

UTICAJ NEONATALNOG TRETMANA
MONONATRIJUM GLUTAMOM NA TIREOIDNU
ŽLEZDU PACOVA



Autori:

Ivan Rančić¹, Dejan Sibinović¹, Marija Mihajlović¹

Mentori: Prof. dr Vladmila Bojanić², Prof. dr Gorana Rančić³

¹ Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu; ² Institut za patofiziologiju; ³ Institut za histologiju i embriologiju;

SAŽETAK

Mononatrijum-glutamat (MNG) je aditiv u prehrambenoj industriji. Ranija istraživanja su pokazala toksične MNG efekte na neurone, pankreas, nadbubrežne žlezde, neuroendokrinu regulaciju itd. Istraživanja morfoloških MNG promena na tireoidnoj žlezdi su malobrojna i uglavnom se bave uticajem MNGa na hipotalamo-hipofizo-tireoidnu osovinu.

Cilj ovog eksperimentalnog istraživanja BIO je da utvrdi morfološke promene na tireoidnoj žlezdi kod odraslih pacova tretiranih MNGom u neonatalnom periodu.

Za eksperiment je korišćeno 40 pacova oba pola Wistar soja podeljenih u 4 grupe. Kontrolnim (K) grupama aplikovan je 0,9% vodeni rastvor natrijum hlorida, a tretiranim (MNG) grupama mononatrijum-glutamat (4 mg/g telesne mase) drugog, četvrtog, šestog, osmog i desetog dana postnatalno. Životinje su posle dva meseca žrtvovane, pošto su uvedene u anesteziju i uzete su tireoidne žlezde. Organi su histološki obrađeni. Preparati su sečeni i bojeni histohemijskim metodama: HE, Van Gieson i ABC metodom na tiroglobulin.

Pacovi MNG grupa pokazuju iregularnost u obliku folikula, promene u dimenzijama folikula (uvećanje ili smanjenje) i folikulskom epitelu, koji je pločastog do cilindričnog oblika. Folikuli pokazuju promene u vidu znakova adenoma. Tireociti epitela pokazuju znake pseudostartifikacije, promene polariteta i povećane mitoze jedara, onkocitne i atrofijske transformacije. Koloid je heterogene zastupljenosti sa znacima aktivne resorpcije. Stroma pokazuje znake proliferacije i limfocitne infiltracije. Krvni sudovi strome pokazuju znake prepunjenosti.

Ispitivana doza MNG uzrokuje morfološke promene na tireoidnoj žlezdi. Dolazi do promena u morfologiji tireocita, folikula, stromi, krvnim sudovima i koloidu. Nađene morfološke promene potvrđuju štetne efekte MNGa na tireoidnu žlezdu pacova.

Ključne reči: mononatrijum-glutamat, tireoidna žlezda, morfološke promene

UVOD

Mononatrijum glutamat (MNG) je prehrambeni aditiv koji se široko koristi u industriji hrane i farmaceutskoj industriji. MNG je poznat i pod nazivima: Umami taste, Chinese seasoning, monosodium

glutamate, natrii glutamas, E-621 i dr. To je beli, kristalni prah, belančevinastog mirisa i ukusa mesa. Koncentracija glutaminske kiseline u MNGu je velika (u 128 g MNG je 100 g glutaminske kiseline). Lako je



rastvorljiv u vodi i delimično rastvorljiv u alkoholu (1).

MNG je prvi put privukao pažnju medicinske javnosti 1968. godine, kada je objavljeno zapažanje da određeni začini u kineskoj kuhinji izazivaju različite simptome: žarenje, palpitacije i opštu slabost. Uskoro su usledila brojna istraživanja koja su pokazala štetnost i toksičnost MNGa (2,4-5,8-9,15-19,22).

Otkriveno je da toksičnost MNGa potiče od glutamata (L-glutamata). Glutamat je jedan od najznačajnijih ekscitacijskih neurotransmitera u CNS-u sisara. On ekscitira neurone u mozgu putem otvaranja jonskih kalcijumskih (Ca^{2+}) kanala (3-7,10-11,16).

Utvrđeno je da glutamat u velikim koncentracijama ima ekscitotoksično dejstvo, jer dolazi do neurodegenerativnih poremećaja i nekroze neurona usled njihove prejake ekscitacije (3,5,15-16).

Glutamat se vezuje za receptore koji su podeljeni u dve vrste: jonotropske i metabotropske. Jonotropski receptori su NMDA (N-metil-D-aspartat), AMPA α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoaksol) i kainiski receptori. Oni funkcionišu putem otvaranja i influksa Ca^{2+} jona u ćeliju. Metabotropni receptori deluju putem fosfolipaze i adenil ciklaze udruženih sa sekundarnim glasnicima (3,5-7,9-12,16).

Istraživanja pokazuju da MNG aplikovan kod pacova izaziva lezije u hipotalamusu, cirkumventrikularnim organima, retini, kao i u parenhimatoznim organima, kao što su bubreg, jetra, nadbubreg, pankreas i slezina (5,8,9,14). Aplikacija MNGa dovodi do lezije nukleusa arcuatusa i nukleusa ventromedijalisa, a kao posledica dolazi do neuroendokrinih poremećaja kao što su: zastoj u rastu, gojaznost, sterilitet, redukcija mase adenohipofize, poremećaja funkcionisanja hipotalamo-hipofizo-endokrine osovine (14,16-19,22-23). Nađeno je da se menjaju nivoi većine hormona, dolazi do

značajnog porasta sekrecije insulina, promena u koncentraciji adrenalnih hormona, promena u njihovoj regulaciji prilikom reakcije na stres, kao i do morfoloških i funkcionalnih promena na jetri, bubrezima, pankreasu, nadbubrezima, retini, hipotalamusu itd (8,15,18,19,22,36).

Istraživanja na bazi morfoloških promena na tireoidnoj žlezdi nisu brojna. Mnoga istraživanja sa MNGom imaju za predmet izučavanja, pre svega, njegov uticaj na hipotalamo-hipofizo-tireoidnu osovinu. Najveći deo tih istraživanja se bavi fiziološkim promenama izazvanim MNG uticajem na delove ove osovine, pretežno na hipotalamus i hipofizu, kao i na sekreciju tireodnih hormona. Mehanizmi koji dovode do promena u tireoidnoj žlezdi su složeni, jos uvek nerazjašnjeni, ali postoji veliki broj radova koji su u nekim delovima međusobno kontradiktorni i koji potenciraju primarnu ulogu hipotalamo-hipofizo-tireodne osovine u nastanku promena na samoj tireoidnoj žlezdi. Međutim, istraživanja kod drugih organa su pokazala multifaktorsku patogenezu promena na tim organima i treba ostaviti prostora za multifaktorsko objašnjenje mehanizma nastanka promena na tireoidnoj žlezdi (26-38).

CILJ RADA

Ovo ispitivanje je deo kompleksnijeg istraživanja, koje ima za cilj proučavanje i utvrđivanje efekata MNGa na organizam, mehanizama njegovog delovanja, nastanka promena na pojedinim organima, mogućnosti sprečavanja njegove toksičnosti i terapijskog tretmana u slučaju evidentiranih promena.

Cilj ovog istraživanja bio je da utvrdi koje se morfološke i patohistološke promene javljaju na tireodnoj žlezdi odraslih pacova Wistar soja nakon tretmana u neonatalnom periodu mononatrijum glutamatom.



MATERIJAL I METODE

Istraživanje ima karakter eksperimentalne studije. Istraživanje je urađeno na pacovima Wistar soja oba pola. Životinje su bile podeljene u četiri grupe i to u:

- kontrolnu grupu ženskog pola;
- tretiranu grupu ženskog pola;
- kontrolnu grupu muškog pola;
- tretiranu grupu muškog pola.

U svakoj grupi bilo je po deset jedinki. Životinjama su subkutano, interskapularno, u toku prvih deset dana života, svakog drugog dana (drugog, četvrtog, šestog, osmog i desetog dana) aplikovani:

- kontrolnim (K) grupama - 0,9% vodeni rastvor natrijum hlorida;
- tretiranim (MNG) grupama - mononatrijum glutamat u dozi od 4 mg/g telesne mase (t.m.).

Nakon četiri nedelje životinje su odvojene od majki i dobijale hranu za pacove Veterinarskog zavoda Zemun. Hranjene su i pojene *ad libitum*. Kontrolisana je temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) i svetlost prostorije.

Životinje su žrtvovane posle dva meseca. Uvedene su u anesteziju sa pentobarbiton natrijumom (40 mg/kg t.m., intraperitonealno). Svi protokoli za ovu studiju su izvedeni u skladu sa svim etičkim principima.

Tkivo pankreasa je fiksirano u Bouin–ovom rastvoru, dehidrirano, prosvetljeno i impregnirano i ukalupljeno u parafin, a potom su pripremljeni preseki za određene histohemijske metode.

Za mikromorfološka ispitivanja uzoraka korišćene su histološke i histohemijske metode bojenja:

1. klasična hematoksilin–eozin (HE) metoda¹³,

2. Van Giesonova metoda za vezivno tkivo¹³,

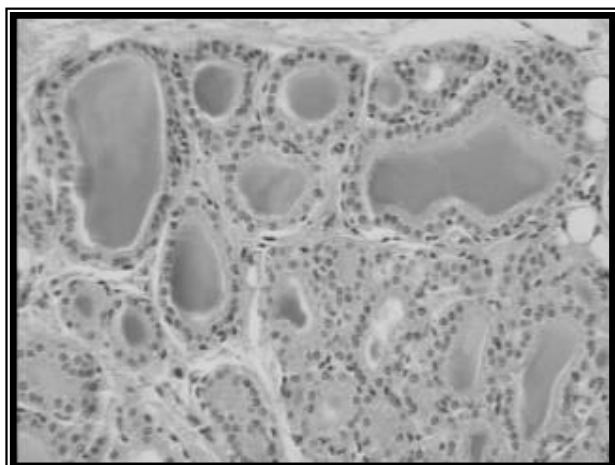
3. imunohistohemijska ABC metoda na tiroglobulin¹⁴.

U tretmanu životinja su korišćene hemikalije *pro analysi* hemijske čistoće: mononatrijum glutamat ("Wako", Japan), pentobarbitol natrijum ("Abbot", Velika Britanija) i antitela DAKO firme.

REZULTATI

Disekcijom pacova kontrolnih grupa, makroskopski se uočava tireoidna žlezda normalne veličine, bez vidljivih promena, sa normalnom zastupljenošću masnog tkiva oko nje. Na histološkim preparatima kontrolnih grupa vidi se tkivo tireoidne žlezde jasne i uobičajne građe i veličine. Na njima se jasno razlikuju folikuli, kao osnovne gradivne jedinice tireoidne žlezde sa svim njihovim elementima (tireocitima i intrafolikularnim kolidom). Na svim preparatima kontrola vezivno tkivo tireoidne žlezde (kapsula i interfolikularno vezivno tkivo) je normalne morfologije i zastupljenosti, bez znakova patoloških procesa.

Tireoidni folikuli su karakterističnog okruglog ili ovalnog oblika i normalne veličine. U tireoidnim folikulima se vide epitelne ćelije – tireociti, kockastog oblika, normalne veličine i rasporeda oko koloida u folikulu. Tireociti imaju bazofilno obojenu citoplazmu, u kojoj nije registrovano prisustvo granula i jedro uobičajenog oblika, prebojenosti, lokalizacije i veličine uz jasno vidljivo jedarce kod pojedinih jedara i ćelija. Na pojedinim preparatima mogu da se uoče konture svetlo prebojenih kalcitoninskih ćelija prisutnih pored tireocita folikula, ali s obzirom da nije korišćeno specifično bojenje za kalcitoninske ćelije nije se pristupilo ispitivanju njihove morfologije (Slika 1).



Slika 1. Kontrola - Tireoidna žlezda normalne morfologije (Bojenje HE; x100)

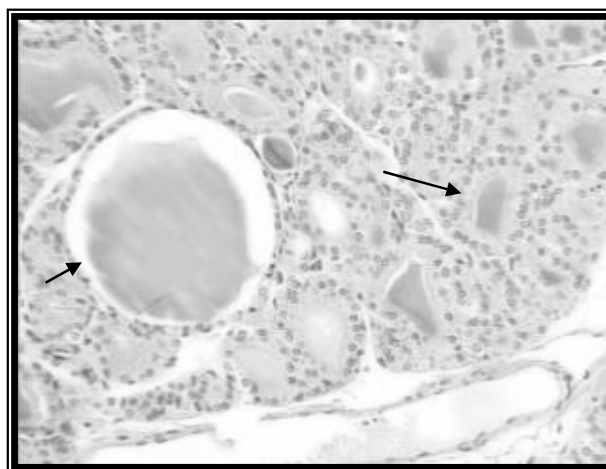
Koloid (tiroglobulin) koji je prisutan unutar folikula je normalne acidofilne prebojenosti, normalne zastupljenosti i bez znakova patoloških procesa (Slika 1).

Stroma tireoidne žlezde je normalne zastupljenosti, lokalizacije i celularne i vlaknaste građe sa prisutnim krvnim sudovima. Krvni sudovi arterijskog i venskog tipa su normalne morfologije i lumena bez promena u građi zida.

Disekcijom pacova tretiranih grupa makroskopski nađena je tireoidna žlezda nepromenjene veličine i bez vidljivih znakova promena, okružena izrazito proliferisanim masnim tkivom gotovo tečne konzistencije. Na histološkim preparatima tretiranih grupa vidi se tkivo tireoidne žlezde koje je pretrpelo značajne promene u svojoj građi. Primećuju se promene u dimenzionim parametrima tireoidnih folikula, kao i morfološke promene u gradivnim elementima tireoidnih folikula, tj. tireocitima i koloidu u odnosu na kontrole. Stroma je minimalno izmenjene morfologije, i to, pre svega, u povećanoj zastupljenosti stromalnih elemenata u odnosu na kontrole.

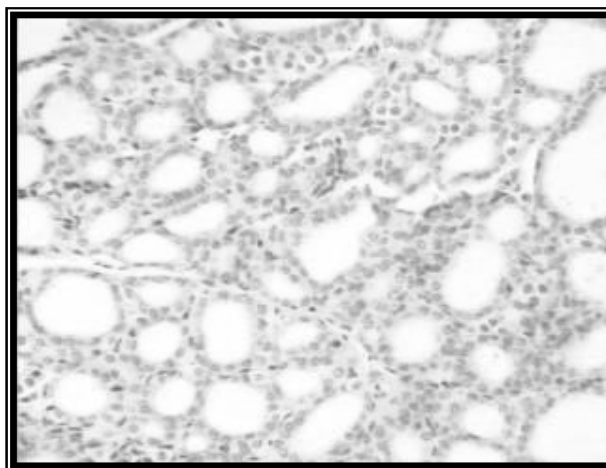
Tireoidni folikuli tretiranih grupa pokazuju heterogenost u dimenzionim parametrima, iregularnost u obliku folikula i promene u sadržaju koloida u odnosu na

tireoidne folikule kontrolnih grupa. Tireoidni folikuli centralne lokalizacije su smanjenih dimenzija, iregularnog oblika i pokazuju težnju ka uniformnošću ćelijske populacije gledano cirkumferentno. Epitel ovih folikula je kockastog ili cilindričnog oblika i sačinjen je od tireocita koji imaju veću apiko-bazalnu distancu, krupnija heterohromatična jedra sa slabo vidljivim jedarcetom u odnosu na kontrole (Slika 2).



Slika 2. Eksperiment - Tireoidni folikul sa aplatiranim epitelom (mala strelica) i sa cilindričnim epitelom (velika strelica)(Bojenje HE; x100)

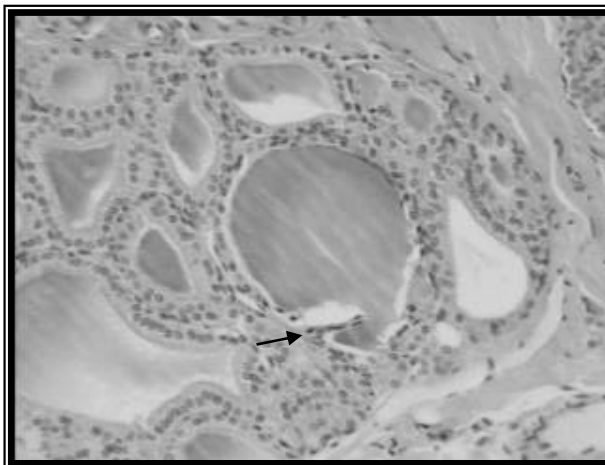
Takođe, centralni deo tkiva tireoidne žlezde tretiranih grupa pokazuje znake patoloških promena u vidu hiperplazije i formiranja adenoma u poređenju sa kontrolnim grupama (Slika 3).



Slika 3. Eksperiment - Centralni deo tkiva tireoidne žlezde koji pokazuje znake formiranja adenoma. (Bojenje HE; x100)

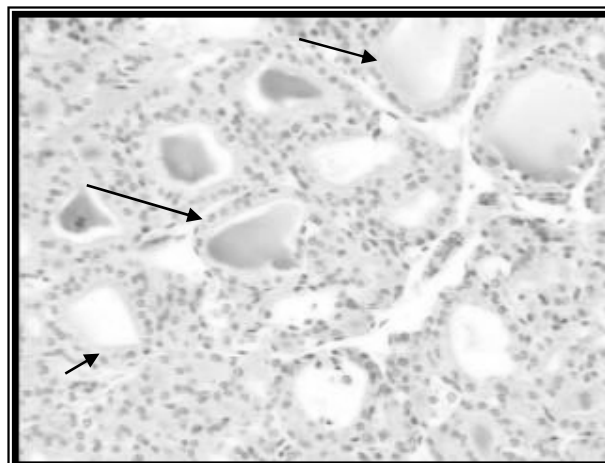


Tireoidni folikuli periferne lokalizacije su veći, iregularnog ili kružnog oblika i pokazuju veću težnju ka heterogenosti ćelijske populacije gledano cirkumferentno u odnosu na preparate kontrola. Periferni tireoidni folikuli u odnosu na kontrole imaju niskokubičan ili aplatirani epitel, što predstavlja znake koloidne strume i toksikoze, sačinjen od tireocita smanjene apiko-bazalne distance, sa prisutnim spljoštenim heterohromatičnijim jedrom i jedva vidljivim jedarcetom (Slika 2). U pojedinim tireoidnim folikulima i centralne i periferne lokalizacije se registruje psudopapilomatoza (Slika 4).



Slika 4. Eksperiment - Pojedini tireoidni folikuli pokazuju znake pseudopapilomatoze (strelica). (Bojenje HE; x100)

Folikuli eksperimentalnih grupa pokazuju promene u sadržaju koloida u vidu totalnog odsustva koloida unutar folikula kod jednih folikula, hiposekreciji koloida kod drugih folikula i očuvanosti količine koloida kod treće vrste folikula u odnosu na kontrole (Slika 5). Tireociti tireoidnih folikula pored unapred opisanih promena, generalno, pokazuju znake onkocitne transformacije, gomilanja interfolikularno distrofičnih tireocita i atrofijske transformacije u poređenju sa tireocitima tireoidnih folikula kontrolnih grupa. Tireociti eksperimentalnih grupa pokazuju znake promene polariteta jedra, povećane mitoze i pseudostartifikacije



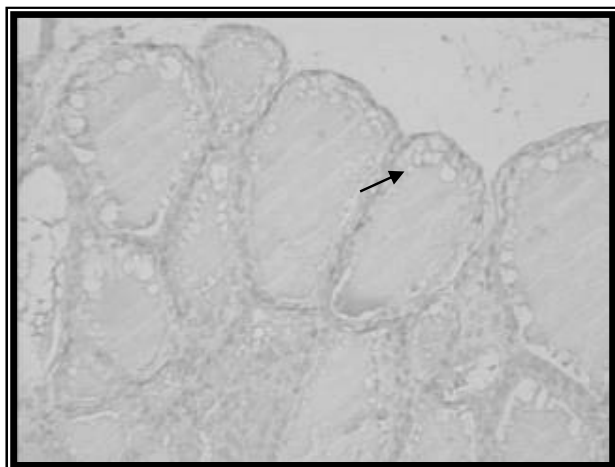
Slika 5. Eksperiment - Tireoidni folikuli sa totalno odsutnim koloidom (mala strelica), sa hiposekrecijom koloida (srednja strelica) i očuvanom količinom koloida (velika strelica). (Bojenje HE; x100)

jedara u komparaciji sa kontrolnim grupama (Slika 6).



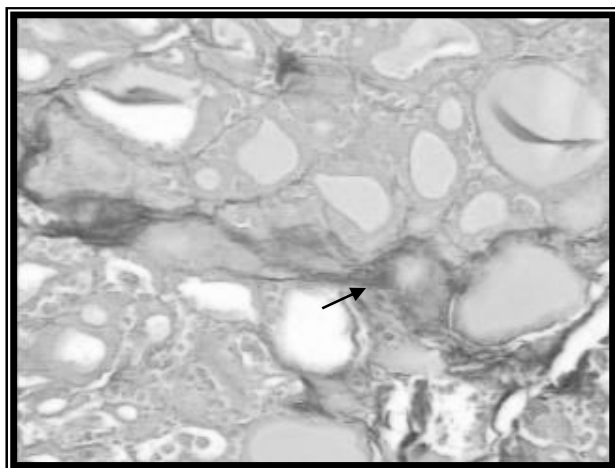
Slika 6. Eksperiment - Tireociti sa povećanom mitozom i pseudostratifikacijom jedara (strelica). (Bojenje HE; x400)

Koloid unutar folikula eksperimentalnih grupa je smanjene zastupljenosti u odnosu na kontrole, a u u folikulima u kojima je prisutan, pokazuje znake aktivne resorpcije, što se uočava kao rečkasta ivica prema tirocitima ili kao prisustvo brojnih vakuola unutar samog koloida koji dobija sačast izgled (Slika 7). Aktivna resorpcija tiroglobulina iz koloida je potvrđena imunohistohemijskim bojenjem na tiroglobulin.



Slika 7. Eksperiment - Koloid unutar tireoidnog folikula pokazuje znake aktivne resorpcije i formiranja vakuola (strelica). (Bojenje ABC na tiroglobulin; x100)

Stroma tireoidne žlezde tretiranih pacova pokazuje znake proliferacije vezivnotkivnih kolagenih vlakana (Slika 8) i ćelijske limfocitne infiltracije u kapsuli i interfolikularnom vezivnom tkivu u odnosu na kontrole.



Slika 8. Eksperiment – Stroma tireoidne žlezde pokazuje znake proliferacije vezivnotkivnih vlakana (strelica). (Bojenje Van Gieson; x100)

Limfocitna infiltracija je na pojedinim preparatima uzrokovala formiranje limfnog folikula unutar tkiva tireoidne žlezde. Krvni sudovi pokazuju znake povećane prepunjenosti u lumenu krvnih sudova u odnosu na kontrole.

DISKUSIJA

Brojna istraživanja sa MNGom i njegovim efektima na pacovima tretiranim u neonatalnom periodu MNGom su dokazala postojanje morfoloških promena na mnogim organima, kao i na tireoidnoj žlezdi. Rezultati našeg istraživanja su u skladu sa rezultatima drugih istraživanja, ali treba uzeti u obzir da su se ova istraživanja pored morfoloških karakteristika promena na tireoidnoj žlezdi, više orijetisala prema fiziološkim, i to endokrinim promenama u sekreciji hormona i promenama izazvanim uticajem MNGa na hipotalamo-hipofizo-tireoidnu osovину. Mora se naglasiti da su rezultati ovih istraživanja u pojedinim delovima kontradiktorni, što otežava razumevanje mehanizma nastanka registrovanih promena na tireoidnoj žlezdi (27,29,32).

Brojna istraživanja pokazuju da neonatalna aplikacija MNGa dovodi do lezije nucleusa arcuatusa (AN), gde su primarno smešteni centri za glad i sitost. Ovo je, pre svega, rezultat nerazvijenosti krvno-moždane barijere i mehanizma odstranjivanja glutamata od strane glia ćelija. Neuron AN imaju važnu ulogu u regulaciji sinteze i sekrecije tireotropnog-oslobađajućeg hormona (TRH) u parvocelularnim neuronima nucleusa paraventricularisa (PVN), koji reguliše sekreciju tireotropnog stimulišućeg hormona (TSH) u TSH ćelijama adenohipofize, a koji reguliše sekreciju tireoidnih hormona u tireoidnoj žlezdi. Usled ove lezije dolazi do povećanog unosa hrane, što rezultuje hiperglikemijom, hiperleptinemijom i gojaznošću. Kao odgovor na povećanje unosa hrane javlja se povećanje iskorišćavanja energije u vidu povećanja sinteze i sekrecije tireoidnih hormona, kao i povećane mitotske aktivnosti tireocita, što može objasniti nastale promene (21,22,29,30,31,33).

Prema istraživanju Miskowiak-a i saradnika neonatalna aplikacija MNGa ne dovodi do promene u broju TSH ćelija u adenohipofizi, već samo dolazi do smanjenja



njihove veličine. S obzirom da istraživanja pokazuju i povećanje lučenja tireoidnih hormona izgleda da postoji još neki mehanizam koji omogućava da ove ćelije, uprkos smanjenju dimenzija, povećano sintetisu i sekretuju TSH, a time i prouzrokuju registrovane promene na tireoidnoj žlezdi pacova (28). Sa druge strane, dokazana pojačana aktivna resorpcija od strane tirocita ukazuje da se troše deponovane rezerve koloida, odnosno tiroglobulina i zašto su promene na nivou cele tiroidne žlezde relativno male posle neonatalne primene MNGa.

Leptin je jedan od glavnih modulatora regulacije mehanizma povratne sprege tireoidnih hormona. Hiperleptinemija, preko prisutnih leptinskih receptora u AN i PVN, koji su u AN brojniji u odnosu na PVN, dovodi do smanjenja inhibitornog efekta tireoidnih hormona na ekspresiju gena za TRH, što povećava sintezu TSH, a time posledično i sintezu tireoidnih hormona, što je u skladu sa registrovanim promenama na tireoidnoj žlezdi. Najveći uticaj treba pripisati leptinskim receptorima u PVNu s obzirom da MNG izaziva destrukciju neurona AN. Pad leptina treba da dovede do povećanja osetljivosti TRH neurona na povećanu koncentraciju tireoidnih hormona i mehanizmom negativne povratne sprege bi trebalo da se smanji produkcija TRH, međutim, istraživanja sa MNGom su pokazala da produženo delovanje MNGa dovodi do pojave leptinske rezistencije i promena u leptinskim receptorima, uzrokujući jedan konstantan poremećaj hipotalamo-hipofizo-tireoidne osovine, a time i promene na tireoidnoj žlezdi(30,31,33).

Povezano sa ovim mehanizmom, druga istraživanja pokazuju smanjenje koncentracije neuropeptida Y (NPY), koji je veoma bitan modulator hipotalamo-hipofizo-tireoidne osovine. Povećanje ekspresije njegovih gena i povećanje njegove sinteze i sekrecije iz neurona AN deluje supresorski na TRH ćelije u PVN, a time i na celu osovinu. Povećanje leptina smanjuje

ekspresiju, sintezu i sekreciju NPY i omogućava povećanje funkcije hipotalamo-hipofizo-tireoidne osovine. Usled tretmana MNGom, smanjuje se koncentracija NPY, a time slabi i njegov supresorski efekat na osovinu(26,31,33).

Povezano sa NPY otkriveno je da iste ćelije koje sintetisu NPY, sintetisu i Agouti-related protein (AGPR), za koji se takođe pokazalo da ima supresorski uticaj na osovinu. Verovatno je da i ovaj hormon trpi promene od strane MNGa u vidu smanjenja i sinergistički sa NPY izaziva promene u funkciji osovine i na tireoidnoj žlezdi koje su potvrđene i našim istraživanjem (26,33).

Istraživanja na drugim organima i to, pre svega, na pankreasu, pokazala su da imamo pojačanu ekspresiju autoantigena. Dolazi da ekspresije glutamat dekarboksilaze (GAD), i to pre svega GAD65(44-46). Istraživanja su pokazala da dolazi interakcije ovog autoantigena sa makrofagima, dendritičnim ćelijama i B limfocitima. Potom sledi aktivacija i diferencijacija T limfocita i sinteza citokina koji regulišu imuni odgovor (47-48). Ovo pre svega može da objasni prisustvo limfnih infiltrata i limfocita u tireoidnoj žlezdi koje smo registrovali na histološkim preparatima (34-38).

Naše istraživanje, kao i druga istraživanja, upućuju na jedan mehanizam nastanka promena u tireoidnoj žlezdi. Trebalo bi se orjentisati u daljim istraživanjima na bolje razjašnjavanje etiologije i patogeneze promena u tireoidnoj žlezdi, jer u odnosu na druga istraživanja, gde postoji znatno više podataka i gde je postignuto veće razumevanje kompleksnosti i sinergičnosti više različitih mehanizama u nastanku promena na organima, o morfološkim promenama tireoidne žlezde nema puno podataka koji bi omogućili bolje razumevanje nastanka njenih promena posle neonatalne aplikacije MNGa.



ZAKLJUČAK

Istaživanje pokazuje da MNG aplikovan postnatalno u dozi od 4mg/g t.m. izaziva morfološke promene na tireoidnoj žlezdi pacova.

Ispitivana doza MNG dovodi do narušavanja morfologije tireoidne žlezde, i to, pre svega, do promena:

- u morfologiji tireoidnih folikula, gde se registruju promene u dimenzijama, obliku i koloidnom sadržaju folikula;
- u morfologiji samih ćelija, gde se registruju promene u obliku, dimezijama i samom organizaciji ćelije;
- na krvnim sudovima, gde se registruju znaci prepunjenosti u lumenu kapsularnih i interfolikularnih krvnih sudova;

- u zastupljenosti koloida unutar folikula, u vidu različite količine, parcijalne odsutnosti ili totalne odsutnosti kolida.

Navedene promene ukazuju da postoje poremećaji na nivou hipotalamo-hipofizo-tireoidne osovine ili neke druge još uvek nepoznate promene, koje dovode do poremećene regulacije tireoidne žlezde, a time i do potvrde štetnih efekata MNGa na organizam pacova. Dalja istraživanja treba usmeriti pre svega u pravcu boljeg rasvetljavanja patogenetskih procesa koji dovode do navedenih promena kao i u pravcu povezivanja drugih promena koje izaziva neonatalni tretman MNGom sa promenama navedenim u rezultatima, jer sve promene koje izaziva MNG deluju sinergistički. Obezbeđivanjem potpunijih i pouzdanijih podataka, uticaj i značaj delovanja MNGa na organizam može se sagledati u celini i mogu da se razumeju njegovi patofiziološki procesi.

LITERATURA

1. Martindale D: The Extra Phrmacopea, 28th edition. London, The Pharmaceutical press. 1982; 59-60.
2. Kwok HMR: Chinese – restaurant syndrome. N Eng J MED. 1968; 278: 796-802.
3. Hinoi E, Takeda T, Ueshima T, Tsuchihashi Y, Yoneda Y: Glutamate signaling in peripheral tissues. Eur J Biochem. 2004; 271: 1-13.
4. Olney JW: Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1990; 30: 47-71.
5. Sinor JD, Shen D, Venneti S, Blitzblau RC, Leszkiewicz DN, Rosenberg PA et al.: NMDA and glutamate evoke excitotoxicity at distinct cellular locations in cortical rat neurons in vitro. J Neurosci. 2000; 20: 8831-8837.
6. Okumoto S: Detection of glutamate release from neurons by genetically encoded surface-displayed FRET nanosensors. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102(24): 8740-8745.
7. Jeffrey C, Watkins EJ : The glutamate story. British J Pharmacol. 2006; 147: S100-S108.
8. Ortiz GG, Bitzer-Quintero OK, Zarate CB, Rodriguez-Reynoso S, Larios-Arceo F, Velazquez-Brizuela IE et al.: Monosodium glutamate-induced damage in liver and kidney: a morphological and biochemical approach. Biomed Pharmacother. 2006; 60(2): 86-91.
9. Gill SS, Mueller RW, McGuire PF, Refined OM: Potential target sites in peripheral tissues for excitatory neurotransmission and excitotoxicity. Toxicol Pathol 2000; 28(2): 277-285.
10. Danbolt NC: Glutamate uptake. Prog Neurobiol. 2001; 65(1): 1-105.
11. Gadea A, López-Colomé AM: Glial transporters for glutamate, glycine and GABA I. Glutamate transporters. J Neurosci Res. 2001; 63(6): 453-60.
12. Danbolt NC: Differentiation-associated Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) is a vesicular glutamate transporter in endocrine glutamatergic systems. J Biol Chem. 2001; 276(46): 43400-6.



13. Luna LG: Manual of histologic staining methods, AFIP. 3rd edition, New York. 1968.
14. Hsu SM, Raine L and Fanger H: Use Avidin-Biotin-Peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. *The Jour Histochem Citochem.* 1981; 29: 577-580.
15. Von Diemen V, Trindade EN, Trindade MR: Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cir Bras.* 2006; 21(6): 425-9.
16. Farombi EO, Onyema OO: Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin. *Hum Exp Toxicol.* 2006; 25(5): 251-259.
17. Manev H, Favaron M, Guidotti A, Costa E: Delayed increase of Ca^{2+} influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol Pharmacol.* 1989; 36(1): 106-12.
18. Bloch B, Ling N, Benoit R, Wehrenberg WB, Guillemin R: Specific depletion of immunoreactive growth hormone-releasing factor by monosodium glutamate in rat median eminence. *Nature.* 1984; 307(5948): 272-3.
19. Miskowiak B, Partyka M: Effects of neonatal treatment with MSG (monosodium glutamate) on hypothalamopituitary-thyroid axis in adult male rats. *Histol Histopathol.* 1993; 8(4): 731-4.
20. Gong SL, Xia FQ, Wei J, Li XY, Sun TH, Lu Z et al.: Harmful effects of MSG on function of hypothalamus-pituitary-target gland system. *Biomed Environ Sci.* 1995; 8(4): 310-7.
21. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG: Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest.* 1998; 98: 1101-1106.
22. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C: Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature.* 1996; 382: 250-252.
23. Larsen PJ: Neonatal monosodium glutamate treatment alters both the activity and the sensitivity of the rat hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *J Endocrinol.* 1994; 141: 497-503.
24. Dube MG, Xu B, Kalra PS, Sninsky CA, Kalra SP: Disruption in neuropeptide Y and leptin signaling in obese ventromedial hypothalamic-lesioned rats. *Brain Res.* 1999; 816(1): 38-46.
25. Unger RH, Zhou ZT, Orci L: Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 2327-2332.
26. Légrádi G, Lechan RM: Agouti-related protein containing nerve terminals innervate thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology.* 1999 Aug; 140(8): 3643-52.
27. Miśkowiak B, Partyka M: Effect of neonatal treatment with MSG (monosodium glutamate) on thyroid of the adult male rats. *Histol Histopathol.* 1999 Jan; 14(1): 63-7.
28. Miśkowiak B, Partyka M: Neonatal treatment with monosodium glutamate (MSG): structure of the TSH-immunoreactive pituitary cells. *Histol Histopathol.* 2000 Apr; 15(2): 415-9.
29. Miśkowiak B, Partyka M: Effects of neonatal treatment with MSG (monosodium glutamate) on hypothalamo-pituitary-thyroid axis in adult male rats. *Histol Histopathol.* 1993 Oct; 8(4): 731-4.
30. Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Rand WM, Flier JS, Lechan RM: Arcuate nucleus ablation prevents fasting-induced suppression of ProTRH mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology.* 1998 Aug; 68(2): 89-97.
31. Légrádi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM: Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology.* 1997 Jun; 138(6): 2569-76.
32. Dhindsa KS, Omran RG, Bhup R: Histological changes in the thyroid gland induced by monosodium glutamate in mice. *Acta Anat (Basel).* 1981; 109(2): 97-102.
33. Mihály E, Fekete C, Tatro JB, Liposits Z, Stopa EG, Lechan RM: Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the human hypothalamus are innervated by neuropeptide Y, agouti-related protein, and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Jul; 85(7): 2596-603.
34. Björk E, Kämpe O, Andersson A, Karlsson FA: Expression of the 64 kDa/glutamic acid decarboxylase rat islet cell autoantigen is influenced by the rate of insulin secretion. *Diabetologia.* 1992; 35(5): 490-3.



35. Hagopian WA, Michelsen B, Karlsen AE, Larsen F, Moody A, Grubin CE et al.: Autoantibodies in IDDM primarily recognize the 65,000-M(r) rather than the 67,000-M(r) isoform of glutamic acid decarboxylase. *Diabetes*. 1993; 42(4): 631-6.
36. Christgau S, Schierbeck H, Aanstoot HJ, Aagaard L, Begley K, Kofod H et al.: Pancreatic beta cells express two autoantigenic forms of glutamic acid decarboxylase, a 65-kDa hydrophilic form and a 64-kDa amphiphilic form which can be both membrane-bound and soluble. *J Biol Chem*. 1991; 266(31): 21257-64.
37. Garry DJ, Appel NM, Garry MG, Sorenson RL: Cellular and subcellular immunolocalization of L-glutamate decarboxylase in rat pancreatic islets. *J Histochem Cytochem*. 1988; 36(6): 573-80.
38. Yoon JW, Jun HS: Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 928: 200-11.

EFFECT OF NEONATAL MONOSODIUM GLUTAMATE TREATMENT ON THE THYROID GLAND OF RATS

Ivan Rančić, Dejan Sibinović, Marija Mihajlović

Monosodium-glutamate (MSG) is a food industry additive. Prior experiments have shown MSG toxic effects on neurons, pancreas, neuroendocrine regulation, etc. There are only few studies about thyroid morphological changes and they mostly study hypothalamo-pituitary-thyroid axis.

The aim of this study was to collect data about MSG morphological changes in the rat thyroid gland.

We used 40 Wistar rats of both genders, divided in four groups. Control (C) groups were given 0.9% sodium chloride, while treated (MSG) groups were given MSG (4 mg/g body weight) on the second, fourth, sixth, eighth and tenth day postnatally. After anaesthesia administration and extirpation of the thyroid glands, the animals were sacrificed after two months. Organs were histologically processed. Slides were cut and using histochemical methods stained by HE, Van Gieson and ABC method for thyroglobulin.

MSG-treated rats show irregularity in shape, follicular dimensional changes (bigger or smaller) and follicular epithelial changes in the cell shape from plate-like to cylindrical. Follicles showed the signs of adenomas in the thyroid gland. Thyrocytes showed the signs of pseudostratification, polarity changes and increased mitosis of nuclei, oncocytic and atrophic cell transformation. Colloid was differently present inside the follicles. Stroma showed the signs of proliferation and lymphocyte infiltration. Stromal blood vessels showed the signs of thrombosis.

Tested MSG dose induces morphological changes in the thyroid gland. Changes in morphology of thyrocytes, follicles, stroma, blood vessels and colloid are present. These morphological changes confirm the toxic effects on this organ.

Keywords: monosodium-glutamate, thyroid gland, morphological changes

Rad je nagrađen na 51. Kongresu studenata biomedicinskih nauka Srbije sa internacionalnim učešćem, u okviru sesije Patofiziologija II, Ohrid, Makedonija 2010.