

# Ocena wpływu pozajelitowego podania glutaminianu sodu na struktury zwojów rdzeniowych i kory czołowej dorosłych szczurów

REGINA CYBULSKA, JADWIGA JAWORSKA-ADAMU, MAŁGORZATA KALINOWSKA

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

Cybulska R., Jaworska-Adamu J., Kalinowska M.

## Evaluation of peritoneal application of sodium glutamate on the dorsal root ganglia and frontal cortex of adult rats

### Summary

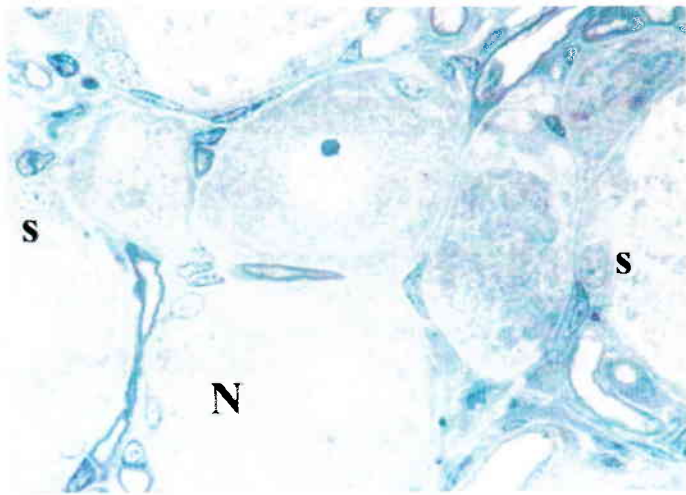
The aim of the study was to investigate the influence of sodium glutamate applied five times peritoneally in 1g/kg body weight doses on the morphological structures of the lumbar region (L<sub>1</sub>-L<sub>5</sub>) dorsal root ganglia and frontal cortex of adult (3-months old) Wistar rats. Semi thin slides taken from dorsal root ganglia and frontal cortex samples were assessed under a light microscope and ultra thin slides were examined under an electron microscope. No changes were observed in the frontal cortex but were evident in the dorsal root ganglia. These changes took the form of mitochondrial swelling and loss of mitochondrial cristae in ganglia neurons and the surrounding satellite cells. The results suggest the cytotoxic influence of peritoneally applied sodium glutamate.

**Keywords:** sodium glutamate, frontal cortex, dorsal root ganglia, cytotoxicity

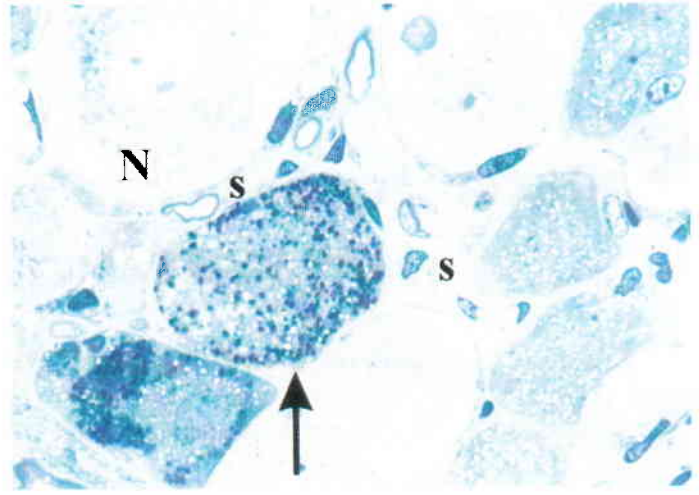
Glutaminian jest głównym pobudzającym neuroprzebieżnikiem ośrodkowego układu nerwowego (OUN) ssaków. Podczas rozwoju mózgu jako czynnik neurotroficzny wpływa na migrację neuronów, wydłużanie ich wypustek oraz synaptogenezę (2, 19), a postnatalnie włączony jest w uczenie i zapamiętywanie (6). Uwolniony z neuronów glutamatergicznych wychwytywany jest do neuronów i bardziej intensywnie do astrocytów. Wychwycony do neuronów służy ponownie jako neuroprzebieżnik. Wychwycony do astrocytów metabolizowany jest do glutaminy przy udziale syntetazy glutaminianowej zlokalizowanej w wypustkach tych komórek otaczających synapsy glutamatergiczne. Glutamina uwolniona z astrocytów powraca do neuronów i służy jako substrat do ponownej syntezy neuroprzebieżnika (8, 13). W warunkach fizjologicznych ogranicza to działanie glutaminianu, chroniąc neurony przed nadmiernym pobudzeniem postsynaptycznych receptorów glutamatergicznych i jego neurotoksycznym działaniem (31). Nadmierne stężenie glutaminianu w przestrzeni pozakomórkowej prowadzi do zmian neurodegeneracyjnych i może odgrywać rolę w wielu stanach patologicznych OUN (18, 26). W wychwyty i regulację pozakomórkowego stężenia glutaminianu włączone są białkowe glejowe i neuronalne transportery różniące się rozmieszczeniem w OUN (16). Głównymi glejowymi transporterami glutaminianu zlokalizowanymi w astrocytach są

GLAST (L-glutamate/L-aspartate transporter) i GLT (L-glutamate transporter) (11, 27).

Zwoje rdzeniowe stanowią pomost pomiędzy obwodowo unerwionymi tkankami a rdzeniem kręgowym. Każdy neuron zwoju rdzeniowego oddzielony jest od sąsiedniego otoczką utworzoną z glejowych komórek satelitowych (24). Sądzi się, że podobnie jak neurony glutamatergiczne OUN, neurony zwojów rdzeniowych włączone są w transmisję glutamatergiczną. Przemawiają za tym immunohistochemiczne badania, w których ujawniono, że neurony te i towarzyszące im komórki satelitowe wykazują immunoreaktywność dla glutaminianu (17). Neurony zwojowe uwalniają glutaminian (15, 28), który wychwycony przez glejowe komórki satelitowe przekształcany jest do glutaminy. Glutamina powraca do neuronów zwojowych i metabolizowana jest w ich perikarionach do glutaminianu (10). Glejowe komórki satelitowe wyrażają ekspresję transportera GLAST (5), co sugeruje istnienie neuronalno-glejowego cyklu metabolizmu glutaminianu. Zwoje rdzeniowe zaliczane są do obszarów nie posiadających bariery krew-nerw. Obserwacje te zostały uzyskane przez podanie do krążenia zwierzętom doświadczalnym różnych znaczników, które następnie znajdowano w parenchymie zwojów lub nawet w obrębie wąskiej szczeliny oddzielającej neurony od ich otoczki utworzonej z glejowych komórek satelitowych. Jednocześnie wykazano, że znaczniki te



Ryc. 1. Fragment zwoju rdzeniowego 3-miesięcznego szczura z gr. kontrolnej; N – neuron zwojowy; s – komórki satelitowe (pow. 1200 ×)



Ryc. 2. Fragment zwoju rdzeniowego 3-miesięcznego szczura z gr. doświadczalnej; N – neuron o większej średnicy nie wykazujący zmian; neurony o mniejszej średnicy (↑) z nagromadzonymi ziarnistościami i wakuolami; s – zwakuolizowane komórki satelitowe (pow. 1200 ×)

nie przechodzą poza naczynia włosowate w obszarach mózgowia zaopatrzonych w barierę krew–mózg (1, 3, 9, 14). Badania wielu autorów dowiodły, że glutaminian bądź glutaminian sodu podane pozajelitowo zwierzętom doświadczalnym wywierają cytotoksyczny wpływ na neurony obszarów okołokomorowych mózgowia pozbawionych bariery krew–mózg (20–23, 30).

Wcześniejsze badania własne (7) wykazały, że podany pozajelitowo glutaminian sodu neonatalnym (5-dniowym) szczurom powodował wakuolizację neuronów zwojów rdzeniowych i towarzyszących im glejowych komórek satelitowych. Sugerowały one, że glutaminian sodu mógł przechodzić poza obręb naczyń włosowatych i wywierał destrukcyjny wpływ na te dwa typy komórek. Astrocyty OUN i komórki glejowe satelitowe są w podobny sposób włączone w metabolizm glutaminianu. Interesujące wydaje się prześledzenie wpływu: glutaminianu sodu u dorosłych (3-miesięcznych) szczurów na neurony i komórki glejowe zwojów rdzeniowych oraz na neurony i astrocyty kory czołowej oraz porównanie wpływu glutaminianu sodu na struktury tych dwu obszarów – zwojów rdzeniowych nie posiadających bariery krew–nerw i kory czołowej obszaru mózgowia, w którym istnieje bariera krew–mózg (12).

### Material i metody

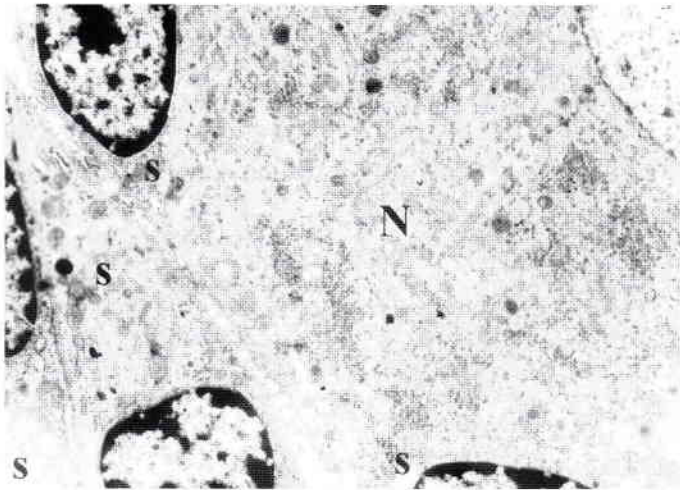
Doświadczenie przeprowadzono na 3-miesięcznych szczurach białych Wistar obydwu płci. Grupę kontrolną stanowiło 7 zwierząt, którym dootrzewnowo podawano przez 5 kolejnych dni roztwór 1 ml PBS. Grupa doświadczalna (7 szczurów) otrzymywała przez 5 kolejnych dni dootrzewnowo glutaminian sodu czysty (Ubichem Ltd Hampshire) w dawce 1 g/kg m.c. Po 3 dniach od ostatniej iniekcji w narkozie przy użyciu ketaminy (30 mg/kg m.c.) dokonano perfuzji dosercowej u zwierząt obydwu grup roztworem 2% paraformaldehydu i 2,5% glutaraldehydu w 0,1 M buforze kakodylowym o pH 7,4. Zwierzęta dekapitowano i pobierano próbki kory czołowej, które utrwalano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej w płynie o tym samym składzie, jak roztwór perfuzyjny. W tym sa-

mym czasie w celu pobrania zwojów rdzeniowych z fragmentów kręgosłupa odcinka lędźwiowego szybko usuwano wyrostki kolczyste, odsłaniając rdzeń kręgowy po stronie dogrzbietowej, po czym utrwalano je przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, tak samo jak próbki kory czołowej. Następnie preparowano zwoje rdzeniowe odcinka lędźwiowego L<sub>1</sub>-L<sub>4</sub>, które dotrwalano w płynie o powyższym składzie. Z pobranego materiału wykonano preparaty półcienkie do obserwacji w mikroskopie świetlnym barwione 1% błękitem metylenowym z 1% azurem II w roztworze czteroboranu sodu oraz ultracienkie do obserwacji w mikroskopie elektronowym (ME).

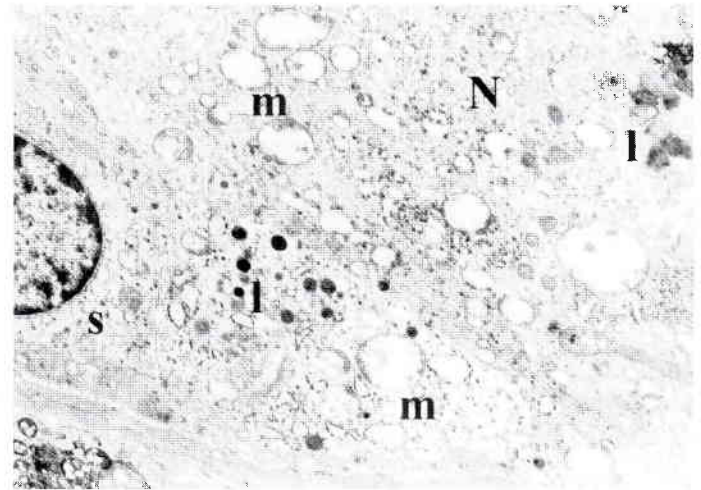
### Wyniki i omówienie

W zwojach kręgowych pochodzących od zwierząt grupy kontrolnej na skrawkach półcienkich obserwowano charakterystyczny wzajemny układ neuronów i towarzyszących im komórek satelitowych (ryc. 1). Niektóre neurony zwojowe i glejowe komórki satelitowe zwierząt grupy doświadczalnej posiadały zwakuolizowaną cytoplazmę, inne wakuole i nagromadzenie intensywnie wybarwionych ziarnistości. Najczęściej zmiany dotyczyły neuronów o mniejszej średnicy, natomiast większe posiadały zachowaną prawidłową strukturę (ryc. 2). Obserwacje te zostały potwierdzone badaniem skrawków ultracienkich w ME. Neurony zwojów rdzeniowych zwierząt grupy kontrolnej i otaczające je komórki satelitowe charakteryzowała prawidłowa wewnątrzkomórkowa struktura (ryc. 3). W zwojach zwierząt grupy doświadczalnej zarówno w neuronach, jak i komórkach satelitowych obserwowano obrzęk mitochondriów i utratę ich grzebieni oraz liczne lizosomy w cytoplazmie obydwu typów komórek (ryc. 4). Obrzmiałe mitochondria odpowiadały licznym wakuolom, a lizosomy ziarnistością obserwowanym na poziomie mikroskopu świetlnego na skrawkach półcienkich. Na preparatach uzyskanych z kory czołowej zwierząt grup kontrolnej i doświadczalnej neurony i astrocyty wykazywały podobną prawidłową strukturę. Mitochondria posiadały owalny kształt i dobrze za-

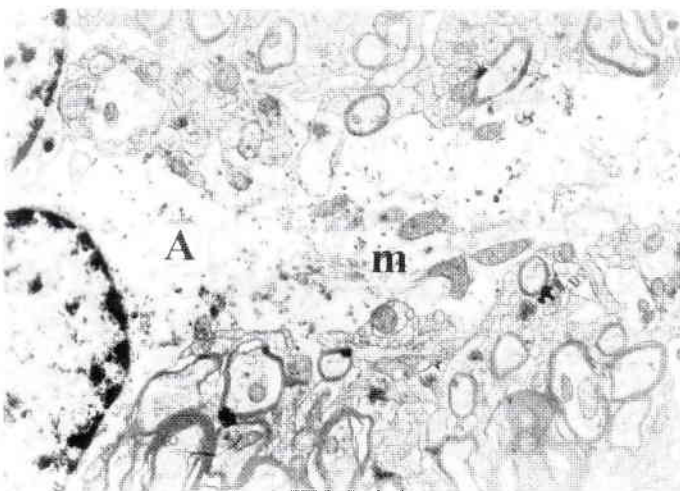




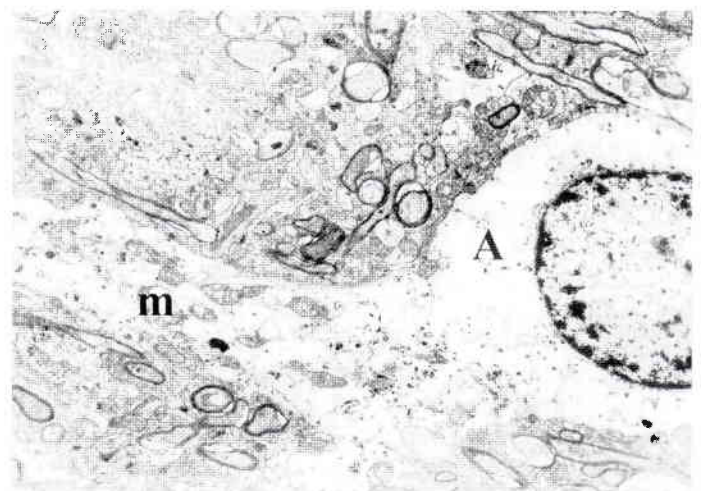
Ryc. 3. Elektronogram neuronu zwojowego – N i komórek satelitowych – s 3-miesięcznego szczura z gr. kontrolnej (pow. 12 000 ×)



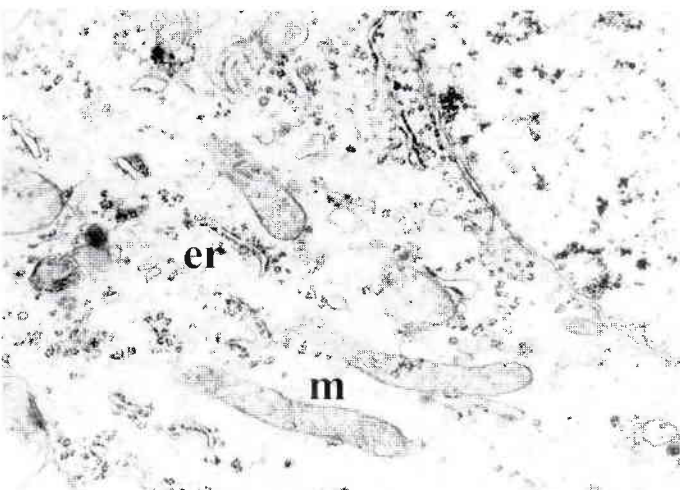
Ryc. 4. Elektronogram neuronu zwojowego – N i komórki satelitowej – s 3-miesięcznego szczura z gr. doświadczalnej; m – zmienione mitochondria; l – lizosomy (pow. 12 000 ×)



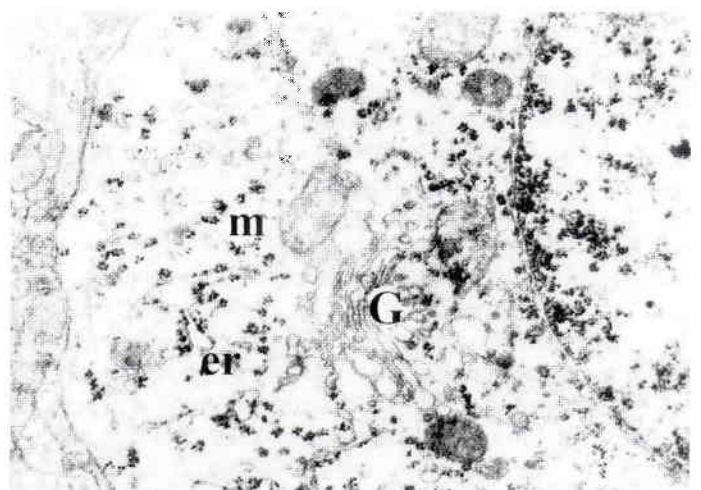
Ryc. 5. Elektronogram astrocytu – A z kory czołowej 3-miesięcznego szczura z gr. kontrolnej; m – mitochondria (pow. 12 000 ×)



Ryc. 6. Elektronogram astrocytu – A z kory czołowej 3-miesięcznego szczura z gr. doświadczalnej; m – mitochondria (pow. 12 000 ×)



Ryc. 7. Elektronogram neuronu z kory czołowej 3-miesięcznego szczura z gr. kontrolnej; er – ergastoplazma; m – mitochondria (pow. 12 000 ×)



Ryc. 8. Elektronogram neuronu z kory czołowej 3-miesięcznego szczura z gr. doświadczalnej; er – ergastoplazma; G – aparat Golgiego; m – mitochondrium (pow. 12 000 ×)

chowane grzebienie i podobnie prawidłową strukturę wykazywały inne organelle komórkowe w obydwu typach komórek (ryc. 5-8).

Wyniki badań mikroskopowych wyraźnie wskazują na zmiany w neuronach zwojowych oraz komórkach glejowych satelitowych i brak zmian w neuronach i astrocy-



tach kory czołowej zwierząt doświadczalnych po dootrzewnym podaniu glutaminianu sodu. Zmiany miały podobny charakter do występujących w neuronach zwojowych i komórkach satelitowych neonatalnych (5-dniowych) szczurów po dootrzewnym podaniu glutaminianu sodu we wcześniejszych badaniach własnych (7). Są one najprawdopodobniej morfologicznym wyrazem cytotoksycznego działania glutaminianu sodu i pośrednio przemawiają za jego przechodzeniem poza obręb naczyń krwionośnych w badanych zwojach rdzeniowych. Dzięki obecności bariery krew–mózg nie ujawniły się one w badanych strukturach kory czołowej (3). Jest to zgodne z wynikami innych autorów (32), którzy wykazali, że podanie glutaminianu dorosłym szczurom dożylnie powoduje wakuolizację neuronów mózgu po uprzednim uszkodzeniu bariery krew–mózg. *In vitro* autoradiograficznie i chromatograficznie wykazano, że glejowe komórki satelitowe zwojów rdzeniowych szczura posiadają zdolność wychwytu [3H] glutaminianu i przekształcania go do [3H] glutaminy, która w perikarionach neuronów zwojowych była metabolizowana do [3H] glutaminianu. Wykazano także, że neurony zwojowe o mniejszej średnicy akumulowały sześciokrotnie więcej znakowanej glutaminy aniżeli neurony o większej średnicy (10).

Astrocyty OUN wyrażają ekspresję transporterów glutaminianu GLT i GLAST, które regulują fizjologiczne pozakomórkowe stężenie glutaminianu na drodze zależnego od Na<sup>+</sup> jego transportu do astrocytów (25). Dodanie glutaminianu do hodowli komórkowej znacznie zwiększa ekspresję astrocytarnego transportera GLAST (27, 29). Glejowe komórki satelitowe zwojów rdzeniowych wykazują ekspresję jedynie transportera GLAST (5). W niniejszych badaniach zmiany obserwowano w neuronach zwojowych o mniejszej średnicy, które mają większą zdolność do akumulacji glutaminy, a tym samym metabolizowania glutaminianu. Obecność tych zmian, być może, pozostaje w związku ze zwiększonym transportem glutaminianu za pośrednictwem transportera GLAST do komórek satelitowych, których zdolność metabolizowania tego aminokwasu wskutek jego nadmiaru mogła być niewystarczająca i pewna część niemetalizowanego glutaminianu mogła wywierać cytotoksyczny wpływ na neurony zwojowe i komórki satelitowe. Zaburzenie struktury mitochondriów obserwowane w strukturach zwojów rdzeniowych może zaburzać metabolizm tlenowy. Sugestię tę potwierdzają badania Bawari i wsp. (4), w których opisano istotny wzrost aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w obszarach okołokomorowych mózgowia w wyniku pozajelitowego podania glutaminianu szczurom doświadczalnym. Na podstawie przeprowadzonego doświadczenia nie można określić, jak długo utrzymują się obserwowane zmiany i czy są one uszkodzeniami trwałymi, gdyż wymaga to dalszych badań w odpowiednich przedziałach czasowych od zaprzestania podawania glutaminianu sodu.

### Piśmiennictwo

- Allen D. T., Kiernan J. A.: Permeation of proteins from the blood into peripheral nerves and ganglia. *Neurosci.* 1994, 59, 755-764.
- Aruffo C., Ferszt R., Hildebrandt A. G., Cervos-Navarro J.: Low doses of  $\alpha$ -monosodium glutamate promote neuronal growth and differentiation in vitro. *Dev. Neurosci.* 1987, 9, 228-239.

- Azzi G., Bernardin J.-F., Bouchand C., Bellon B., Fleury-Feith J.: Permeability of the normal rat brain, spinal cord and dorsal root ganglia microcirculations to immunoglobulins G. *Biol. Cell* 1990, 68, 31-36.
- Bawari M., Babu G. N., Ali M. M., Misra U. K., Chandra S. V.: Lactate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase activities in the circumventricular organs of rat brain following neonatal monosodium glutamate. *Experientia* 1993, 49, 1092-1094.
- Berger U. V., Hediger M. A.: Distribution of the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in rat circumventricular organs, meninges, and dorsal root ganglia. *J. Comp. Neurol.* 2000, 421, 385-399.
- Bliss T. V., Collingridge G. L.: A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993, 361, 31-39.
- Cybulska R., Jaworska-Adamu J., Czerny K., Mszczak-Dzidosz E.: Wpływ glutaminianu sodu na neurony i glejowe komórki satelitowe zwojów rdzeniowych neonatalnych szczurów. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 255-258.
- Deroniche A., Frotscher M.: Astroglial processes around unidentified glutamatergic synapses contain glutamine synthetase for transmitter degradation. *Brain Res.* 1991, 552, 346-350.
- Devor M.: Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. *Pain Suppl.* 1999, 6, 27-35.
- Duce I. R., Keen P.: Selective uptake of [3H] glutamine and [3H] glutamate into neurons and satellite cells of dorsal root ganglia in vitro. *Neurosci.* 1983, 8, 861-866.
- Furuta A., Rothstein J. D., Martin L. J.: Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J. Neurosci.* 1997, 17, 8363-8375.
- Gruca A., Gruca P.: Bariera krew–mózg. *Kosmos* 1990, 39, 219-240.
- Hertz L., Dingen R., Schousboe A., Robinson S. R.: Astrocytes: Glutamate producers for neurons. *J. Neurosci. Res.* 1999, 57, 417-428.
- Jacobs J. M., MacFarlane R. M., Cavanagh J. B.: Vascular leakage in the dorsal root ganglia of the rat, studied with horseradish peroxidase. *J. Neurol. Sci.* 1976, 29, 95-107.
- Jahr C. E., Jessell T. M.: Synaptic transmission between dorsal root ganglion and dorsal horn neurons in culture: antagonisms of monosynaptic excitatory postsynaptic potentials and excitation by kynurenate. *J. Neurosci.* 1985, 5, 2281-2289.
- Kanai Y., Hediger M.: Primary structure and functional characterization of a high affinity glutamate transporter. *Nature* 1992, 360, 467-471.
- Keast J. R., Stephenson T. M.: Glutamate and aspartate immunoreactivity in dorsal root ganglion cells supplying visceral and somatic targets and evidence for peripheral axonal transport. *J. Comp. Neurol.* 2000, 424, 577-587.
- Meldrum B., Grathwaite J.: Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 1990, 11, 379-387.
- Mount H. T., Dreyfus C. F., Black I. B.: Purkinje cells survival is differentially regulated by metabotropic and ionotropic excitatory amino acid receptors. *J. Neurosci.* 1993, 13, 3173-3179.
- Olney J. W.: Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 1969, 164, 719-721.
- Olney J. W.: Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1971, 30, 75-90.
- Olney J. W., Ho O. L.: Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nature* 1970, 227, 609-610.
- Oser B. L., Carlson S., Vogin E. E., Cox G. E.: Oral and subcutaneous administration of monosodium glutamate to infant rodents and dogs. *Nature* 1971, 229, 411-413.
- Pannese E., Procacci P., Berti E.: The pericaryal surface of spinal ganglion neurons: differences between domains in contact with satellite cells and in contact with the extracellular matrix. *Anat. Embryol.* 1999, 199, 199-206.
- Perego C., Vanoni C., Bossi M., Massari S., Basudev H., Longhi R., Pietrini G.: The GLT-1 and GLAST glutamate transporters are expressed on morphologically distinct astrocytes and regulated by neuronal activity in primary hippocampal cocultures. *J. Neurochem.* 2000, 75, 1076-1084.
- Perry T. L., Hansen S.: What excitation kills striatal neurons in Huntington's disease? Clues from neurochemical studies. *Neurology* 1990, 40, 20-24.
- Poiry-Yamate C. L., Vutskis L., Rauven T.: Neuronal-induced and glutamate-dependent activation of glial glutamate transporter function. *J. Neurochem.* 2002, 82, 987-997.
- Rydh-Rinder M., Kerecs N., Svensson M., Holkfelt T.: Glutamate release from adult primary sensory neurons in culture is modulated by growth factors. *Regul. Pept.* 2001, 102, 69-79.
- Schlag B. D., Vondrasek J. R., Munir M., Kalandadze A., Zelenia O. A., Rothstein J. D., Robinson M. B.: Regulation of the glial Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transporters by cyclic AMP analogs and neurons. *Mol. Pharm.* 1998, 53, 355-369.
- 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.
- Turski W., Kleinkrok Z.: Aminokwasy pobudzające w przekaźnictwie synaptycznym. *Kosmos* 1993, 42, 309-320.
- Westergren I., Nordborg C., Johansson B. B.: Glutamate enhances brain damage and albumin content in cerebrospinal fluid after intracarotid protamine infusion. *Acta Neuropathol.* 1993, 85, 285-290.

Adres autora: prof. dr hab. Regina Cybulska, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin