51, 173-178.
- Cekić S., Filipović M., Jović Z., Milkica N., Pešić G., Čirić M., Petrović A., Branković S., Živanov J., Radenković M.: Histopathological changes at the hypothalamic nucleus arcuatus and thyroid level in rats treated with monosodium glutamate. *Acta Fac. Med. Naiss.* 2004, 21, 89-94.
- Charara A., Parent A.: Chemoarchitecture of the primate dorsal raphe nucleus. *J. Chem. Neuroanat.* 1998, 15, 111-127.
- Dief A. E., Kamha E. S., Baraka A. M., Elshorbagy A. K.: Monosodium glutamate neurotoxicity increases beta amyloid in the rat hippocampus: a potential role for cyclic AMP protein kinase. *Neurotoxicology* 2014, 42, 76-82.
- Eweka A., Om'Iniabo F.: Histological studies of the effect of monosodium glutamate on the cerebellum of adult Wistar rats. *Int. J. Neurol.* 2006, 8, 1-5.
- Eweka A., Om'Iniabo F.: Histological studies of the effects of monosodium glutamate on the lateral geniculate body of adult Wistar rats. *Int. J. Nutr. Wellnes* 2007, 5, 1-6.
- Ganesan K., Sukalingam K., Balamurali K., Aladeen S. R. Bt. S., Ponnusamy K., Ariffin I. A., Gani S. B.: A studies on monosodium L-glutamate toxicity in animal models – a review. *I. J. P. C. B. S.* 2013, 3, 1257-1268.
- Gocho Y., Sakai A., Yanagawa Y., Suzuki H., Saitow F.: Electrophysiological and pharmacological properties of GABAergic cells in the dorsal raphe nucleus. *J. Physiol. Sci.* 2013, 63, 147-154.
- González-Burgos L., Pérez-Vega M. I., Beas-Zarate C.: Neonatal exposure to monosodium glutamate induces cell death and dendritic hypotrophy in rat prefrontocortical pyramidal neurons. *Neurosci. Lett.* 2001, 297, 69-72.
- Gulyás A. I., Hájos N., Freund T. F.: Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 1996, 16, 3397-3411.
- Hashem H. E., El-Din Safwat M. D., Algaidi S.: The effect of monosodium glutamate on the cerebellar cortex of male albino rats and the protective role of vitamin C (histological and immunohistochemical study). *J. Mol. Histol.* 2012, 43, 179-186.
- Hornung J. P.: The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J. Chem. Neuroanat.* 2003, 26, 331-343.
- Hu L., Fernstrom J. D., Goldsmith P. C.: Exogenous glutamate enhances glutamate receptor subunit expression during selective neuronal injury in the ventral arcuate nucleus of postnatal mice. *Neuroendocrinology* 1998, 68, 77-88.
- Husarova V., Ostatnikova D.: Monosodium glutamate toxic effects and their implications for human intake: a review. *J. Med. Res.* 2013, 1-12.
- Jacobs B. L., Azmitia E. C.: Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.* 1992, 72, 165-229.
- König J. F. R., Klippel F. A.: The rat brain: A stereotactic of the forebrain and lower part of the brainstem. William and Wilkins: Baltimore 1963.
- Kuźnicki J., Filippek A.: Heterogeneity and multifunctionality of calcium binding proteins (CaBP). *Kosmos* 1997, 4, 603-608.
- Lowry C. A., Evans A. K., Gasser P. J., Hale M., Staub D. R., Shekhar A.: Topographic organization and chemoarchitecture of the dorsal raphe nucleus and the median raphe nucleus. [w:] Monti J. M., Pandi-Perumal S. R., Jacobs B. L., Nutt D. J. (red.): Serotonin and sleep: molecular, functional and clinical aspects. Wyd. Birkhaeuser, Basel 2008, s. 25-67.
- Mark L. P., Prost R. W., Ulmer J. L., Smith M. M., Daniels D. L., Strottmann J. M., Brown W. D., Hachein-Bey L.: Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging. *A. J. N. R. Am. J. Neuroradiol.* 2001, 22, 1813-1824.
- Matos L. L., Stabenow E., Tavares M. R., Rerraz A. R., Capelozzi V. L., Pinhal M. A.: Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared to semiquantitative analysis. *Clinics (Sao Paulo)* 2006, 61, 417-424.
- Mattson M. P.: Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008, 1144, 97-112.
- Meldrum B. S.: Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 2000, 130 (4S Suppl.), 1007S-1015S.
- Michelsen K. A., Schmitz C., Steinbusch H. W.: The dorsal raphe nucleus – from silver stainings to a role in depression. *Brain Res. Rev.* 2007, 55, 329-342.
- Monti J. M.: The structure of the dorsal raphe nucleus and its relevance to the regulation of sleep and wakefulness. *Sleep Med. Rev.* 2010, 14, 307-317.
- Nguyen D. H., Zhou T., Shu J., Mao J. H.: Quantifying chromogen intensity in immunohistochemistry via reciprocal intensity. *Cancer In Cytos* 2013, 2, 1-4.
- Onaolapo O. J., Onaolapo A. Y., Akanmu M. A., Gbola O.: Evidence of alterations in brain structure and antioxidant status following 'low dose' monosodium glutamate ingestion. *Pathophysiology* 2016, 23, 147-156.
- Peláez B., Blázquez J. L., Pastor F. E., Sánchez A., Amat P.: Lectin histochemistry and ultrastructure of microglial response to monosodium glutamate-mediated neurotoxicity in the arcuate nucleus. *Histol. Histopathol.* 1999, 14, 165-174.
- Schwaller B.: Calretinin: from a „simple” Ca^{2+} buffer to a multifunctional protein implicated in many biological processes. *Front. Neuroanat.* 2014, 8, 1-7.
- Sharp C. D., Hines L., Houghton J., Warren A., Jackson T. H. 4th, Jawahar A., Nanda A., Elrod J. W., Long A., Chi A., Minagar A., Alexander J. S.: Glutamate causes a loss in human cerebral endothelial barrier integrity through activation of NMDA receptor. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003, 285, H2592-H2598.
- Siucińska E.: Inhibitory neurotransmitter in cerebral cortex plasticity. *Kosmos* 2005, 54, 195-212.
- Takasaki Y.: Studies on brain lesion by administration of monosodium L-glutamate to mice. Brain lesions in infant mice caused by administration of monosodium L-glutamate. *Toxicology* 1978, 9, 293-305.
- Umukoro S., Oluwale G. O., Olamijowon H. E., Omogbiya A. I., Eduviere A. T.: Effect of monosodium glutamate on behavioral phenotypes, biomarkers of oxidative stress in brain tissues and liver enzymes in mice. *W.J.N.S.* 2015, 5, 339-349.
- Wang Q. P., Ochiai H., Nakai Y.: GABAergic innervation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat studied by electron microscopy double immunostaining. *Brain Res. Bull.* 1992, 29, 943-948.
- Winsky L., Kuźnicki J.: Antibody recognition of calcium binding proteins depends of their calcium binding status. *J. Neurochem.* 1996, 66, 764-771.

Adres autora: dr Aleksandra Krawczyk, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: aleksandra.krawczyk@up.lublin.pl