

Wpływ glutaminianu sodu na neurony i glejowe komórki satelitowe zwojów rdzeniowych neonatalnych szczurów

REGINA CYBULSKA, JADWIGA JAWORSKA-ADAMU, KRYSZYNA CZERNY*, ELŻBIETA MISZCZAK-DZIADOSZ

Zakład Histologii i Embriologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

*Katedra Histologii i Embriologii Wydziału Lekarskiego AM, ul. Radziwiłłowska 11, 20-080 Lublin

Cybulska R., Jaworska-Adamu J., Czerny K., Miszczak-Dziadosz E.

Effect of sodium glutamate on neurons and glial satellite cells of the dorsal root ganglia of neonatal rats

Summary

The effect of intraperitoneal administration of sodium glutamate at the dose of 1g/kg of body weight on the structures of the dorsal root ganglia in the lumbar region (L1- L4) of neonatal Wistar rats was investigated. After single doses and five consecutive doses of sodium glutamate, identical changes in the form of cytoplasmic vacuolizations in both ganglionic neurons and the accompanying glial satellite cells were observed. Through electron microscopic examination, vacuoles were identified as swollen mitochondria and without mitochondrial cristae. These results indicate that intraperitoneally administered sodium glutamate may have caused the fenestrated vascular endothelium of vessels and brought about a cytotoxic influence on the ganglionic neurons and glial satellite cells.

Keywords: sodium glutamate, dorsal root ganglia, cytotoxicity, rat

W zwojach kręgowych zwierząt neurony i otaczające je glejowe komórki satelitowe, zwane także glejem płaszczowym, wykazują charakterystyczny wzajemny układ. Każdy neuron okryty jest otoczką komórek satelitowych, która od podobnej otoczki okalającej sąsiedni neuron oddzielona jest niewielką ilością tkanki łącznej. Każdy neuron zwojowy stanowi zatem oddzielną jednostkę (21-24). Pewna część naczyń krwionośnych włosowatych zwojów nerwowych obwodowych, w tym także zwojów rdzeniowych, wykazuje cechy naczyń okienkowatych, których komórki śródbłonna zawierają pory w cytoplazmie. Po dożylnym podaniu dorosłym zwierzętom doświadczalnym egzogennych znaczników białkowych o różnej wielkości cząstek, znaczniki te przechodzą w obrębie zwojów nerwowych poza obręb naczyń, wskazując na pewną ich przepuszczalność (9, 13-15).

Glejowe komórki satelitowe zwojów nerwowych obwodowych mają zdolność wychwytu glutaminianu (27) i wyposażone są w syntetazę glutaminianową, enzym niezbędny do metabolizmu tego neuroprzekaźnika (10). W neuronach zwojów rdzeniowych i innych zwojów obwodowych wykazano obecność glutaminianu (29) oraz receptorów glutaminianoergicznych (25, 26). Sugeruje to, że glutaminian może być włączony w neurotransmisję w obwodowym układzie nerwo-

wym. W ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) glutaminian jest znanym od dawna pobudzającym neuroprzekaźnikiem. Według niektórych autorów około 90% neuronów oraz glejowe komórki astrocyty są wrażliwe na działanie tego pobudzającego aminokwasu dzięki występowaniu na tych strukturach odpowiednich receptorów (7, 8). W latach 1969-71 Olney i wsp. (17-20) wykazali, że glutaminian bądź glutaminian sodu podane neonatalnym szczurom lub myszom powodują selektywne uszkodzenia neurodegeneracyjne w obszarach mózgu, różniących się od pozostałych obszarów OUN obecnością naczyń krwionośnych włosowatych typu okienkowego. Są to obszary okołomorowe, które nie posiadają bariery krew-mózg (16). Badania te dały podstawę dla powstania teorii łączącej zmiany neurodegeneracyjne z przedłużonym pobudzeniem receptorów aminokwasów pobudzających, do których należy również glutaminian (32).

Zwoje rdzeniowe i obszary mózgu wrażliwe na neurodegeneracyjny wpływ glutaminianu cechuje pewne podobieństwo w postaci mikronaczyń o budowie okienkowej i obecności na neuronach receptorów glutamatergicznych mogących wiązać glutaminian. Wydaje się zatem interesujące prześledzenie wpływu podanego pozajelitowo glutaminianu sodu na struktury zwojów rdzeniowych. Nie wykonano dotychczas ba-

dań określających czy podany pozajelitowo glutaminian może wywierać cytotoksyczny wpływ na strukturę zwojów obwodowego układu nerwowego.

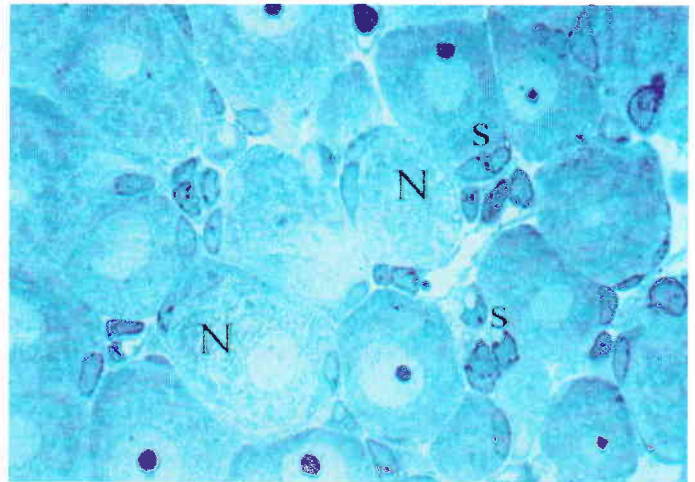
Materiał i metody

Doświadczenie przeprowadzono na neonatalnych szczurach białych Wistar obydwu płci. I – grupę kontrolną (5 szt.) stanowiły szczury 5-dniowe, którym dootrzewnowo podano roztwór soli fizjologicznej, II – grupę 5-dniowe szczury doświadczalne (5 szt.), którym dootrzewnowo podano jednorazowo glutaminian sodu czysty (Ubichem Ltd Hampshire) w dawce 1 g/kg m.c. Od obydwu grup zwierząt pobrano zwoje rdzeniowe odcinka lędźwiowego ($L_1 - L_4$), po 5 godzinach od iniekcji dootrzewnowej. III – grupę stanowiły szczury 5-dniowe kontrolne (5 szt.), otrzymujące dootrzewnowo roztwór soli fizjologicznej przez 5 kolejnych dni, IV – grupę 5-dniowe szczury doświadczalne (5 szt.), którym przez 5 kolejnych dni podano dootrzewnowo glutaminian sodu również w dawce 1 g/kg m.c. Od szczurów grup III i IV zwoje rdzeniowe odcinka lędźwiowego ($L_1 - L_4$) pobrano po 3 dniach od ostatniej iniekcji. Zwierzęta grup III i IV w momencie pobrania zwojów osiągnęły wiek 13 dni. Szczury dekapitowano w narkozie i pobierano odcinki lędźwiowe kręgosłupa. W celu pobrania zwojów rdzeniowych z fragmentów kręgosłupa odcinka lędźwiowego szybko usuwano wyrostki kolczyste i odsłaniano rdzeń kręgowy po stronie dogrzebtywowej, po czym utrwalano je przez 2 godziny w temperaturze pokojowej w 2% formaldehydzie i 2,5% glutaraldehydzie w 0,1 M buforze kakodylowym pH 7,4. Po wypreparowaniu zwoje rdzeniowe dotrwalono w płynie o takim samym składzie. Wykonano preparaty półcienkie do obserwacji w mikroskopie świetlnym barwione 1% błękitem metylenowym z 1% azurem II w 1% roztworze czteroboranu sodu, oraz ultracienkie do obserwacji w mikroskopie elektronowym (ME).

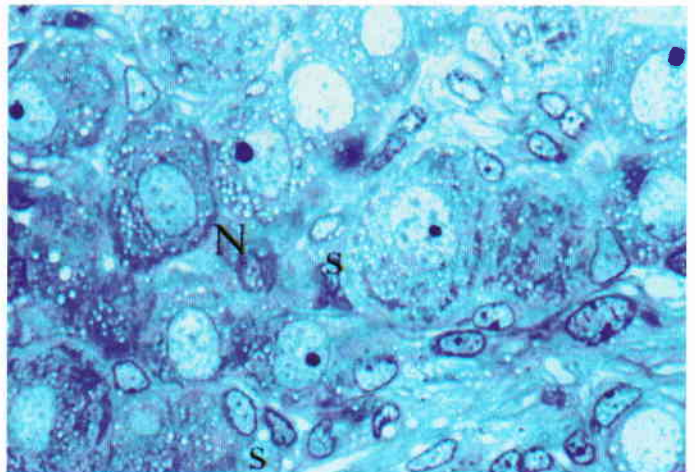
Wyniki i omówienie

Na skrawkach półcienkich ze zwojów rdzeniowych 5-dniowych szczurów I gr. kontrolnej neurony zwojowe i towarzyszące im satelitowe komórki glejowe wykazały charakterystyczny wzajemny układ (ryc. 1). W większości neuronów w obrębie zwoju i w glejowych komórkach satelitowych zwierząt II gr. doświadczalnej pojawiła się wakuolizacja cytoplazmy (ryc. 2). W obrazach ME neurony zwojowe i komórki glejowe satelitowe 5-dniowych szczurów I gr. kontrolnej zmian nie wykazały i posiadały dobrze zachowane organella komórkowe (ryc. 3). Widoczne na skrawkach półcienkich wakuole w neuroplazmie i cytoplazmie komórek satelitowych szczurów II gr. doświadczalnej okazały się obrzmiałymi i pozbawionymi grzebieni mitochondriami (ryc. 4). W zwojach rdzeniowych 13-dniowych zwierząt doświadczalnych IV gr., po 5-krotnym podaniu glutaminianu sodu, w porównaniu ze strukturą zwojów 13-dniowych zwierząt kontrolnych III gr. (ryc. 5), obserwowano na skrawkach półcienkich liczne zwakuolizowane neurony zawierające w neuroplazmie pojedyncze, ciemniej wybarwione ziarnistości oraz wakuolizację glejowych komórek satelitowych (ryc. 6).

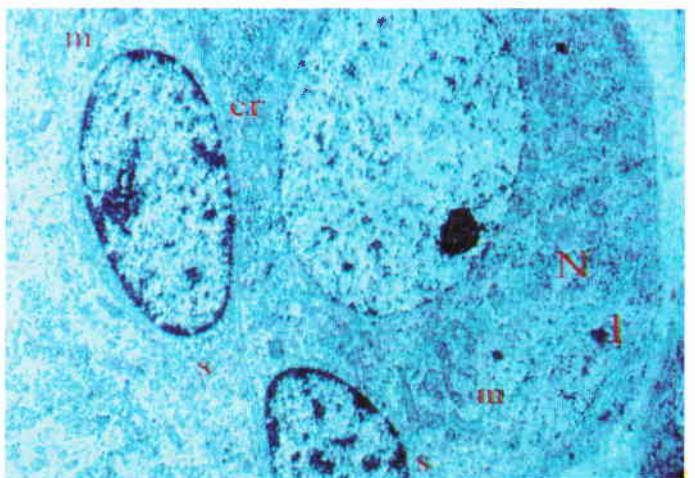
Na elektronogramach ze zwojów rdzeniowych szczurów 13-dniowych III gr. kontrolnej neurony i okalające je komórki glejowe wykazywały prawidłową strukturę (ryc. 7). Po 5-krotnym podaniu glutaminianu sodu



Ryc. 1. Fragment zwoju rdzeniowego 5-dniowego szczura z I gr. kontrolnej, N – neuron zwojowy, s – glejowe komórki satelitowe (1200×)

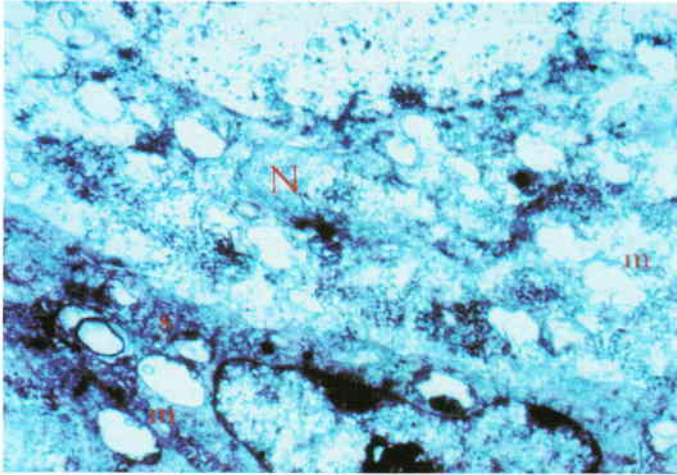


Ryc. 2. Fragment zwoju rdzeniowego 5-dniowego szczura z I gr. doświadczalnej, N – zwakuolizowane neurony, s – zwakuolizowane glejowe komórki satelitowe (pow. 1200×)

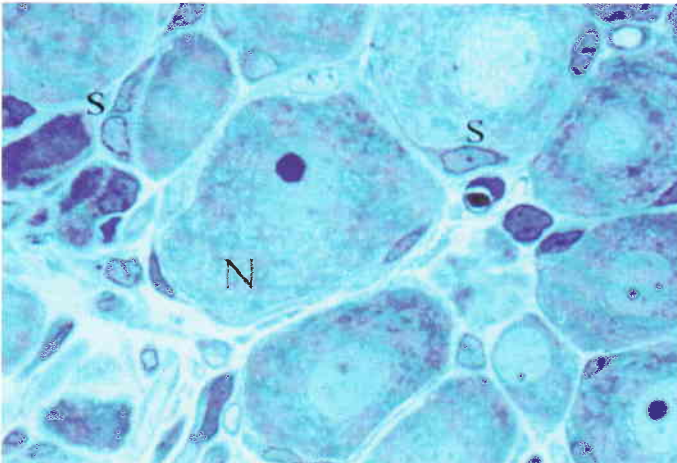


Ryc. 3. Elektronogram neuronu zwojowego – N i glejowych komórek satelitowych – s 5-dniowego szczura z I gr. kontrolnej; m – mitochondria, er – ergastoplazma, l – lizosom (pow. 5000×)

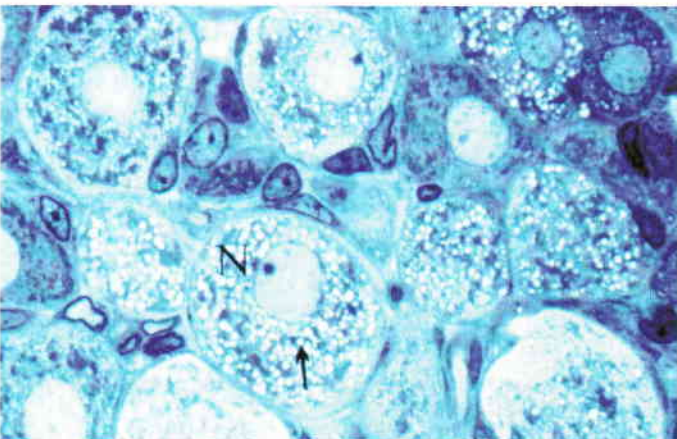
w zwojach 13-dniowych szczurów IV gr. doświadczalnej obserwowano zmiany o podobnym charakterze jak u szczurów II gr. doświadczalnej po jednorazowym dootrzewnowym podaniu glutaminianu sodu. Przejaj-



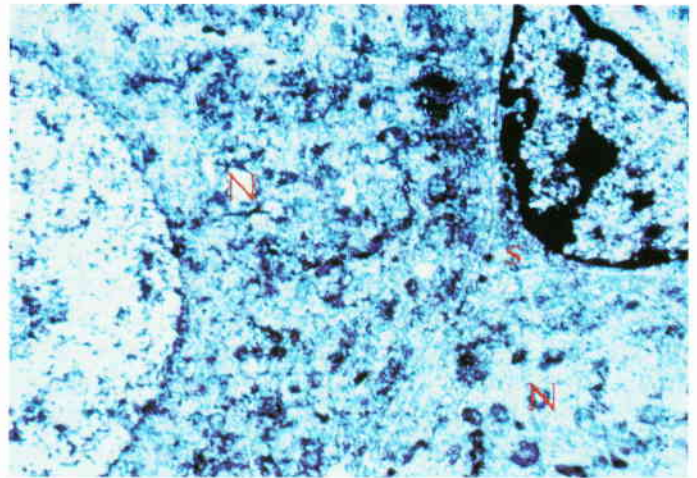
Ryc. 4. Elektronogram neuronu zwojowego – N i komórki glejowej satelitarnej – s 5-dniowego szczura z I gr. doświadczalnej; m – obrzmiałe mitochondria pozbawione grzebieni (pow. 12 000×)



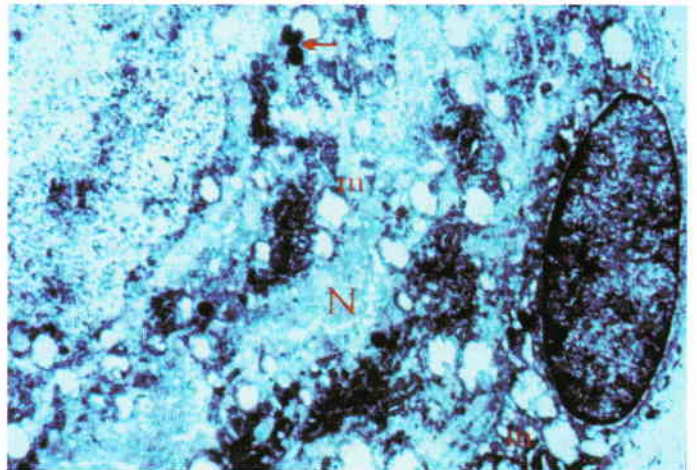
Ryc. 5. Fragment zwoju rdzeniowego 13-dniowego szczura z III gr. kontrolnej; N – neuron, s – glejowe komórki satelitarne (pow. 1200×)



Ryc. 6. Fragment zwoju rdzeniowego 13-dniowego szczura z IV gr. doświadczalnej; N – zwakuolizowany neuron z nielicznymi intensywnie wybarwionymi ziarnistościami (↓), (pow. 1200×)



Ryc. 7. Elektronogram neuronu zwojowego – N i glejowej komórki satelitarnej – s 13-dniowego szczura z III gr. kontrolnej (pow. 12 000×)



Ryc. 8. Elektronogram neuronu zwojowego – N i glejowej komórki satelitarnej – s 13-dniowego szczura z IV gr. doświadczalnej; m – zmienione mitochondria, przy niektórych widoczne lizosomy (↓), (pow. 12 000×)

wiały się one obrzmieniem mitochondriów i utratą ich grzebieni (ryc. 8).

Uzyskane wyniki z przeprowadzonych obserwacji mikroskopowych wykazały zmiany w strukturze neuronów i glejowych komórek satelitowych w zwojach rdzeniowych szczurów grup doświadczalnych. Glutaminian sodu podany pozajelitowo najprawdopodobniej przechodził z naczyń krwionośnych i wywierał cytotoksyczny wpływ na badane struktury zwojów.

Neurotoksyczność glutaminianu pozostaje w związku z drogą podania, wiekiem zwierząt i dawką. Obszary mózgu zawierające naczynia włosowate okienkowate są wrażliwe na działanie glutaminianu sodu najbardziej u zwierząt neonatalnych. U zwierząt dorosłych niezbędne są wysokie dawki podane pozajelitowo (5, 30, 31). Karmienie zwierząt *ad libitum*, po odsadzeniu od matki, dietą zawierającą nawet wysoki procent glutaminianu sodu nie powoduje zmian neurodegeneracyjnych (12, 33). Podobnie, podanie diety zawierającej znaczny dodatek glutaminianu sodu gryzoniom podczas ciąży i laktacji nie powodowało zmian

w mózgu u potomstwa (28). Wiąże się to zapewne z tym, że u dorosłych osobników w warunkach fizjologicznych glutaminian jako aminokwas dostarczany z pożywieniem jest metabolizowany w jelicie cienkim i wątrobie (2, 3, 4).

Observacje za pomocą mikroskopu elektronowego ujawniły w niniejszych badaniach największe zmiany w mitochondriach neuronów zwojowych i komórkach satelitowych, przejawiających się obrzmieniem tych organelli i utratą grzebieni. Niniejsze obserwacje morfologiczne pozostają w zgodności z badaniami biochemicznymi Bawari i wsp. (1), w których wykazano istotny wzrost aktywności dehydrogenazy mleczanowej w obszarach mózgu wrażliwych na działanie glutaminianu w wyniku jego pozajelitowego podania szczurom doświadczalnym. Zaburzenia struktury mitochondriów można łączyć z zaburzeniami metabolizmu tlenowego, a wzrost aktywności dehydrogenazy mleczanowej wskazuje na przewagę metabolizmu glikolitycznego.

W OUN w warunkach fizjologicznych glutaminian jako pobudzający aminokwasowy neuroprzekaźnik jest metabolizowany przez komórki glejowe astrocyty, po jego uwolnieniu z zakończeń glutamatergicznych. W wypustkach astrocytów otaczających synapsy glutamatergiczne zlokalizowany jest enzym syntetaza glutaminianowa, przy udziale której glutaminian jest przekształcany w glutaminę nie będącą neuroprzekaźnikiem, co chroni neurony przed nadmiernym pobudzeniem (6, 11).

W badanych zwojach rdzeniowych komórkom glejowym satelitowym przypisuje się zdolność wychwytu (27) i metabolizowania glutaminianu dzięki zawartości enzymu syntetazy glutaminianowej (10), co upodabnia ich rolę do roli astrocytów OUN. Obserwowane zmiany w badaniach własnych w neuronach zwojowych i towarzyszących im komórkach glejowych satelitowych wskazują na niewydolność tych komórek glejowych w metabolizowaniu glutaminianu w warunkach jego nadmiaru po dootrzewnowym podaniu. Glutaminian sodu wywierał cytotoksyczny wpływ podobnie jak w obszarach mózgu zawierających naczynia o okienkowej budowie.

Piśmiennictwo

1. Bawari M., Babu G. N., Ali M. M., Misra U. K., Chandra S. K.: Lactate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase activities in the circumventricular organs of rat brain following neonatal monosodium glutamate. *Experientia* 1993, 49, 1092-1094.
2. Bellisle E.: Glutamate and the UMAMI taste: sensory, metabolic, nutritional and behavioral considerations. A review of the literature published in the last 10 years. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1999, 23, 432-438.
3. Błasińska I.: Alergie pokarmowe – odkrywanie prawdy. *Biul. Inf. Przem. Kone. Spoż.* 1993, 2, 10-13.
4. Błasińska I., Jeżewska M.: Glutaminian sodu w świetle aktualnych badań. *Biul. Inf. Przem. Kone. Spoż.* 1996, 1, 18-19.
5. Burde R. M., Schainker B., Keyes J.: Acute effect oral and subcutaneous administration of monosodium glutamate on the arcuate nucleus of the hypothalamus in mice and rats. *Nature* 1971, 233, 58-60.
6. Deroniche A., Frotscher M.: Astroglial processes around identified glutamatergic synapses contain glutamine synthetase for transmitter degradation. *Brain Res.* 1991, 255, 346-350.

7. Fonnum F.: Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 1984, 42, 1-11.
8. Głazewski S., Danysz K.: Receptory dla aminokwasów pobudzających w ośrodkowym układzie nerwowym i ich rola w procesach plastyczności oraz toksyczności dla komórki. *Post. Biol. Kom.* 1992, 19, 145-161.
9. Gruca A., Gruca P.: Bariera krew-mózg. *Kosmos* 1990, 39, 219-240.
10. Hanani M., Maudlej N., Hrtig W.: Morphology and intercellular communication in glial cells of intramural ganglia from the guinea-pig urinary bladder. *J. Anat. Nerv. Syst.* 1999, 16, 62-67.
11. Hertz L., Dingen R., Schausboe A., Robinson S. R.: Astrocytes: Glutamate producers for neurons. *J. Neurosci. Res.* 1999, 57, 417-428.
12. Huang P. C., Lee N. Y., Wu T. J., Yn S. L., Tung T. C.: Effect of monosodium glutamate supplementation to low protein diets on rats. *Nutr. Rep. Intern.* 1976, 13, 477-487.
13. Hultstrom D., Malmgren L., Gilström D., Olson Y.: FITC – dextrans as tracers for macromolecular movements in the nervous system. *Acta Neuropathol.* 1984, 59, 53-62.
14. Jacobs J. M., MacFarlane R. M., Cavanagh J. B.: Vascular leakage in the dorsal root ganglia of the rat, studies with horseradish peroxidase. *J. Neurol. Sci.* 1976, 29, 95-107.
15. Jacobs J. M.: Penetration of systemically injected horseradish peroxidase into ganglia and nerves of the autonomic nervous system. *J. Neurocytol.* 1977, 6, 607-618.
16. Laterra J., Keep R., Betz A. L., Goldstein G. W.: Blood-brain-cerebro-spinal fluid barriers. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.* 1999, 32, 671-689.
17. Olney J. W.: Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 1969, 164, 719-721.
18. Olney J. W., Ho O. L.: Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nature* 1970, 227, 609-610.
19. Olney J. W.: Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1971, 30, 75-90.
20. Olney J. W.: Excitotoxic amino acids: research applications and safety implications. W: *Glutamic acid: Adv. Biochem. Physiol.*, wyd. L. J. Filer, Jr., I wsp. Raven Press, New York, 1979, s.287-317.
21. Pannese E.: The satellite cells of the sensory ganglia. *Adv. Anat. Embriol. Cell Biol.* 1981, 65, 1-111.
22. Pannese E., Ledda M., Arcidiacono G., Rigamonti L.: Clusters of nerve cell bodies enclosed within a common connective tissue envelope in the spinal ganglia of the lizard and rat. *Cell Tissue Res.* 1991, 264, 209-214.
23. Pannese E., Rigamonti M., Ledda M., Arcidiacono G.: Pericaryal projections of spinal ganglion neurons: quantitative differences between membrane domains in contact with different microenvironments. *J. Anat.* 1994, 185, 497-502.
24. Pannese E., Procacci P., Ledda M.: Ultrastructural localization of actin in the cell body of rat spinal ganglion neurons. *Anat. Embriol.* 1996, 194, 527-531.
25. Petralia R. S., Yoktani N., Wenthold R. J.: Light and electron microscope distribution of the NMDA receptor subunit NMDA 1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody. *J. Neurosci.* 1994, 14, 667-696.
26. Sato K., Kiyama H., Park H. T., Tohyama M.: AMPA, KA and NMDA receptors are expressed in the rat DRG neurons. *NeuroReport* 1993, 4, 1263-1265.
27. Schon F., Kelly J. S.: Autoradiographic localization of [³H] glutamate over satellite glial cells. *Brain Res.* 1974, 66, 275-288.
28. Semprini M. E., Conti L., Ciofi-Luzzatto A., Mariani A.: Effect of oral administration of monosodium glutamate [MSG] on the hypothalamic arcuate region of rat and mouse: A histological assay. *Biomedicine* 1974, 21, 398-403.
29. Stoyanova I., Dandov A., Lazarow N., Chouchkov C.: GABA- and glutamate-immunoreactivity in sensory ganglia of cat: a quantitative analysis. *Arch. Physiol. Bioch.*, 1998, 106, 362-369.
30. Takasaki Y.: Studies on brain lesion by administration of monosodium L-glutamate to mice. I. Brain lesions in infant mice caused by administration of monosodium L-glutamate. *Toxicology* 1978, 9, 293-305.
31. Takasaki Y., Matsuzawa Y., Iwata S., O'hara Y., Yonetani S., Ichimura M.: Toxicological studies of monosodium L-glutamate in rodents: relationship between routes of administration and neurotoxicity. W: *Glutamic acid: Adv. Biochem. Physiol.*, wyd. L. J. Filer, Jr., I wsp. Raven Press, New York 1979, s.255-275.
32. Turcki W., Kleinrok Z.: Aminokwasy pobudzające w przekaźnictwie synaptycznym. *Kosmos* 1993, 42, 309-320.
33. Wen C. P., Hayes K. C., Gershoff S. N.: Effects of supplementation of monosodium glutamate on infant monkeys, weanling rats and suckling mice. *Am. J. Clin. Nutr.* 1973, 26, 803-813.