Immunohistochemiczna ocena wpływu rebaudiozydu A na neurony zawierające acetylocholinoesterazę w hipokampie i w prążkowiu szczurów

KAROL RYCERZ, JADWIGA JAWORSKA-ADAMU

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

Otrzymano 17.04.2019

Zaakceptowano 13.06.2019

Rycerz K., Jaworska-Adamu J.

Immunohistochemical evaluation of the influence of rebaudioside A on neurons containing acetylcholinesterase (AChE) in the rat's hippocampus and striatum

Summary

The aim of the study was to investigate acetylcholinesterase-immunoreactive neurons in the CA1 area of the hippocampus and in the striatum (CS) of rats receiving rebaudioside A (RebA) for 15 days. RebA is a steviol glycoside used in the production of sweeteners, and it has been shown that glycosides affect memory and learning processes. RebA was administered to adult rats for 15 days at 1 mg of glycoside/ml of water (group I) and 2 mg of glycoside/ml of water (group II). An indirect immunohistochemical peroxidase-antiperoxidase reaction was performed on frontal slides containing the hippocampus and CS with the use of a monoclonal antibody against AChE. Neurons immunoreactive for the protein were assessed morphologically and morphometrically in hippocampal area CA1 and in the CS. Microscopical observations did not reveal significant morphological changes in immunopositive neurons, which suggests that the glycoside had no neurotoxic effect of these cells. Morphometric analyses did not show changes in the density of AChE-immunoreactive neurons. On the other hand, a decrease in reaction intensity was demonstrated in hippocampal area CA1 in group I and in the CS in both groups of animals receiving RebA. The results of our preliminary studies suggest that RebA affects cholinergic neurons.

Keywords: rebaudioside A, stevia, acetylcholinesterase, hippocampus, striatum

Rebaudiozyd A (RebA) wyizolowano z rośliny *Stevia rebaudiana* Bertonii. Substancję tę wykorzystuje się do produkcji słodzików (17, 24, 25). Metabolizm RebA jest podobny u ludzi i szczurów (26). Wykazano, że glikozydy stewiolowe posiadają właściwości terapeutyczne, m.in. przeciwnadciśnieniowe, przeciwuczkrycowe, antyoksydacyjne, przeciwzapalne i przeciwnowotworowe (6). Nieliczne badania fizjologiczne i biochemiczne wskazują na pozytywny wpływ doustnego podawania ekstraktów glikozydów stewiolowych na pamięć u szczurów oraz na zmniejszenie poziomu acetylocholinoesterazy (AChE) w homogenatach mózgow tych zwierząt. Ponadto karmienie szczurów stewiozydem o podobnym metabolizmie jak RebA odwraca zaburzenia pamięci i uczenia się, powodowane skopolaminą wywołującą objawy jak w chorobie Alzheimera (13-15, 19, 28).

Acetylocholina (ACh) jest głównym neuroprzeźkaźnikiem cholinergicznym w mózgu, który wzmacnia różne typy kodowania engramów pamięciowych

i moduluje długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP) (11). Stężenie ACh w synapsach regulowane jest przez AChE, która szybko hydrolizuje i inaktywuje ten neuroprzeźkaźnik (3, 29). W neuronach AChE obecna jest w perikarionie, błonie komórkowej, aksonach, dendrytach oraz w synapsach (2, 31).

Główną funkcją hipokampa i prążkowia jest pamięć i uczenie się. Hipokamp właściwy składa się z pól CA1-CA4 podzielonych na warstwy: początkową (SO), piramidalną (SP), promienistą (SR) oraz jamiasto-drobinową (SLM). Obszar ten odpowiedzialny jest przede wszystkim za pamięć deklaratywną (9, 10). Prążkowie (*corpus striatum* – CS) należy do jąder podstawnych i składa się z jądra ogoniastego, skorupy oraz gałki bladej. U szczurów jądro ogoniaste i skorupa nie są od siebie oddzielone. Prążkowie odpowiada za pamięć proceduralną (21).

Dotychczas nie poznano wpływu RebA na struktury obecne w mózgowiu ssaków. Stąd celem niniejszych badań była morfologiczna oraz morfometryczna oce-

na immunoreaktywnych dla AChE neuronów pola CA1 hipokampa oraz CS u szczurów otrzymujących rebaudiozyd A.

Materiał i metody

Zwierzęta i wstępna procedura badawcza. Do badań użyto 15 samców szczurów Wistar w wieku 55 dni, o masie ciała ok. 250-290 g. Samce utrzymywane były pojedynczo w oddzielnych klatkach (20°C, 30%, 12 h dzień/12 h noc). Zwierzęta karmiono standardową paszą LSM (Agropol, Lublin, Polska) *ad libitum*, ze stałym dostępem do świeżej wody. Czynniki stresogenne zostały zredukowane do minimum. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę nr 22/2013 II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Lublinie.

Po adaptacji (7 dni) zwierzęta zostały podzielone na 2 grupy, które otrzymywały po 25 ml RebA (Sigma Aldrich) w oddzielnych poidłach przez 15 dni, w rozcieńczeniach 1 mg RebA/ml wody (grupa I, 5 szt., 65 mg/kg m.c.) i 2 mg RebA/ml wody (grupa II, 5 szt. 119 mg/kg m.c.). Pozostałe samce otrzymywały dodatkowe poidła z czystą wodą i stanowiły grupę kontrolną (grupa K, 5 szt.). Następnego dnia po ostatnim podaniu RebA zwierzęta zostały poddane eutanazji przez domięśniowe przedawkowanie 10% ketaminy po uprzednim znieczuleniu ksylazyną. Do badań pobrano mózgowia, które utrwalono w 10% formalinie (pH = 7,0, 4°C, 12 h). Materiał zatopiono w parafinowe bloczki rutynową techniką histologiczną. Mózgowia krojono w mikrotomie na skrawki grubości 8 µm zawierające hipokamp – A4230 µm-A3750 µm, oraz prążkowie – A6860 µm-A5910 µm zgodnie z atlasem stereotaktycznym (16).

Reakcje immunohistochemiczne. W celu wykrycia AChE zastosowano pośrednią reakcję immunohistochemiczną peroksydaza-antyperoksydaza (PAP). Antygeny odmaskowano w 0,01 M roztworze buforu cytrynianowego (pH = 6,0) w kuchence mikrofalowej (3 × 5 min.). W celu zahamowania aktywności endogennej peroksydazy skrawki inkubowano w 3% H₂O₂. Następnie zastosowano surowicę kozią (temperatura pokojowa, 20 min.) do usunięcia niespecyficznego podbarwienia tła. Kolejnym etapem była inkubacja skrawków z mysim monoklonalnym przeciwciałem przeciwko acetylocholinoesterazie (Sigma Aldrich, 24 h, 4°C) oraz odpowiednim gatunkowo przeciwciałem drugorzędowym IgG sprzężonym z peroksydazą (Sigma Aldrich, 1 h, temp. pokojowa) rozcieńczonymi zgodnie z zaleceniami producenta. Diaminobenzydyny (DAB, Fluka) użyto jako chromogenu. W końcowym etapie skrawki zostały podbarwione hematoksyliną Mayera (Sigma Aldrich) w celu uwidocznienia jąder komórkowych. Następnie odwodniono je w alkoholu etylowym, prześwietlono w ksylenie i zamknięto w DPX (Fluka). Dla przeprowadzonych reakcji immunohistochemicznych wykonano kontrolę specyficzności, polegającą na ominięciu pierwszorzędowego przeciwciała i zastąpieniu go normalną surowicą. Mikrofotografie niezbędne do analiz jakościowych i ilościowych wykonano przy użyciu mikroskopu świetlnego BX51 (Olympus, Tokio, Japonia) sprzężonego z kamerą cyfrową Olympus Color View IIIu.

Analiza mikroskopowa immunoreaktywności AChE. Neurony immunoreaktywne dla AChE (AChE-IR) oceniano

pod względem morfologii oraz rozmieszczenia w warstwie piramidalnej pola CA1 oraz w CS. Półilościowo oceniono liczbę komórek nerwowych w skali: (–/+) nieliczne, (+) średnio liczne, (++) liczne, (+++) bardzo liczne.

Analiza morfometryczna. Analizę przeprowadzono na podstawie uzyskanych obrazów przy użyciu programu komputerowego Cell[^]D. Wykonano ocenę gęstości AChE-IR neuronów jako stosunek sumy komórek immunopozytywnych do wszystkich neuronów w polu CA1 hipokampa. AChE-IR neurony w CS były pojedyncze i nierównomiernie rozrzucone, stąd nie stanowiły odpowiedniego materiału do oceny ilościowej gęstości komórek. Gęstość neuronów immunopozytywnych dla badanego białka do wszystkich komórek nerwowych liczono w 50 polach siatki o powierzchni $8 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ w całości pokrywających warstwę SP pola CA1 hipokampa. Średnia cyfrowa intensywność immunozabarwienia AChE w neuronach pola CA1 i CS oceniona była na podstawie pomiarów intensywności zabarwienia cytoplazmy (w kwadracie o powierzchni $1 \mu\text{m}^2$ w 100 komórkach, w każdej grupie). Najwyższa możliwa wartość zabarwienia wg modelu RGB wynosi 255 i reprezentuje kolor biały, a najniższa – 0 kolor czarny (20), stąd wyniki zostały odwrócone tak, aby wyższe wartości reprezentowały ciemniejszy kolor. W celu standaryzacji różnic w ekspozycji światła wykonano także pomiary intensywności wolnej przestrzeni (18). Wyniki przedstawiono półilościowo w postaci procentowego odsetka cyfrowej intensywności immunozabarwienia w stosunku do maksymalnego zabarwienia wraz z odchyleniem standardowym.

Analiza statystyczna. Wyniki w postaci średnich danych liczbowych z odchyleniem standardowym opracowano statystycznie za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) oraz testu *post hoc* Tukey HSD. Rozkład normalny danych oceniano za pomocą testu Shapiro-Wilka, a homogenności wariancji testem Levene'a. Współczynnik 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).

Wyniki i omówienie

AChE-IR neurony obecne były w SP pola CA1 hipokampa oraz w CS we wszystkich badanych grupach zwierząt. Produkt reakcji charakteryzował się rozproszonym, cytoplazmatycznym immunozabarwieniem ciał neuronów, a w niektórych komórkach lokalizował się punktowo przy błonie komórkowej oraz w wypustkach nerwowych.

W SP pola CA1 hipokampa obecne były średnio liczne (+), immunoreaktywne, brązowe, piramidalne neurony we wszystkich badanych grupach szczurów (K, I, II). W grupach zwierząt I i II uzyskano podobne wyniki badań morfologicznych, jak w grupie K. Jądra neuronów były okrągłe lub owalne, położone centralnie w ciałach komórek. W początkowych odcinkach dendrytów warstwy SR hipokampa widoczne było punktowe immunozabarwienie przy neurolemie (ryc. 1).

We wszystkich badanych grupach szczurów w CS występowały różnej wielkości AChE-IR neurony.

Ryc. 2. AChE-IR neurony w CS szczurów

Objaśnienia: K – grupa kontrolna; I – grupa I; II – grupa II; strzałka pełna – ciała komórek; strzałka przerywana – pęczki włókien nerwowych

Ryc. 1. AChE-IR neurony w SP pola CA1 hipokampa szczurów

Objaśnienia: K – grupa kontrolna; I – grupa I; II – grupa II; strzałka pełna – ciała komórek; strzałka przerywana – początkowe odcinki wypustek nerwowych

Komórki te wykazywały wrzecionowate, a także wieloboczne kształty. W centralnej części perikarionów zlokalizowane były owalne, a rzadziej okrągłe jądra. Obserwacje mikroskopowe ujawniły także immunoreaktywność dla AChE w wiązkach włókien nerwowych obecnych pomiędzy neuronami. Wyniki z badań morfologicznych wykazały jedynie słabszą immunoreaktywność AChE w strukturach CS w grupie II w porównaniu z grupami K i I zwierząt (ryc. 2).

Analizy morfometryczne stosunku gęstości AChE-IR neuronów do wszystkich komórek nerwowych w polu CA1 hipokampa nie wykazały istotnych statystycznie różnic u zwierząt otrzymujących RebA w porównaniu z grupą kontrolną (ryc. 3).

W SP pola CA1 hipokampa nastąpił spadek średniej cyfrowej intensywności immunozabarwienia AChE w neuronach u szczurów otrzymujących RebA przez 15 dni w rozcieńczeniu 1 mg/ml wody w porównaniu do zwierząt kontrolnych ($K > I$ ANOVA, $p < 0,05$) (ryc. 4 CA1).

W CS obecne były słabiej immunozabarwione dla AChE neurony w grupach zwierząt otrzymujących RebA w porównaniu do szczurów kontrolnych, w szczególności u zwierząt w grupie II ($K > I$, $K > II$ ANOVA, $p < 0,05$) (ryc. 4 CS).

Niektóre badania innych autorów wskazały na możliwe negatywne, toksyczne oraz mutagenne skutki spożywania słodzików stewiolowych, w tym RebA (23, 30). W prezentowanych badaniach własnych nie stwierdzono znaczących zmian morfologicznych w neuronach immunoreaktywnych dla AChE w warstwie SP pola CA1 hipokampa oraz w CS po doustnym podawaniu RebA przez 15 dni w porównaniu do grupy kontrolnej zwierząt. Badane komórki w warstwie SP pola CA1 były z reguły piramidalne lub owalne kształtu. W prążkowie obserwowano różnokształtne komórki nerwowe o prawidłowej budowie we wszystkich badanych grupach szczurów. Brak wpływu RebA na strukturę komórek w różnych narządach potwierdzają dane uzyskane z wcześniejszych analiz dotyczących działania różnych słodzików stewiolowych u ludzi i zwierząt (4, 7, 12, 27).

Wyniki własnych obserwacji mikroskopowych ujawniły słabszą intensywność reakcji w AChE-IR neuronach w CS u szczurów z grupy II. Dokładniejszy

Ryc. 3. Stosunek gęstości AChE-IR neuronów do wszystkich komórek nerwowych w polu CA1 hipokampa. Średnie wartości wraz z odchyleniami standardowymi

Ryc. 4. Średnia cyfrowa intensywność immunozabarwienia dla AChE w neuronach pola CA1 hipokampa i CS. Średnie wartości w skali półilościowej wraz z odchyleniami standardowymi
Objaśnienie: * różnice istotne statystycznie ANOVA $p < 0,05$

wynik zmian immunozabarwienia uzyskano po przeprowadzeniu komputerowej analizy densytometrycznej badanych neuronów. Morfometrycznie potwierdzono wyniki obserwacji morfologicznych. Badanie to wykazało, że słabsze cyfrowe immunozabarwienie AChE występuje w komórkach pola CA1 hipokampa pochodzącego z grupy I szczurów oraz w obu grupach doświadczalnych w CS.

Mimo że absorbancja światła przechodzącego przez preparat zabarwiony chromogenem – diaminobenzydyną nie odpowiada prawu Lamberta-Beera, wyniki wskazują na wyraźną, powtarzającą się tendencję spadkową zabarwienia tego badanego enzymu w neuronach hipokampa i prążkowie u zwierząt spożywających w obu dawkach RebA. Ponadto wykazano, że zawartość różnych antygenów może występować w dużej korelacji z intensywnością immunozabarwienia DAB (20, 32). Jednolita tendencja uzyskanych wyników może pośrednio świadczyć o zmianie koncentracji AChE i w konsekwencji aktywności tego enzymu w komórkach nerwowych badanych obszarów. Trudno natomiast wytłumaczyć spadek intensywności immunozabarwienia jedynie po zastosowaniu niższej dawki RebA w polu CA1 hipokampa. Działanie glikozydów stewiolowych może być zależne od różnych czynników, np. obecności zewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} (1). Spadek intensywności immunozabarwienia AChE może pośrednio świadczyć o hamowaniu tego enzymu, co prowadzi do zwiększenia stężenia ACh w synapsach i łączenia się tego neuroprzekaźnika z większą ilością receptorów (29). Zjawisko to może wpłynąć pozytywnie na pamięć. Wykazano, że poziom ACh wzrasta nawet o 60% w hipokampie w trakcie uczenia się. W CS wyraźny wzrost (30-40%) aktywności tego neuroprzekaźnika następuje nieco później, co świadczy o aktywacji w pierwszej kolejności ośrodków odpowiedzialnych za pamięć deklaracyjną, a następnie ośrodków odpowiedzialnych za pamięć proceduralną (5, 22). Ponadto badania wskazują, że zwiększanie poziomu ACh poprzez infuzję antagonistów AChE w hipokampie i korze śródmózgowej odwraca negatywne działanie agonisty receptorów GABA osłabiających procesy pamięci i uczenia się. Podobny efekt uzyskano, stosując stewiozyd, glikozyd z rośliny stewia, u szczurów otrzymujących skopolaminę, która znacząco zwiększyła aktywność AChE w neuronach w porównaniu do grupy kontrolnej zwierząt. Doustne podanie stewiozydu zredukowało ten efekt, obniżając aktywność badanego enzymu w mózgu. Ponadto badania te wykazały, że słodzik stewiolowy znosi wywołany przez skopolaminę stres oksydacyjny w mózgu, redukując poziom glutationu oraz zwiększając poziom kwasu tiobarbituranowego (8, 28). Nieliczne publikacje opisują pozytywny wpływ słodzików stewiolowych na pamięć i uczenie się. Alkoholowy ekstrakt ze *Stevia rebaudiana*, zawierający m.in. RebA jako jeden z glikozydów, podawany doustnie w dawkach 50, 100 i 200

mg/kg m.c. przez 16 dni znacząco poprawił możliwości uczenia się oraz pamięć u młodych (4-6-miesięcznych) i starych (24-28-miesięcznych) szczurów. Badany roztwór w najwyższej dawce istotnie zredukował aktywność AChE u młodych szczurów. U 2-letnich zwierząt, aktywność tego enzymu była znacząco niższa w porównaniu do grupy kontrolnej już po otrzymaniu najniższej dawki ekstraktu. Autorzy tłumaczą, że uzyskany efekt może być przypisany antyoksydacyjnym i przeciwzapalnym właściwościom stewii (14, 15).

Niewiele badań przeprowadzono odnośnie do wpływu glikozydów stewiolowych na ośrodkowy układ nerwowy. Wyniki własne wskazują, że RebA wpływa na immunoreaktywność AChE w neuronach pola CA1 hipokampa i CS w obu badanych rozcieńczeniach po 15 dniach podawania. Na tej podstawie można przypuszczać, że badany glikozyd stewiolowy poprzez efekt na neurony cholinergiczne może pozytywnie wpływać na procesy pamięci i uczenia się, jednakże słodzik ten nie ma znaczącego działania na morfologię komórek nerwowych. RebA nie może być uważany za lek na demencję, lecz może znaleźć swoje zastosowanie jako suplement w leczeniu cukrzycy połączonej z utratą pamięci. Uzyskane wyniki badań własnych są wstępными obserwacjami i muszą być potwierdzone dodatkowo badaniami wpływu słodzików stewiolowych na struktury mózgowia.

Piśmiennictwo

1. Abudula R., Jeppesen P. B., Rolfsen S. E., Xiao J., Hermansen K.: Rebaudioside A potently stimulates insulin secretion from isolated mouse islets: studies on the dose-, glucose-, and calcium-dependency. *Metabolism* 2004, 53, 1378-1381.
2. Andrú J., Lachmann I., Luppá H.: A comparison of the localisation of acetylcholinesterase in the rat brain as demonstrated by enzyme histochemistry and immunohistochemistry. *Histochemistry* 1988, 88, 595-601.
3. Bukowska B., Pieniążek D., Hutniki K., Duda W.: Acetylo- i butyrylocholineraza – budowa, funkcje i ich inhibitory. *Curr. Top. Biophys.* 2007, 30, 11-23.
4. Carakostas M. C., Curry L. L., Boileau A. C., Brusick B. J.: Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food Chem. Toxicol.* 2008, 46, S1-S10.
5. Chang Q., Gold P. E.: Switching memory systems during learning: changes in patterns of brain acetylcholine release in the hippocampus and striatum in rats. *J. Neurosci.* 2003, 23, 3001-3005.
6. Chatsudhipong V., Muanprasat C.: Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacol. Ther.* 2009, 121, 41-54.
7. Curry L. L., Roberts A.: Subchronic toxicity of rebaudioside A. *Food Chem. Toxicol.* 2008, 46, S11-S20.
8. Degroot A., Parent M. B.: Increasing acetylcholine levels in the hippocampus or entorhinal cortex reverses the impairing effects of septal GABA receptor activation on spontaneous alternation. *Learn. Mem.* 2000, 7, 293-302.
9. Deshmukh S. S., Nierim J. J.: Hippocampus. *Wiley Interdiscip. Rev. Cogn. Sci.* 2012, 3, 231-251.
10. El Falougy H., Kubikova E., Benuska J.: The microscopical structure of the hippocampus in the rat. *Bratisl. Lek. Listy.* 2008, 109, 106-110.
11. Hasselmo M. E.: The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2006, 16, 710-715.
12. Hazali N., Mohamed A., Ibrahim M., Masri M., Md Isa K. A., Md Nor N., Ayob M. K., Fadzlan F. N. M.: Effect of acute Stevia consumption on blood glucose response in healthy Malay young adults. *Sains Malays.* 2014, 43, 649-654.
13. Jahanshahi M., Nickmahzar E. G., Seif-hoseini S., Babakordi F., Moharreri A.: Scopolamine reduces the density of M1 muscarinic neurons in rats' hippocampus. *Int. J. Morphol.* 2013, 31, 1227-1232.
14. Juyal D. S., Arun K., Ganga B.: Effect of Stevia rebaudiana (Bert.) extract on memory and acetylcholinesterase activity in young and aged rats. *JGPT* 2010, 2, 62-68.

15. Juyal D. S., Bisht G., Kumar A.: Memory enhancing effect of ethanolic extract of *Stevia rebaudiana* (Bert.). *Int. J. Phytomed.* 2010, 2, 166-171.
16. König J. F. R., Klippel R. A.: The rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. The Williams and Wilkins Company. Baltimore 1963.
17. Madan S., Ahmad S., Singh G. N., Kohli K., Kumar Y., Singh R., Garg M.: *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni – a review. *IJNPR* 2010, 1, 267-286.
18. Matos L. L., Stabenow E., Tavares M. R., Ferraz 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.
19. Nasrin-Sadat A., Morteza P., Shahrabano O., Mehrdad J., Vahab B., Mohammad-Reza Z.: Involvement of dorsal hippocampal α -adrenergic receptors in the effect of scopolamine on memory retrieval in inhibitory avoidance task. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2010, 93, 455-462.
20. Nguyen D. H., Zhou T., Shu J., Mao J.-H.: Quantifying chromogen intensity in immunohistochemistry via reciprocal intensity. *Cancer InCytes* 2013, 2, 1-4.
21. Packard M. G., Knowlton B. J.: Learning memory and functions of the basal ganglia. *Annu. Rev. Neurosci.* 2002, 25, 563-593.
22. Pepeu G., Giovannini M. G.: Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes. *Learn. Mem.* 2004, 11, 21-27.
23. Pezzuto J. M., Nanayakkara N. P., Compadre C. M., Swanson S. M., Kinghorn A. D., Guenther T. M., Sparnins V. L., Lam L. K.: Characterization of bacterial mutagenicity mediated by 13-hydroxy-ent-kaurenoic acid (steviol) and several structurally-related derivatives and evaluation of potential to induce glutathione S-transferase in mice. *Mutat. Res.* 1986, 169, 93-103.
24. Prakash I., Dubois G. E., Clos J. F., Wilkens K. L., Fosdick L. E.: Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener. *Food Chem. Toxicol.* 2008, 46, S75-S82.
25. Puri M., Sharma D., Tiwari A. K.: Downstream processing of stevioside and its potential applications. *Biotechnol. Adv.* 2011, 29, 781-791.
26. Roberts A., Renwick A. G.: Comparative toxicokinetics and metabolism of rebaudioside A, stevioside, and steviol in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2008, 46, 31-39.
27. Sasaki Y. F., Kawaguchi S., Kamaya A., Ohshita M., Kabasawa K., Iwama K., Taniguchi K., Tsuda S.: The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat. Res.* 2002, 519, 103-119.
28. Sharma D., Puri M., Tiwari A. K., Singh N., Jaggi A. S.: Antiamnesic effect of stevioside in scopolamine-treated rats. *Indian J. Pharmacol.* 2010, 42, 164-167.
29. Soreq H., Seidman S.: Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2001, 2, 294-302.
30. Toskulkao C., Chaturat L., Temcharoen P., Glinsukon T.: Acute toxicity of stevioside, a natural sweetener, and its metabolite, steviol, in several animal species. *Drug Chem. Toxicol.* 1997, 20, 31-44.
31. Tripathi A., Srivastava U. C.: Acetylcholinesterase: a versatile enzyme of nervous system. *Ann. Neurosci.* 2008, 15, 106-111.
32. Watanabe J., Asaka Y., Kanamura S.: Relationship between immunostaining intensity and antigen content in sections. *J. Histochem. Cytochem.* 1996, 44, 1451-1458.

Adres autora: dr n. wet. Karol Rycerz, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin;
e-mail: karol.rycerz@up.lublin.pl