

# Wpływ kwasu glutaminowego na uwalnianie katecholamin z podwzgórza królika w badaniach *ex vivo*

DANUTA WROŃSKA, BOGDAN FELIKS KANIA\*, SYLWIA PAŁKA\*\*, KONRAD KOZIÓŁ\*\*, MICHAŁ KMIECIK\*\*

Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt, \*\*Katedra Genetyki i Metod Doskonalenia Zwierząt, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

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

Otrzymano 30.08.2017

Zaakceptowano 09.01.2018

Wrońska D., Kania B. F., Pałka S., Kozioł K., Kmiecik M.

## Glutamate influence on catecholamine release from the hypothalamus of rabbits – *ex vivo*

### Summary

The aim of the study was to find the direct effects of a possible correlation between different glutamate concentrations (5, 50 and 200  $\mu\text{M}$ ) on the one hand and catecholamine release from rabbit hypothalamus homogenate during a 90 min incubation on the other hand. Brain structures were obtained from 12 decapitated female rabbits that were 12 weeks old. After decapitation the obtained brain of the animal was placed in 0.9% NaCl. Next, each brain structure from each rabbit (approx. 50 mg) was placed in incubation wells (cell culture Sigma) containing 1 ml of incubation medium (Krebs phosphate buffer containing glucose 0.3% bovine serum albumin and 0.1% BSA) without (control) or with three doses of Glu in a concentration of the following: I – 5  $\mu\text{M}$ , II – 50  $\mu\text{M}$ , and III – 200  $\mu\text{M}$ . Every 30 minutes each slice of tissue of each brain structure was placed in the next hole with the medium. The medium collected after 30, 60 and 90 minutes of the experiment was used for dopamine, noradrenaline and adrenaline RIA measurement. The obtained results show that Glu has a direct influence on catecholamines release from the hypothalamus as a central brain structure of the HPA axis in stress inducing and adaptive processes. Generally, there was an inhibitory effect on catecholamine release from the hypothalamus homogenates. Our findings show that Glu has great influence on the brain's motivational structure, which may indicate its contribution to stress response by modulating the amount of catecholamine released.

**Keywords:** hypothalamus, glutamate, catecholamines, rabbit

Kwas glutaminowy (nazywany zastępczo glutaminianem, Glutamate – Glu) obok kwasu asparaginowego (asparaginian, Aspartate – Asp) jest najsilniejszym neuroprzekaznikiem pobudzającym w ośrodkowym (OUN) i autonomicznym (AUN) układzie nerwowym ludzi i zwierząt. Jest też najszerzej rozpowszechnionym transmiterem w mózgu (11, 14). U królika jego najwyższe stężenia znajdują się w korze mózgu (hipokamp, zwłaszcza pole CA1), ciałach migdałowych i jądrach podstawy mózgu, ale również w podwzgórzu (9).

Nowymi metodami stereologicznymi określono, że w korze czołowej człowieka (stanowiącej 80% masy mózgu), której rozgałęzione neurony tworzą 85% synaps, 20% stanowią neurony gładkie, hamujące (GABA-ergiczne) tworzące tylko 15% synaps (2). Dane te sugerują, że neurony o charakterze glutaminergicznym i ich synapsy zdecydowanie przewyższają wszystkie inne

układy neuronów i ich neurotransmiterów w mózgu, z wyjątkiem układu GABA-ergicznego (3, 10, 15).

Tak więc z punktu widzenia neurotransmisji w mózgu Glu jest wielką glutaminergiczną maszyną pobudzającą, regulowaną przez relatywnie mały układ GABA-ergiczny, hamujący i modulowany przez znacznie mniejszą liczbę szlaków uwalniających różne inne przekazy, w tym monoaminergiczne (dopamina – DA, norepinefryna – NE, epinefryna – E, 5-hydroksytryptamina – 5-HT) oraz oksytocynowe/wazopresynowe (OXY/AVP). Wiadomo, że aminy biogenne przez modulację liczego neuroprzekaznictwa chemicznego wpływają na wszystkie czynności mózgu włącznie ze snem/czuwaniem, aktywnościami biologicznymi związanymi z napędem, w których pośredniczy podwzgórze, czynnościami emocjonalno-motywacyjnymi, w których pośredniczy obieg limbiczny i zachowaniami

opartymi na wartościach, o których decyduje *neocortex* (5, 12).

Podwzgórze (*hypothalamus*) jest częścią międzymózgowia położonego poniżej wzgórza, między blaszką końcową i ciałami suteczkowatymi, tworząc ściany i podstawę III komory mózgowej. U podstawy komory III dwie połowki podwzgórza tworzą okolicę mostowopodobną, zwaną wyniosłością pośrodkową. Wyniosłość ta jest istotna, gdyż w niej zakończenia aksonów neuronów podwzgórza uwalniają neuropeptydy zaangażowane w kontrolę czynności przedniego płata przysadki. Poza tym, przez wyniosłość pośrodkową przechodzą aksony neuronów podwzgórzowych kończących się w płacie tylnym przysadki. Dolne lejki wyniosłości tworzą część lejkowatą części nerwowej przysadki, zwaną płatem tylnym, który może być uznawany za rozszerzenie podwzgórza (6). Takie implikacje anatomiczne pozwalają na układowe integracje różnych zespołów neurohormonalnych w koordynacji zachowań i czynności organizmów, w tym na zachowanie homeostazy biologicznej. Jest w tym szczególna rola podwzgórza jako centralnej struktury osi podwzgórzowo-przysadkowo-korowo-nadnerczowej, zaangażowanej w reakcje emocjonalne organizmów, a szczególnie w stresie i sytuacjach konfliktowych (11, 13).

Glutaminian i asparaginian wywierają swoje działania przez 3 oddzielne typy receptorów cechujące się wybiórczą interakcją z NMDA, kwasem kwiskwalanowym (kwas alfa-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy – AMPA) oraz receptorem kainianowym (1). Kwas glutaminowy, jako specyficzny agonista złożonego receptora glutaminergicznego mGluR oraz iNMDAR, może pośredniczyć w wyzwaniu agresji, strachu, bólu, a także w rozwoju neurotoksyczności, jaka była stwierdzana w niedokrwiennym uszkodzeniu mózgu. Antagonista specyficzny jonowego receptora kwasu N-metyl-D-asparaginowego (iNMDAR) zapobiegał bowiem śmierci komórek neuronalnych w eksperymentach przeprowadzonych na modelach zwierzęcych niedotlenionego-niedokrwiennego uszkodzenia mózgu. Neurotoksyczność obu wymienionych kwasów jest najprawdopodobniej przyczyną chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroby: Alzheimer, Huntingtona, Parkinsona, epilepsji, a nawet schizofrenii (10). Pośrednictwo receptora NMDA w neurotoksyczności glutaminianu dotyczy wejścia jonów wapnia ( $Ca^{2+}$ ) do komórek *via* otwarte, bramkowane ligandem, napięciowo zależne kanały wapniowe (VGCC), kanały  $Ca^{2+}$  aktywowane transmiterem oraz objętościowe kanały wejścia  $Ca^{2+}$  (4, 11, 12). Zwiększenie aktywności NOS (syntazy tlenu azotu) przez stymulację receptorów NMDA skrawków mózdzku również jest konsekwencją wejścia jonów  $Ca^{2+}$  do komórek, gdzie wiążą się z kalmoduliną, która z kolei jest powiązana z NOS. To podkreśla zależność neurotoksyczności Glu od NO (tlenu azotu), potwierdzoną w hodowlach neuronów kory, wybiórczo znoszoną przez stosowanie inhibitorów NOS (10).

W niniejszym opracowaniu określano rolę L-Glu – głównego aminokwasu pobudzającego w mózgowiu

– w kontrolowaniu uwalniania katecholamin podwzgórzowych. Ta struktura mózgu zawiera duże zgęszczenie zarówno receptorów glutaminianergicznych, jak też katecholaminoergicznych. Zastosowano stężenia kwasu przekraczające stężenia fizjologiczne. Wiadomo bowiem, że nadmiar kwasu w neuronach mózgowia powoduje silną depolaryzację zakończeń presynaptycznych neuronów i nasila uwalnianie różnych transmiterów, w tym też katecholamin w szlakach adrenergicznych mózgu. Celem badań była analiza wpływu różnych stężeń L-Glu (5, 50 i 200  $\mu$ M) na uwalnianie DA, norepinefryny (NE) i epinefryny (E) z homogenatów podwzgórza w ciągu 90 min inkubacji. Podwzgórze jest bowiem strukturą centralną zaangażowaną w aktywności osi podwzgórzowo-przysadkowo-korowo-nadnerczowej (HPA) w procesach stresu oraz adaptacji.

### Materiał i metody

Doświadczenie wykonano na podwzgórzach pochodzącym z 12 mózgow królików płci żeńskiej, rasy popieliańskiej białej w wieku 12 tygodni. Wodę oraz paszę zwierzęta otrzymywały *ad libitum* (gotowa mieszanka pełnoporcjowa dla tej grupy wiekowej). Zastosowany cykl świetlny wynosił 10 D : 14 L. Mózgi natychmiast po uboju królików zostały udostępnione w ubojni dzięki uprzejmości Katedry Genetyki i Metod Doskonalenia Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Tuż po dekapitacji oczyszczano skórę głowy, usuwano ją z pokrywy czaszki, czaszkę trepanowano, po czym izolowano mózg. Osuszano go na bibule filtracyjnej, usuwano opony i umieszczano na lodzie w sterylnych płytkach Petriego wypełnionych solą fizjologiczną. Następnie izolowano podwzgórze (1, 4). Pozyskaną strukturę umieszczano w szalkach Petriego na lodzie, w roztworze soli fizjologicznej, pocięto na mniejsze fragmenty, o zbliżonej masie (ok. 50 mg). Rozdrobnione skrawki tkanki 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 karbo-genu – 95%  $O_2$  i 5%  $CO_2$  w temperaturze 38°C w inkubatorze Sanyo (MCO-18A1C). Stabilizacja skrawków tkanki struktury przenoszono do kolejnych dołków zawierających czyste podłoże Krebsa oraz 3 różne stężenia kwasu glutaminowego (L-glutamic acid monosodium salt hydrate; Sigma): I – 5  $\mu$ M, II – 50  $\mu$ M, III – 200  $\mu$ M w objętości 1 mL podłoża Krebsa. Każdy skrawek struktury co 30 min przekładano do kolejnych studzienek inkubacyjnych zawierających medium inkubacyjne z określonym stężeniem kwasu glutaminowego. Medium zebrane ze studzienek po upływie 30, 60 i 90 minut inkubacji tkanki analizowanej struktury mózgu królików zostało zamrożone do czasu wykonywania analiz.

Metodą radioimmunologiczną (RIA) wykonano oznaczenia stężeń amin katecholowych (KA) – E, NE i DA, używając do tego gotowych zestawów 3 CATFast Tract firmy Labor Diagnostica Nord (Niemcy). Czulość metody dla określenia stężeń poszczególnych KA wynosiła 19  $pg \cdot mL^{-1}$  dla E, gdzie błąd wewnątrzseryjny wynosił 8,8%, a błąd zewnątrzseryjny 10,1%. Dla NE wartości te wynosiły, odpowiednio: 42  $pg \cdot mL^{-1}$ , 10,9% oraz 12,3% dla DA. Uzyskane wyniki przeliczano na 1 mg tkanki mózgowej.

Istotność statystyczną wyników obliczono z zastosowaniem dwukierunkowej analizy wariancji ANOVA, a następnie testu wielokrotnego rozstępu Duncana. Logarytmiczne przekształcenia obliczono jako konieczne do utrzymania wariancji jednorodności i normalności. Za istotne uznano różnice między poszczególnymi wartościami przy  $p \leq 0,05$ . Obliczenia przeprowadzono z zastosowaniem programu Sigma Stat 2.03 (SPSS Science Software GmbH, Germany). Uzyskane wyniki przedstawiono jako zmiany procentowe w wartościach średnich.

## Wyniki i omówienie

### Wpływ różnych stężeń L-Glu na uwalnianie KA.

Średnie stężenia uwalnianej DA z homogenatów podwzgórza w grupie kontrolnej po 30 min inkubacji wynosiły  $1,35 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$  i zmniejszały się stopniowo do  $0,46$  ( $-66\%$ ) i  $0,31$  ( $-77,1\%$ )  $\text{ng} \cdot \text{mg}^{-1}$  tkanki, kolejno po 60 i 90 min inkubacji. L-Glu dodany do medium inkubacyjnego w stężeniu  $5 \mu\text{M}$  zmniejszył ilość DA uwalnianej z homogenatów podwzgórza po 30 min inkubacji z  $1,35$  do  $0,1 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$  ( $-92,6\%$ ), z  $0,46$  do  $0,17$  ( $-63,1\%$ ) oraz z  $0,31$  do  $0,16 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$  ( $-51,6\%$ ) kolejno po 60 i 90 min inkubacji (ryc. 1). Podobne wyniki uzyskano po stosowaniu L-Glu do medium podwzgórza w stężeniach  $50$  i  $200 \mu\text{M}$  (ryc. 2-3).

**Wpływ L-Glu na uwalnianie NE.** Średnie stężenia kontrolne NE uwalnianej do medium z homogenatów podwzgórza po 30 min inkubacji wynosiły  $3,065$  i zmniejszały się do  $2,78$  i  $0,77 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$  tkanki (o  $9,1\%$  oraz o  $74,9\%$ ), odpowiednio, po 60 i 90 min inkubacji.

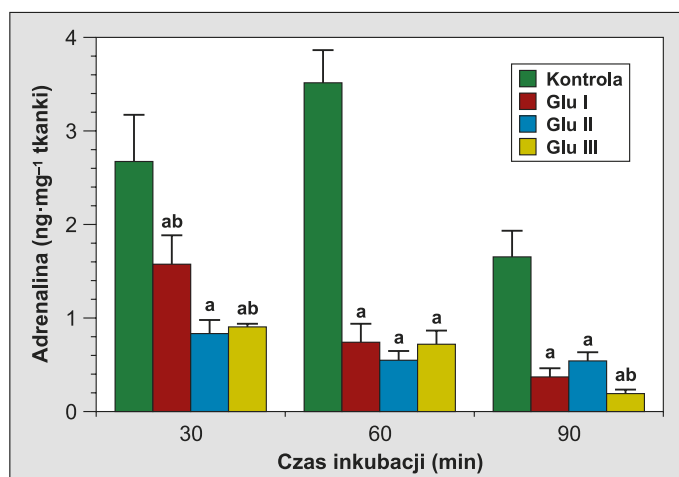
Pierwsze stężenie L-Glu wynoszące  $5 \mu\text{M}$  dodane do medium obniżało stężenia NE uwalnianej z homogenatu podwzgórza z  $3,065$  w kontroli do  $1,98 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$  tkanki (o  $42,26\%$ ) w 30 min i z  $2,787$  do  $0,94 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$  tkanki (o  $66,3\%$ ) w 60 min oraz z  $0,77$  do  $0,47 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$  tkanki (o  $39\%$ ) po 90 min inkubacji. Średnie hamowanie uwalniania NA z homogenatów podwzgórza przez L-Glu w stężeniu  $5 \mu\text{M}$  wynosiło  $48\%$  i było znamienne statystycznie ( $p \leq 0,05$ ) (ryc. 1).

Drugie stężenie L-Glu ( $50 \mu\text{M}$ ) zmniejszało uwalnianie NA z homogenatu podwzgórza po 30 i 60 min inkubacji, odpowiednio, o  $66,7\%$  oraz  $54,8\%$  (ryc. 2). Po 90 min inkubacji homogenatu notowano nieistotne zwiększenie stężenia uwolnionej NA (o  $5,3\%$ ).

Najwyższe stężenie L-Glu wynoszące  $200 \mu\text{M}$  również hamowało uwalnianie NA z homogenatów podwzgórza, odpowiednio, o  $46,9\%$ ,  $17,5\%$  oraz  $35\%$  po 30, 60 i 90 min inkubacji tkanki. Najsilniejsze hamowanie uwalniania NA przez to stężenie L-Glu miało miejsce po 30 min i podobne po 90 min inkubacji homogenatu (ryc. 3).

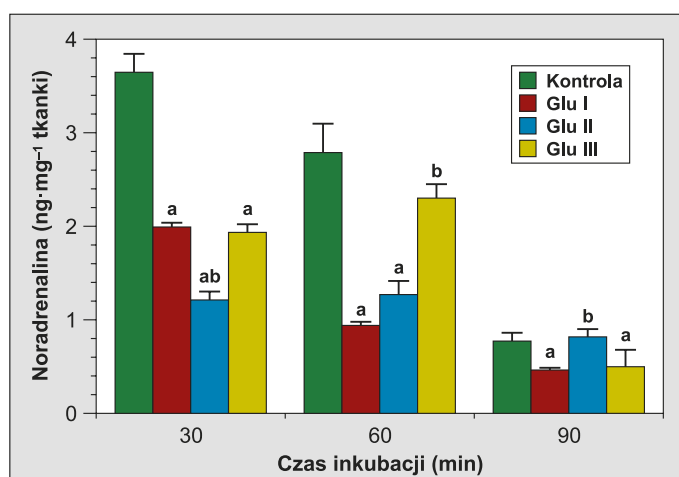
**Wpływ L-Glu na uwalnianie E.** Średnie kontrolne stężenie uwalnianej E z homogenatów podwzgórza zwiększało się po 60 min inkubacji z  $2,07$  do  $3,51 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$  ( $+31,5\%$ ), po czym zmniejszało się do  $1,64 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$  ( $-38,6\%$ ) po 90 min inkubacji homogenatu podwzgórza.

L-Glu w stężeniu  $5 \mu\text{M}$  istotnie hamował uwalnianie E z homogenatów podwzgórza z  $2,67$  do  $1,57$  ( $-41,2\%$ ), z  $3,51$  do  $0,73$  ( $-79,1\%$ ) oraz z  $1,64$  do  $0,36 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$  ( $-78,1\%$ ) kolejno, po 30, 60 i 90 min inkubacji (ryc. 1).



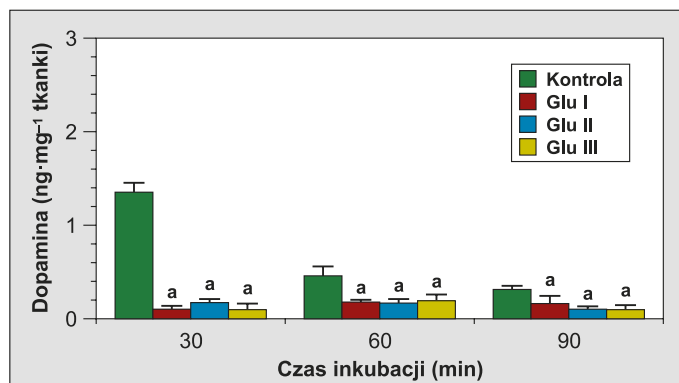
Ryc. 1. Zmiany stężenia uwalnianej adrenaliny (epinefryny) z homogenatów podwzgórza królika przed i po 90 min inkubacji w obecności dodanego L-Glu w stężeniu  $5 \mu\text{M}$  (Glu I),  $50 \mu\text{M}$  (Glu II) lub  $200 \mu\text{M}$  (Glu III) ( $n = 12$ )

Objaśnienia: a – różnice istotne, ( $P < 0,05-0,01$ ) w porównaniu do wartości w grupie kontrolnej; b – różnice istotne ( $P < 0,05-0,01$ ) pomiędzy zastosowanymi dawkami Glu



Ryc. 2. Zmiany stężenia uwalnianej noradrenaliny (norepinefryny) z homogenatów podwzgórza królika przed i po 90 min inkubacji w obecności dodanego L-Glu w stężeniu  $5 \mu\text{M}$  (Glu I),  $50 \mu\text{M}$  (Glu II) lub  $200 \mu\text{M}$  (Glu III) ( $n = 12$ )

Objaśnienia: jak na ryc. 1



Ryc. 3. Zmiany stężenia uwalnianej dopaminy z homogenatów podwzgórza królika przed i po 90 min inkubacji w obecności dodanego L-Glu w stężeniu  $5 \mu\text{M}$  (Glu I),  $50 \mu\text{M}$  (Glu II) lub  $200 \mu\text{M}$  (Glu III) ( $n = 12$ )

Objaśnienia: a – różnice istotne ( $P < 0,05-0,01$ ) w porównaniu do wartości w grupie kontrolnej

L-Glu dodawany do medium w stężeniach 50 i 200  $\mu\text{M}$  hamował przez 90 min uwalnianie E z homogenatów podwzgórza średnio o 76,25% (z 2,596 do 0,61  $\text{ng} \cdot \text{mg}^{-1}$  tkanki) (ryc. 2 i 3).

Uzyskane wyniki świadczą o istotnym działaniu hamującym wszystkich 3 stężeń L-Glu na uwalnianie KA z homogenatów podwzgórza królika w ciągu 90 min obserwacji. Biorąc pod uwagę bardzo silne działania depolaryzujące kwasu na zakończenia neuronalne różnych struktur OUN w tym adrenergicznych należy sądzić, że albo testowany kwas aplikowany w stężeniach 5-, 50- oraz 200-krotnie wyższych od fizjologicznych uszkadzał te zakończenia, albo stymulował aktywność enzymów degradujących na szlaku syntezy wewnątrz mózgowych KA.

Dyskusja jest o tyle utrudniona, że brak porównywalnych informacji, a przecież w strukturach tkanki nerwowej podwzgórza znajduje się wiele rozmaitych neuronów uwalniających zarówno neuropeptydy, jak i inne neurotransmitery czy modulatory. Być może uzyskane dane stanowią wypadkową współgrania tych substancji aktywnych biologicznie, na których gospodarkę może wpływać L-Glu równocześnie, takich np. jak OXY, 5-HT, AVP czy GABA. Wyjaśnienie tego fenomenu wymagałoby dalszych dociekań eksperymentalnych uwzględniających wzajemne interakcje L-Glu/KA/GABA/OXY w centralnej strukturze osi HPA, odpowiedzialnej jako pierwsza w warunkach niekorzystnego oddziaływania czynników na organizm.

Podwzgórze królika zawiera średnio DA w stężeniu 0,28, NE w stężeniu 1,12 i E w stężeniu 0,04  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  tkanki. Tak silne hamowanie uwalniania KA przez aplikowane stężenia L-Glu, paradoksalnie powodowałyby adrenolizę badanej struktury mózgu (7).

Kwas glutaminowy, asparagina i glutamina powstają z ich wspólnego prekursora, kwasu asparaginowego. Sam kwas Glu jest syntetyzowany z prekursora –  $\alpha$ -ketoglutaranu – w cyklu Krebsa. Glu syntetyzowany jest głównie w neuronach jako transmitter pobudzający (obok kwasu asparaginowego) powodujący zwiększenie przepływu jonów dodatnich ( $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$ ) przez otwieranie kanałów jonowych po związaniu się z odpowiednimi receptorami specyficznymi. Stymulację tych receptorów kończy niezależny od  $\text{Cl}^-$  system transportu błonowego, który wykorzystywany jest jedynie do ponownego wchłaniania Glu i Asp przez błonę presynaptyczną. Glu może być również reabsorbowany (wchłaniany zwrotnie) do neuronów w celu późniejszego wykorzystania. Nadmiar Glu uwolnionego w synapsach jest przekształcany do glutaminy (związku pozbawionego cech ekscytotoksycznych) przez sąsiadujące astrocyty (komórki gleju). Glutamina jest bezpiecznie transportowana *de novo* do neuronów dla rekonwersji do L-Glu. Nadmierne nagromadzenie Glu w astrocytach jest powodem neuroekscytotoksyczności. Dochodzi do zahamowania dalszego absorbowania nadmiaru Glu, który w przestrzeni subsynaptycznej powoduje ciągłą stymulację zakończeń neuronalnych przez ich depolaryzację, przez co prowadzi do uwalniania różnych

transmitterów, wyczerpania rezerw energetycznych, i w końcu do zmian neurodegeneracyjnych oraz apoptozy neuronów (3, 14). Glu działa na specyficzne receptory kwasu N-Metylo-D-Asparaginowego (iNMDAR) oraz na receptory nie-NMDA (mGluR). Receptor NMDA jest kanałem jonowym dla jonów  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  (8).

Wydaje się, że uzyskane wyniki są następstwem pobudzającego działania Glu na receptory grupy II i/lub III zlokalizowane presynaptycznie jako autoreceptory hamujące na synapsach glutaminergicznych neuronów podwzgórza. Pobudzone przez Glu zmniejszają wewnątrzkomórkowe stężenie cAMP i cGMP przez hamowanie aktywności cyklicznej adenylanowej i guanylanowej. Receptory te mogą również wykazywać swe działania przez białka G pośredniczące kanałom  $\text{Ca}^{2+}$ . Pobudzenie receptorów mGluR grupy I na synapsach adrenergicznych mózgu powodowałoby bowiem depolaryzację zakończeń presynaptycznych neuronów i nasilone uwalnianie transmitterów, w tym też katecholamin. Hipoteza ta wymagałaby potwierdzenia eksperymentalnego z zastosowaniem substancji znakowanych izotopowo dla diagnozowania obecności specyficznych receptorów mGluR w hodowli neuronów królika *in vitro*.

## Piśmiennictwo

1. Dawson M. E., Neuchterlein K. H., Shell A. M., Gitlin M., Ventura J.: Autonomic abnormalities in schizophrenia: State or trait indicators? Arch. Gen. Psychiatry 1994, 51, 813-824.
2. Douglas R. J., Martin K. A.: Mapping the matrix: the ways of neocortex. Neuron 2007, 56, 226-238.
3. Fedder K. N., Sbo S. L.: On the role of glutamate in presynaptic development: possible contributions of presynaptic BMDA receptors. Biomolecules 2015, 5, 3448-3466.
4. Garcia A. G., Garcia-de-Diego A. M., Gandia L., Borges R., Garcia-Sancho J.: Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. Physiol. Rev. 2006, 86, 1093-1131.
5. Guilemin R.: Hypothalamic hormone a.k.a. hypothalamic releasing factors. J. Endocrinol. 2005, 184, 11-286.
6. Holzbauer M., Sharman D. F.: Distribution of catecholamines in vertebrates, [w:] Blaschko H., Muscholl I. E. (red.): Catecholamines: Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin, Springer 1972, 33, 110-185.
7. Huang W. T., Niu K. C., Chang C. K., Lin M. T., Chang C. P.: Curcumin inhibit the increase of glutamate, hydroxyl radicals and PGE2 in the hypothalamus and reduces fever during LPS-induced systemic inflammation in rabbits. Eur. J. Pharmacol. 2008, 593, 105-111.
8. Humphries P., Pretorius P. E., Naudé H.: Direct and indirect cellular effects of aspartame. Eur. J. Clin. Nutr. 62, 451-462.
9. Okada Y., Nitsch-Hassler C., Kim J. S., Bak I. J., Hassler R.: Role of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in the extrapyramidal motor system. 1. Regional distribution of GABA in rabbit, rat, guinea pig and baboon CNS. Exp. Brain Res. 1991, 13, 514-515.
10. Orrego F., Villaneuva S.: The chemical nature of the main central excitatory transmitter: A critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization. Neurosci. 1993, 56, 539-555.
11. Pralong E., Magistretti P., Stoop R.: Cellular perspectives on the glutamate-monoamine interactions in limbic lobe structures and their relevance for some psychiatric disorders. Progr. Neurobiol. 2002, 67, 173-202.
12. Rosa J. M., Nanclares C., Orozco A., Colmena J., Pascual R., de, Garcia A. G., Gansia L.: Regulation by L-type calcium channels of endocytosis: An overview. J. Mol. Neurosci. 2012, 48, 360-367.
13. Sanacora G., Treccani G., Popoli M.: Towards a glutamate hypothesis of depression: An emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. Neuropharmacol. 2012, 62, 63-77.
14. Tong Q., Ye C. P., McCrimmon R. J., Dhillon H., Choi B., Kramer M. D., Yu J., Lee Z. C. E., Choi C. S., Zigman J. M., Shalman G. J., Sherwin R. S., Elmquist J. K., Lowell B. B.: Synaptic glutamate release by ventromedial hypothalamic Neurons part of hypoglycemia the neurocircuitry that prevents. Cell Metab. 2007, 5, 383-393.
15. Welker W., Johnson J. I., Noe A.: Comparative mammalian brain collection. Univ. of Wisconsin, Michigan State Univ., USA 2001.

Adres autora: dr hab. Danuta Wrońska, ul. Chmieleniec 19/44, 30-348 Kraków; e-mail: rzwronsk@cyf-kr.edu.pl