

HISTOLOGICAL CHANGES OF HYPOTHALAMIC NUCLEI UNDER THE LONG-TERM INFLUENCE OF MONOSODIUM GLUTAMATE

Danylo Halytsky Lviv National Medical University (Lviv, Ukraine)

vashcheniuk.mariia@gmail.com

“Glutamate-induced obesity” is a relevant and interesting topic for discussion in the scientific community regarding health and nutrition. Monosodium glutamate is a food additive often used in fast, canned, and many convenience foods. Due to the increase in appetite caused by glutamate, people gain weight over time. This effect can be explained by the influence of glutamate on the central nervous system, especially on the tuber cinereum of the hypothalamus, as the latter is responsible for lipid metabolism. The study aims to analyse structural changes in the components of the nuclei of the hypothalamic tuber cinereum under prolonged exposure to sodium glutamate in the experiment. The study material is represented by microdissections of the hypothalamic tuber cinereum of two groups of white male Wistar rats weighing 218-260 g (intact and experimental). Histological sections were stained with hematoxylin and eosin, cresyl violet, a combination of cresyl violet and luxol, and silver impregnation, after which the microscopic structure of the components of the hypothalamic tuber cinereum was studied under the condition of 10 weeks of sodium glutamate administration in comparison with intact animals. The study’s results allowed us to describe the peculiarities of the cytoarchitectonics of the tuber cinereum and its micromorphological characteristics in control and experiment. After prolonged administration of sodium glutamate, the microscopic picture is dominated by neurons in a state of oedema, their single death is observed, and neuronal fragments are phagocytosed by glial elements (neuronophagy). Morphometric analysis showed a significant increase in the volume of both perikaryon and nucleus accumbens of the hypothalamic tuber cinereum. Conclusions. Long-term consumption of sodium glutamate causes profound structural changes in the nuclei of the hypothalamus.

Key words: nervous system, tuber cinereum, hypothalamus, monosodium glutamate, white rat.

Connection of the publication with planned research works.

The article is a part of the planned research work of the Department of Normal Anatomy and Operative Surgery with Topographic Anatomy of Danylo Halytsky Lviv National Medical University “Morphological and functional features of organs in pre – and postnatal periods of ontogeny, under the influence of opioids, food additives, reconstructive surgery and obesity” – state registration number 0120U002129.

Introduction.

The hypothalamus is the highest subcortical centre of the autonomic nervous system, maintains homeostasis [1], and affects the body’s peripheral systems [2]. By stimulating inflammation in hypothalamic cells [3], homeostasis is disturbed under the influence of various external and internal factors. “Monosodium glutamate is a well-known food additive that stimulates appetite, improves the taste of food, and is considered relatively safe. However, many experimental studies have indicated the negative effects of monosodium glutamate on the body. For example, after four weeks of exposure to monosodium glutamate, histological specimens of mesenteric lymph nodes show the intensive formation of germinal centres, increased proliferation and differentiation of lymphoid cells, and an immune induction effect with increased proliferation of activated lymphocytes and their further differentiation into plasma cells [4]. The administration of monosodium glutamate to rats in the neonatal period leads to the destruction of the ventromedial and arcuate nuclei. It disrupts the transmission of leptin and insulin signals, which causes neuroendocrine and metabolic changes [5]. A study conducted

on eight-week-old rats on a high-calorie diet showed increased blood levels of triglycerides, total cholesterol, low-density lipoprotein, and weight gain [6]. Therefore, the term “glutamate-induced obesity” is not unreasonable, as the food additive not only enhances the taste but also significantly increases appetite [7, 8]. In turn, the tuber cinereum is a structure responsible for lipid metabolism, so it is advisable to analyse this structure’s morphometric and morphological changes under prolonged exposure to monosodium glutamate. The silver impregnation technique has been used for a long time to study the morphology of pyramidal neurons and their processes and examine glial cells and nerve fibres [9]. This method makes it possible to identify only 5-10% of all neurons while the rest of the cells remain unstained. To stain a larger number of neurons, as well as to analyse cell activity, which is marked by the amount of chromatophilic substance, i.e. ribosomal ribonucleic acid in the coarse endoplasmic reticulum and polyribosomes, cresyl violet staining (according to the Nissl method) and cresyl violet with luxol (according to the Kluvar-Barrar method) are used [10].

The aim of the study.

To analyse the morphological and morphometric parameters of the nuclei of the tuber cinereum of the hypothalamus of the white rat under prolonged exposure to monosodium glutamate in the experiment.

Object and research methods.

The study’s material was preparations of the tuber cinereum of the hypothalamus of male Wistar rats. Male rats of reproductive age were administered monosodium glutamate at a dose of 0.07 g/kg/day orally via pipette once a day, followed by free access to food during

the day. The total number of experimental animals (58) was divided into three groups: Group I – glutamate administration for 6 weeks (16), Group II – 8 weeks (16), and Group III – 10 weeks (16). Biological material from 10 rats of the intact group was collected separately. Animals were withdrawn from the experiment by an overdose of ether anaesthesia (without being fed for one day). After skull trephination, the prepared brain was fixed in a 10% solution of neutral formalin. After thorough rinsing, dehydration was performed with ethanol at a concentration of 80%, 90%, 100%, and placed in a mixture of alcohol-xylene (1:1) and o-xylene, xylene-paraffin mixture (+37°C) and homogenised paraffin mixture (Leica Microsystems) with a melting point of +56°C.

Sections were made serially in the sagittal and frontal planes on a sledge microtome (MS-2); the sections' thickness was 5 µm. Sections were stained with hematoxylin and eosin, cresyl violet, a combination of cresyl violet and luxol, and silver impregnation was performed. Histological sections were photographed using a ZEISS Primo Star 3 microscope, Axiocam 208 colour digital camera and Zen ZEISS software.

Measurements of the longitudinal and transverse dimensions of cell pericarions and their nuclei were performed using a specialised morphometric program Zen ZEISS. The volume of cells and nuclei was determined by the formula:

$$V = \frac{\pi ab^2}{6}$$

where V is the volume of the cell or nucleus; a is the longitudinal diameter (largest axis) of the cell or nucleus

Table – Morphometric parameters of cells of the nuclei of the tuber cinereum of the hypothalamus of control animals and under the influence of monosodium glutamate (M±m)

Parameters Type of neuron	Pyramidal neuron		Oval neuron	
	Control group (M±m)	10 weeks (M±m)	Control group (M±m)	10 weeks (M±m)
Neuronal volume	271,13±11,8	589,46±25,69*	71,12±5,34	331,84±28,94*
Neuronal nucleus volume	90,86±3,98	231,73±16,6*	30,22±2,44	178,33±20,03*

Notes: * – statistically significant difference at a significance level of p≤0.001.

drawn through the nucleus; b is the transverse diameter (smallest axis) of the cell or nucleus drawn through the nucleus.

The stereotactic atlas of the rat brain was used to determine the topography of the studied structures [11]. The results at the beginning and week 10 of the experiment were chosen for this article.

All studies were conducted in compliance with the basic provisions of the GCP (1996), the Council of Europe Convention on Human Rights and Biomedicine (04.04.1997), the World Medical Association Declaration of Helsinki for the Ethical Principles of Scientific Medical Research Involving Human Subjects (1964-2013), the Ministry of Health of Ukraine Orders № 690 of 23.09.2009, № 616 of 03.08. 2012 and the Procedure for Removing Biological Objects from the Dead, whose Bodies are Subject to Forensic Medical Examination and Pathological Examination, for Scientific Purposes, the requirements for humane treatment of experimental animals regulated by the Law of Ukraine "On Protection of Animals from Cruelty" (№ 3447-IV of 21.02.2006) and the European Convention for the Protection of Verte-

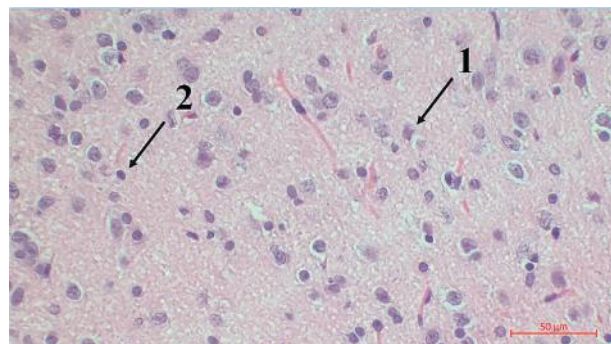


Figure 1 – Cytoarchitectonics of the tuber cinereum of the hypothalamus (control group). Microphotograph. Hematoxylin and eosin staining. Magnification: x 400. Designations: 1 – pyramidal neuron; 2 – oval neuron.

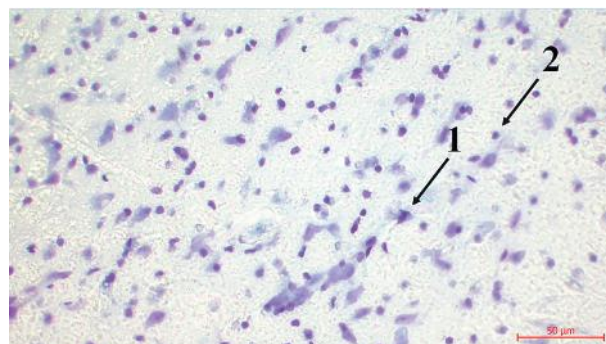


Figure 2 – Cytoarchitectonics of the tuber cinereum of the hypothalamus (control group). Microphotograph. Cresyl violet staining by the Nissl method. Magnification: x 400. Designations: 1 – pyramidal neuron; 2 – oval neuron.

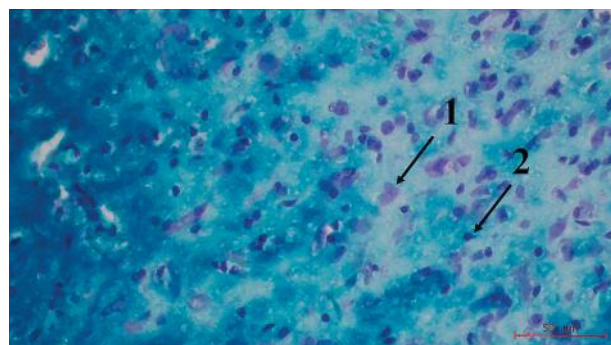


Figure 3 – Cytoarchitectonics of the tuber cinereum of the hypothalamus (control group). Microphotograph. Cresyl violet and Luxol staining by the Kluver-Barrér method. Magnification: x 400. Designations: 1 – pyramidal neuron; 2 – oval neuron.

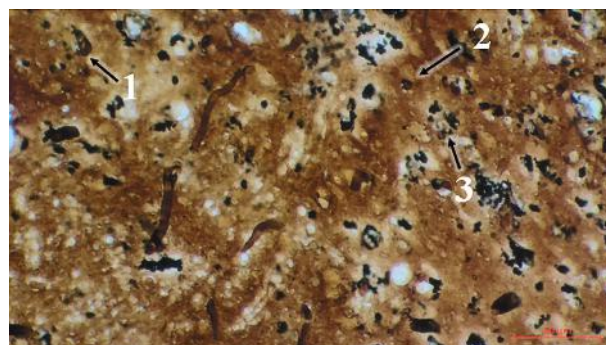


Figure 4 – Cytoarchitectonics of the tuber cinereum of the hypothalamus (control group). Microphotography. Silver impregnation. Magnification: x 400. Designations: 1 – pyramidal neuron; 2 – oval neuron; 3 – microglia.

brate Animals Used for Research and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 18.03.1986).

Research results.

In the intact group, the structure of the tuber cinereum of the hypothalamus corresponded to the species norm. The tuber cinereum is a median cone-shaped area between the mamillary bodies and the optic chiasm. At the histological level, the tuber cinereum includes cells

of the ventromedial (VMN), dorsomedial (DMN) and arcuate nuclei (Arc).

The nuclei of the tuber cinereum are formed by two types of neurons (**fig. 1**). The first type is pyramidal neurons, chaotically arranged, most common, and well stained. They have a large perikaryon with a volume of $271.13 \pm 11.8 \mu\text{m}^3$ and a large round nucleus with one nucleolus, with a volume of $90.86 \pm 3.98 \mu\text{m}^3$ (**table**). Euchromatin and heterochromatin can be clearly distin-

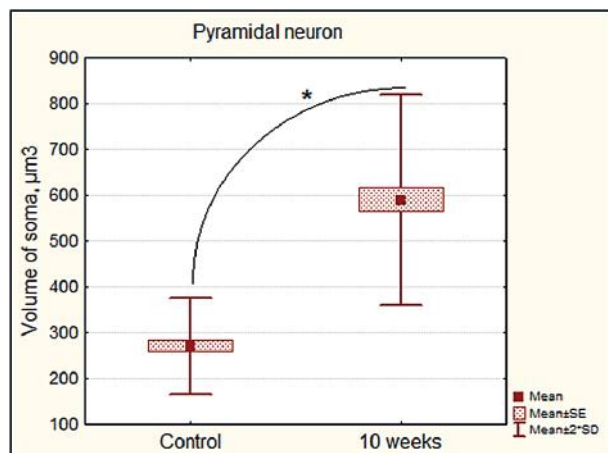


Figure 5 – Morphometric parameters of the pyramidal neuron of the tuber cinereum of the rat hypothalamus at the beginning of the experiment and after 10 weeks of monosodium glutamate administration (perikaryon volume, μm^3).

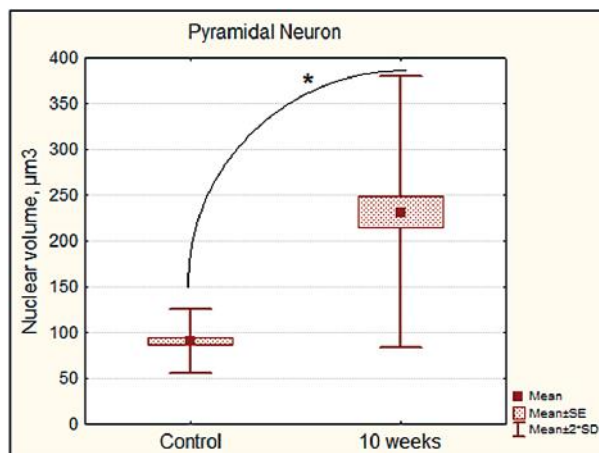


Figure 6 – Morphometric parameters of the pyramidal neuron of the tuber cinereum of the rat hypothalamus at the beginning of the experiment and after 10 weeks of monosodium glutamate administration (nucleus volume, μm^3).

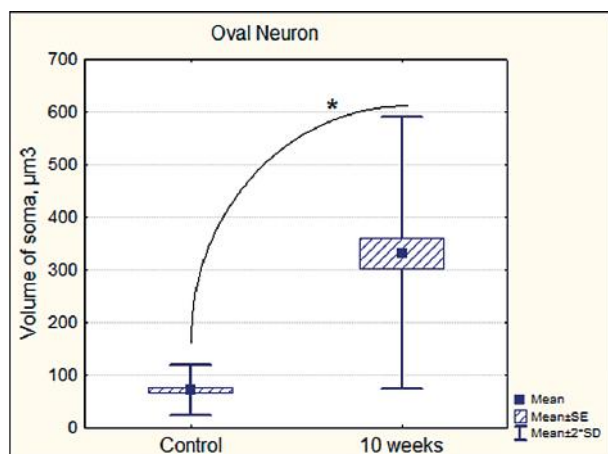


Figure 7 – Morphometric parameters of the oval neuron of the tuber cinereum of the rat hypothalamus at the beginning of the experiment and after 10 weeks of monosodium glutamate administration (perikaryon volume, μm^3).

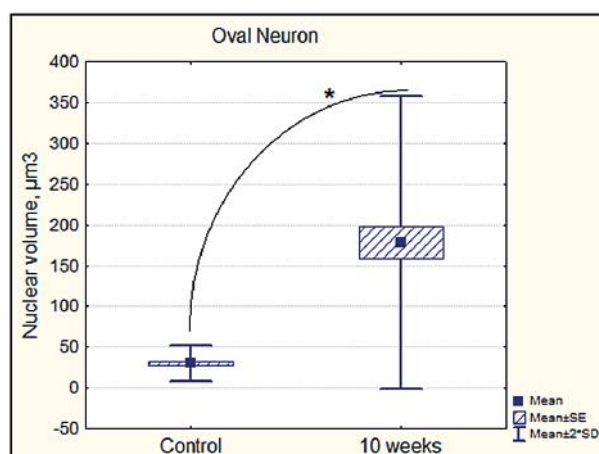


Figure 8 – Morphometric parameters of the oval neuron of the rat hypothalamus tuber cinereum at the beginning of the experiment and after 10 weeks of monosodium glutamate administration (nucleus volume, μm^3).

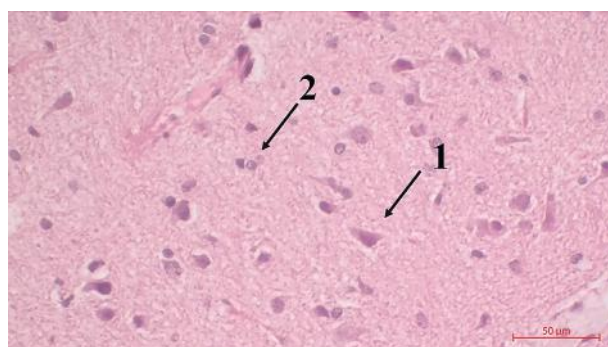


Figure 9 – Cytoarchitectonics of the tuber cinereum of the hypothalamus (monosodium glutamate administration for 10 weeks). Microphotograph. Hematoxylin and eosin staining. Magnification: x 400. Designations: 1 – pyramidal neuron; 2 – oval neuron.

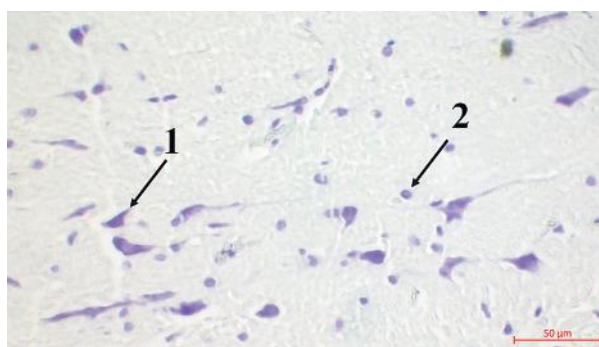


Figure 10 – Cytoarchitectonics of the tuber cinereum of the hypothalamus (monosodium glutamate administration for 10 weeks). Microphotograph. Cresyl violet staining by Nissl's method. Magnification: x 400. Designations: 1 – pyramidal neuron; 2 – oval neuron.

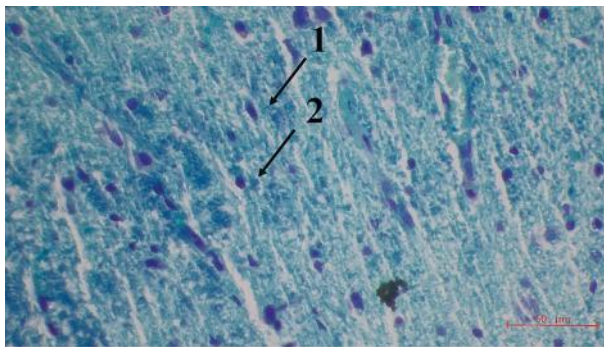


Figure 11 – Cytoarchitectonics of the tuber cinereum of the hypothalamus (monosodium glutamate administration for 10 weeks). Microphotography. Cresyl violet and Luxol staining by the Kluver-Barerra method. Magnification: x 400. Designations: 1 – pyramidal neuron; 2 – oval neuron.

guished in the nucleus. The second type, oval neurons, which are also well stained, are somewhat less common. The volume of the perikaryon of neurons of the second type is $71.12 \pm 5.34 \mu\text{m}^3$. The nuclei of these cells are round, well stained, and have a larger relative volume than cells of the first type. The volume of nuclei of neurons of the second type is $30.22 \pm 2.44 \mu\text{m}^3$. When studying neurons by the Nissl method (cresyl violet staining, fig. 2) and Kluver-Barrera staining (a combination of cresyl violet and luxol staining, fig. 3), we note that the oval neuron is clearly oval with a special dark Nissl substance, the pyramidal neuron is large but slightly lighter. When silver impregnation was performed, the neurons were well stained, with a light nucleus and a stained nucleolus. Many processes were observed, and the microglia were fine-grained and branched (fig. 4).

After ten weeks of monosodium glutamate administration, the microscopic picture is dominated by neurons in a state of edema, we observe their single death, phagocytosed by glial elements (neuronophagy). The volume of the perikaryon of the pyramidal neuron was $589.46 \pm 25.69 \mu\text{m}^3$ (fig. 5, $p < 0.001$), the nucleus – $231.73 \pm 16.6 \mu\text{m}^3$ (fig. 6, $p < 0.001$); the volume of the perikaryon of the oval neuron was $331.84 \pm 28.94 \mu\text{m}^3$ (fig. 7, $p < 0.001$), the nucleus – $178.33 \pm 20.03 \mu\text{m}^3$ (fig. 8, $p < 0.001$). Objectively, the cells are increased in size (fig. 9), their contours are rounded (fig. 10). The nuclei of the cells are also swollen, some of them take an eccentric position in the cytoplasm. There are cells with both light and sharply stained irregularly shaped nuclei, single nuclei in a state of karyolysis and karyorexis (fig. 11). The amount of chromatophilic substance decreases, microglia is locally densified and accumulated, axons of both neurons are significantly thinned (fig. 12), which together indicate degenerative changes.

Discussion of the research results.

Our results confirm that in animals of the intact group, the structure of the hypothalamic tuber cinereum corresponds to the species norm [12, 13], and prolonged administration of monosodium glutamate to rats in the experiment leads to significant destructive changes in the cells of the nuclei of the hypothalamic tuber cinereum.

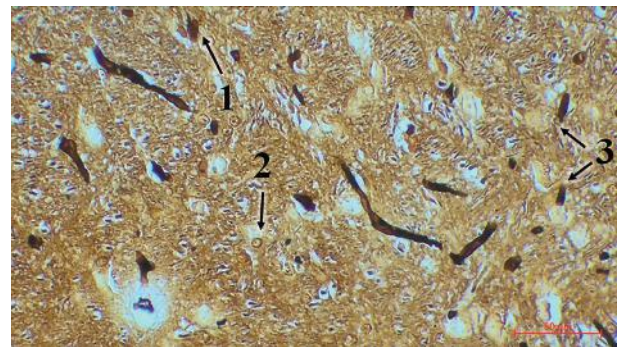


Figure 12 – Cytoarchitectonics of the tuber cinereum of the hypothalamus (monosodium glutamate administration for 10 weeks). Microphotography. Silver impregnation. Magnification: x 400. Designations: 1 – pyramidal neuron; 2 – oval neuron; 3 – microglia.

When analysing morphological and morphometric parameters, we note a significant increase in the size of the perikaryon and neuronal nuclei ($p < 0.001$), irregularly shaped nuclei appear, the amount of chromatophilic substance decreases, indicating microglia compaction [14], and axons become thinner. The same changes were observed in the study of cerebral cortical neurons under conditions of exposure to heavy metal salts [15]. Similar degenerative damage to the hypothalamic nuclei was observed in another experimental study of glutamate-induced obesity in rats [16]. Karyorexis and karyolysis in cells were also observed in the study of structural changes in lymph nodes under prolonged exposure to monosodium glutamate [17].

Conclusions.

1. With prolonged administration of monosodium glutamate, the neurons of the tuber cinereum of the rat hypothalamus significantly increase in size (both perikaryon and nucleus), single neuronal death, changes in the shape of cell nuclei, and thinning of axons are observed.

2. The combined use of such staining methods as haematoxylin and eosin, cresyl violet, cresyl violet and luxol, as well as silver impregnation, makes it possible to fully describe changes in the components of the tuber cinereum of the hypothalamus under prolonged exposure to monosodium glutamate.

3. The morphological and morphometric parameters of cells of the tuber cinereum of the hypothalamus of the white rat after ten weeks of exposure to monosodium glutamate can serve as a basis for understanding the mechanisms of development of changes in the structural components of this organ.

Prospects for further research.

The obtained data will allow us to create models of monosodium glutamate's effect on the hypothalamus's tuber cinereum to find ways to prevent and treat pathological conditions of this structure.

ГІСТОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ЯДЕР ГІПОТАЛАМУСА ПРИ ТРИВАЛОМУ ВПЛИВІ ГЛУТАМАТУ НАТРІЮ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького (м. Львів, Україна)

vashcheniuk.mariia@gmail.com

«Глутамат-індуковане ожиріння» актуальна і цікава тема для обговорення у науковій спільноті в контексті здоров'я та харчування. Глутамат натрію – харчова добавка, яка використовується часто у фаст-фуді, консервах та багатьох продуктах швидкого приготування. Через підвищення апетиту глутаматом, з часом у людей збільшується маса тіла. Цей ефект можна пояснити впливом глутамату на центральну нервову систему, особливо на сірий горб гіпоталамуса, так як останній відповідає за ліпідний обмін. Метою роботи є аналіз структурних змін компонентів ядер сірого горба гіпоталамуса при тривалому впливі глутамату натрію в експерименті. Матеріал дослідження представлений мікропрепаратами сірого горба гіпоталамуса двох груп білих щурів самців лінії Вістар вагою 218-260 г (інтактних та експериментальних). Зафарбовування гістологічних зрізів проводили гематоксиліном та еозином, крезил віолетом, комбінацією крезил віолету та люксолу, а також проводили імпрегнацію сріблом, після чого вивчали особливості мікроскопічної будови компонентів сірого горба гіпоталамуса за умови 10-ти тижневого введення глутамату натрію у порівнянні з інтактними тваринами. Результати дослідження дозволили описати особливості цитоархітекτονіки сірого горба, його мікоморфологічну характеристику у контролі та експерименті. Після тривалого введення глутамату натрію в мікроскопічній картині домінують нейрони в стані набряку, спостерігаємо їх поодинокі загибель, фрагменти нейронів фагоцитуються гліальними елементами (нейронофагія). Морфометричний аналіз показав достовірне збільшення об'єму як перикаріону, так і ядра нейронів сірого горба гіпоталамуса. Висновки. Тривале споживання глутамату натрію зумовлює глибокі структурні зміни ядер гіпоталамуса.

Ключові слова: нервова система, сірий горб, гіпоталамус, глутамат натрію, білий щур.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Стаття є частиною планової науково-дослідної роботи кафедри нормальної анатомії та оперативної хірургії з топографічною анатомією Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького «Морфо-функціональні особливості органів у пре – та постнатальному періодах онтогенезу, при впливі опіоїдів, харчових добавок, реконструктивних операцій та ожирінні» – номер державної реєстрації 0120U002129.

Вступ.

Гіпоталамус – це є вищий підкірковий центр вегетативної нервової системи, підтримує гомеостаз [1], впливає на периферичні системи організму [2]. Саме шляхом стимулювання запалення в клітинах гіпоталамуса [3] порушується гомеостаз під впливом різних зовнішніх та внутрішніх чинників. «Глутамат натрію» – широковідома харчова добавка, яка стимулює апетит та покращує смак їжі та вважається відносно безпечною. Проте існує велика кількість експериментальних праць, які вказують на негативний вплив глутамату натрію на організм. Наприклад, через чотири тижні дії глутамату натрію на гістологічних препаратах мезентеріальних лімфовузлів спостерігається інтенсивне формування зародкових центрів, посилення проліферації та диференціювання лімфоїдних клітин, спостерігається імуніндукційний ефект з посиленням проліферації активованих лімфоцитів і їх подальшої диференціації в плазматичні клітини [4]. Введення глутамату натрію щурам у неонатальному періоді призводить до руйнування вентромедіального та дугоподібного ядер, порушує передачу лептинового та інсулінового сигналів, що зумовлює нейроендокринні та метаболічні зміни [5]. Резуль-

тати дослідження, проведеного на восьми тижневих щурах на висококалорійній дієті, показали підвищення в крові рівня тригліцеридів, загального холестерину, ліпопротеїнів низької щільності та збільшення ваги [6]. Тому не безпідставним є існування терміну «глутамат-індуковане ожиріння», адже харчова добавка не просто підсилює смак, але і значно збільшує апетит [7, 8]. У свою чергу, сірий горб – структура, яка відповідає за ліпідний обмін, тому є доцільним проаналізувати морфометричні та морфологічні зміни даної структури при тривалому впливі глутамату натрію. Для вивчення морфології пірамідних нейронів та їх відростків, а також для дослідження гліальних клітин та нервових волокон протягом тривалого часу використовують техніку імпрегнації сріблом [9]. Даний метод дає можливість ідентифікувати лише 5–10% усіх нейронів, тоді як решта клітин залишаються незафарбованими. Для забарвлення більшої кількості нейронів, а також для аналізу активності клітин, яка відзначається кількістю хроматофільної речовини, тобто рибосомальної рибонуклеїнової кислоти в грубому ендоплазматичному ретикулумі та полірибосомах використовується забарвлення крезил віолетом (за методом Нісля) та крезил віолетом з люксолем (за методом Клюбара-Баррера) [10].

Мета дослідження.

Аналіз морфологічних та морфометричних параметрів ядер сірого горба гіпоталамуса білого щура при тривалому впливі глутамату натрію в експерименті.

Об'єкт і методи дослідження.

Матеріалом дослідження слугували препарати сірого горба гіпоталамуса білих щурів самців лінії Вістар. Щурам-самцям репродуктивного віку вводили глутамат натрію в дозі 0.07 г/кг/добу перорально

через піпетку один раз на добу з подальшим вільним доступом до їжі протягом доби. Загальну кількість піддослідних тварин (58) було розділено на три групи: I – введення глутамату протягом 6 тижнів (16), II – 8 тижнів (16), III – 10 тижнів (16). Окремо проводився забір біологічного матеріалу 10 щурів у тварин інтактною групи. Виведення тварин з досліду проводили шляхом передозування ефірного наркозу (попередньо не годувавши одну добу). Після трепанатії черепа, відпрепарований головний мозок фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну. Після ретельного промивання, дегідратацію проводили етанолом концентрацією 80%, 90%, 100%, поміщали в суміш спирт-ксилол (1:1) та о-ксилол, ксилол-парафінову суміш (+37°C) та гомогенізовану парафінову суміш (Leica Microsystems) з температурою плавлення +56°C.

Зрізи виготовляли серійно у сагітальній та фронтальній площинах на санному мікротомі (MC-2), товщина зрізів – 5 мкм. Зрізи забарвлювали гематоксином та еозином, крезил віолетом, комбінацією крезил віолету та люксолу, а також проводили імпрегнацію сріблом. Фотографування гістологічних препаратів здійснювали на мікроскопі ZEISS Primo Star 3, з допомогою кольорової цифрової камери Axiocam 208 та програмного забезпечення Zen ZEISS.

Вимірювання поздовжніх і поперечних розмірів перикаріонів клітин та їх ядер проводили за допомогою спеціалізованої морфометричної програми Zen ZEISS. Об'єм клітин та ядер визначали за формулою:

$$V = \frac{\pi ab^2}{6}$$

Таблиця – Морфометричні параметри клітин ядер сірого горба гіпоталамуса контрольних тварин та за умов впливу глутамату натрію ($M \pm m$)

Параметри Тип нейрона	Пірамідний нейрон		Овальний нейрон	
	Контрольна група ($M \pm m$)	10 тижнів ($M \pm m$)	Контрольна група ($M \pm m$)	10 тижнів ($M \pm m$)
Об'єм нейрона	271,13±11,8	589,46±25,69*	71,12±5,34	331,84±28,94*
Об'єм ядра нейрона	90,86±3,98	231,73±16,6*	30,22±2,44	178,33±20,03*

Примітка: * – статистично достовірна відмінність при рівні значущості $p \leq 0,001$.

де V – об'єм клітини або ядра; a – поздовжній діаметр (найбільша вісь) клітини або ядра проведена через ядерце; b – поперечний діаметр (найменша вісь) клітини або ядра проведена через ядерце.

Для визначення топографії досліджуваних структур використовували стереотаксичний атлас мозку щура [11]. Для написання статті обрано результати на початку і на 10 тижнів експерименту.

Усі дослідження проведено з дотриманням основних положень GCP (1996), Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (від 04.04.1997), Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964-2013), наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009, № 616 від 03.08.2012 і «Порядку вилучення біологічних об'єктів від померлих, тіла яких підлягають судово-медичній експертизі і патологоанатомічному дослідженню, для наукових цілей», вимог гуманного ставлення до піддослідних тварин, регламентованих Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) та Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовують-

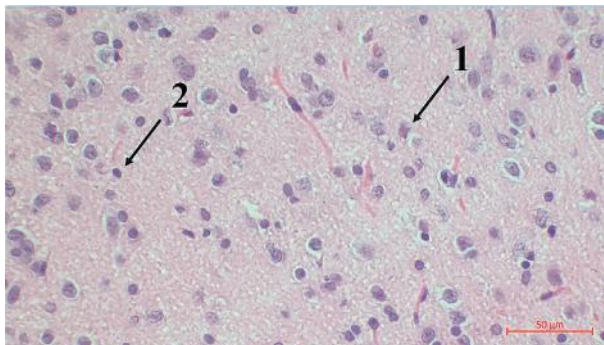


Рисунок 1 – Цитоархітектоніка сірого горба гіпоталамуса (контрольна група). Мікрофотографія. Забарвлення гематоксином та еозином. 36.: x 400. Позначення: 1 – пірамідний нейрон; 2 – овальний нейрон.

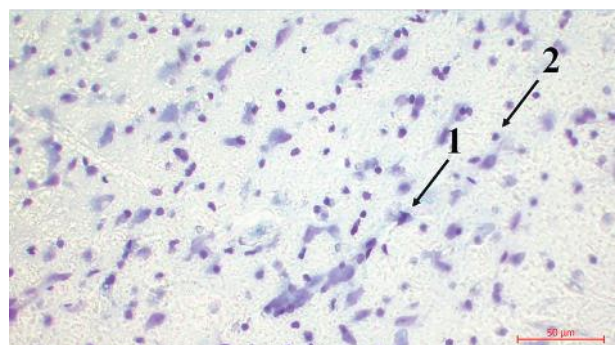


Рисунок 2 – Цитоархітектоніка сірого горба гіпоталамуса (контрольна група). Мікрофотографія. Забарвлення крезил віолетом методом Нісля. 36.: x 400. Позначення: 1 – пірамідний нейрон; 2 – овальний нейрон.

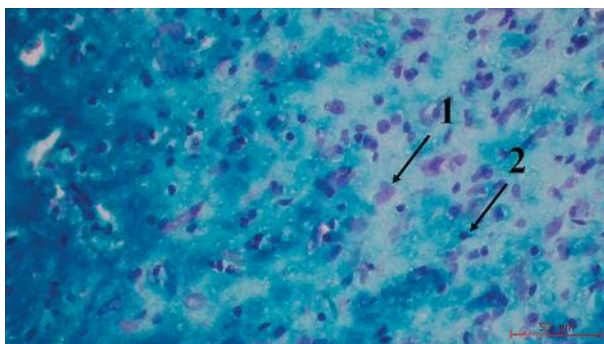


Рисунок 3 – Цитоархітектоніка сірого горба гіпоталамуса (контрольна група). Мікрофотографія. Забарвлення крезил віолетом та люксолом за методом Клувер-Барерра. 36.: x 400. Позначення: 1 – пірамідний нейрон; 2 – овальний нейрон.

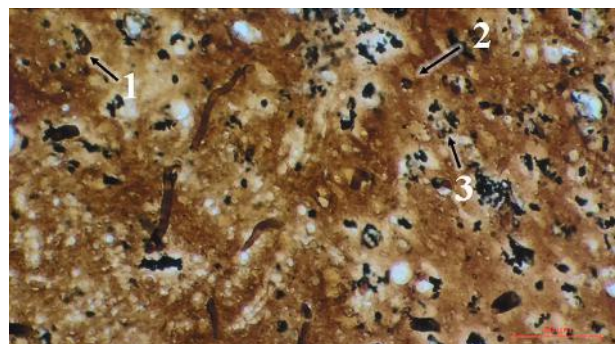


Рисунок 4 – Цитоархітектоніка сірого горба гіпоталамуса (контрольна група). Мікрофотографія. Імпрегнація сріблом. 36.: x 400. Позначення: 1 – пірамідний нейрон; 2 – овальний нейрон; 3 – мікроглія.

ся для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986 р.).

Результати дослідження.

У тварин інтактної групи структура сірого горба гіпоталамуса відповідала видовій нормі. Сірий горб – серединна конусоподібна ділянка, що знаходиться між соскоподібними тілами і перехрестям зорового нерва. На гістологічному рівні сірий горб включає клітини вентромедіального (VMH), дорсомедіального (DMH) і дугоподібних ядер (Arc).

Ядра сірого горба утворені нейронами двох типів (рис. 1). Перший тип – нейрони пірамідної форми, хаотично розташовані, трапляються найчастіше, добре зафарбовані. Мають великий перикаріон, об'єм якого становить $271,13 \pm 11,8 \text{ мкм}^3$ та велике кругле з одним ядерцем ядро, об'ємом $90,86 \pm 3,98 \text{ мкм}^3$ (табл.). В ядрі можна чітко розрізнити еухроматин та гетерохроматин. Другий тип – нейрони овальної форми, які також добре зафарбовані, трапляються дещо рідше. Об'єм перикаріону нейронів другого типу становить $71,12 \pm 5,34 \text{ мкм}^3$. Ядра цих клітин круглі, добре зафар-

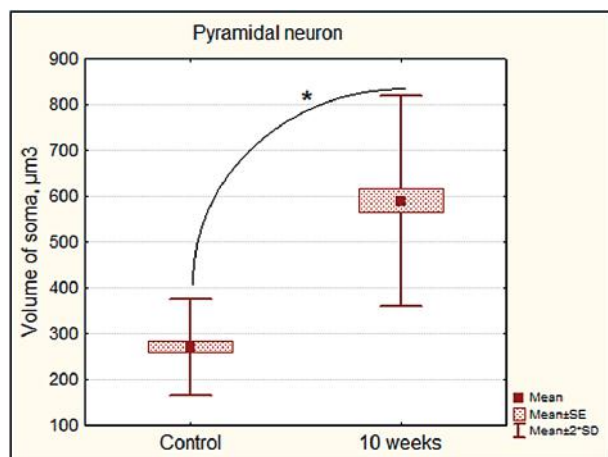


Рисунок 5 – Морфометричні параметри пірамідного нейрона сірого горба гіпоталамуса щура на початку експерименту та через 10 тижнів введення глутамату натрію (об'єм перикаріону, мкм^3).

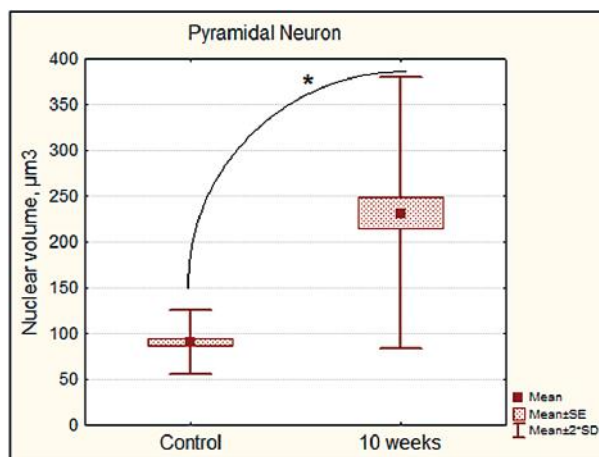


Рисунок 6 – Морфометричні параметри пірамідного нейрона сірого горба гіпоталамуса щура на початку експерименту та через 10 тижнів введення глутамату натрію (об'єм ядра, мкм^3).

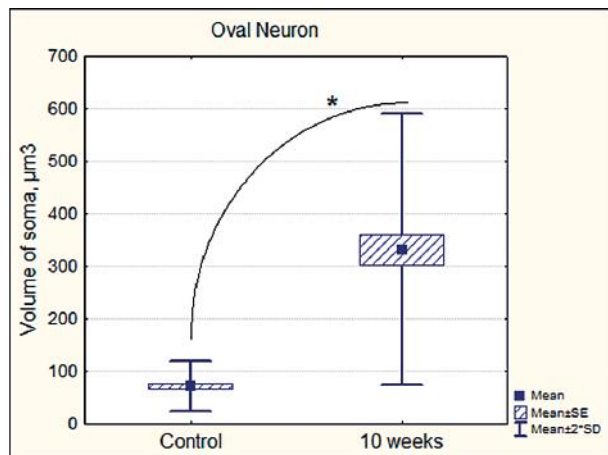


Рисунок 7 – Морфометричні параметри овального нейрона сірого горба гіпоталамуса щура на початку експерименту та через 10 тижнів введення глутамату натрію (об'єм перикаріону, мкм^3).

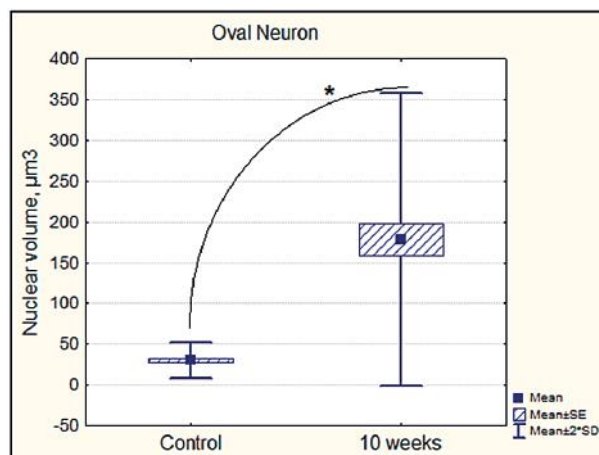


Рисунок 8 – Морфометричні параметри овального нейрона сірого горба гіпоталамуса щура на початку експерименту та через 10 тижнів введення глутамату натрію (об'єм ядра, мкм^3).

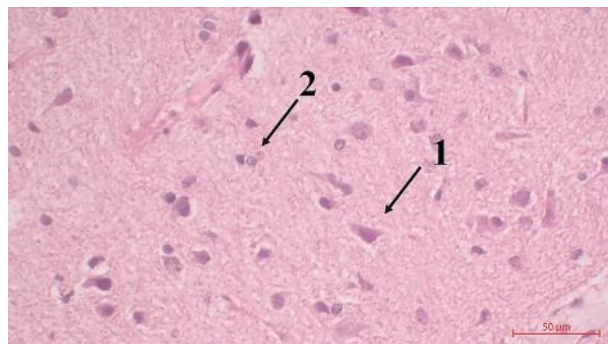


Рисунок 9 – Цитоархітектоніка сірого горба гіпоталамуса (введення глутамату натрію протягом 10 тижнів). Мікрофотографія. Забарвлення гематоксилином та еозином. 36.: x 400. Позначення: 1 – пірамідний нейрон; 2 – овальний нейрон.

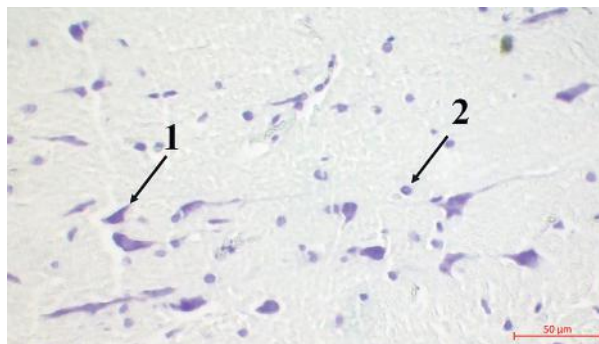


Рисунок 10 – Цитоархітектоніка сірого горба гіпоталамуса (введення глутамату натрію протягом 10 тижнів). Мікрофотографія. Забарвлення крезил віолетом методом Нісля. 36.: x 400. Позначення: 1 – пірамідний нейрон; 2 – овальний нейрон.

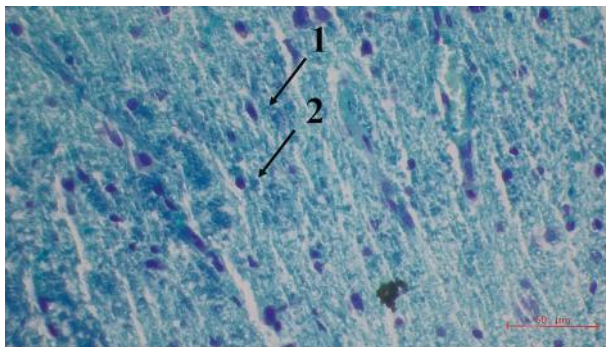


Рисунок 11 – Цитоархітектоніка сірого горба гіпоталамуса (введення глутамату натрію протягом 10 тижнів). Мікрофотографія. Забарвлення крезил віолетом та люксолом за методом Клювер-Баррера. 36.: х 400. Позначення: 1 – пірамідний нейрон; 2 – овальний нейрон.

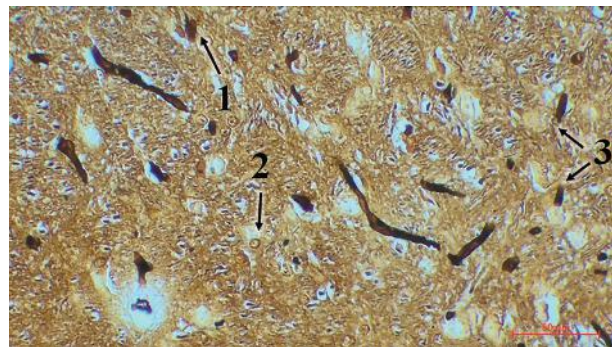


Рисунок 12 – Цитоархітектоніка сірого горба гіпоталамуса (введення глутамату натрію протягом 10 тижнів). Мікрофотографія. Імпрегнація сріблом. 36.: х 400. Позначення: 1 – пірамідний нейрон; 2 – овальний нейрон; 3 – мікроглія.

бовані та мають більший відносний об'єм у порівнянні із клітинами першого типу. Об'єм ядер нейронів другого типу становить $30,22 \pm 2,44 \text{ мкм}^3$. При вивченні нейронів за методом Нісля (забарвлення крезил віолетом, **рис. 2**) та Клювера-Баррера (забарвлення комбінацією крезил віолету та люксолу, **рис. 3**), відмічаємо, що овальний нейрон – чіткої овальної форми з особливою темною субстанцією Нісля, пірамідний нейрон – великий, проте дещо світліший. При проведенні імпрегнації сріблом нейрони добре забарвлені, зі світлим ядром та забарвленим ядерцем, спостерігаємо велику кількість відростків, мікроглія дрібно-зерниста та розгалужена (**рис. 4**).

Після 10-ти тижневого введення глутамату натрію в мікроскопічній картині домінують нейрони, що знаходяться в стані набряку, спостерігаємо їх поодинокі загибель, що фагоцитуються гліальними елементами (нейрофагія). Об'єм перикаріону пірамідного нейрону становить $589,46 \pm 25,69 \text{ мкм}^3$ (**рис. 5**, $p < 0,001$), ядра – $231,73 \pm 16,6 \text{ мкм}^3$ (**рис. 6**, $p < 0,001$); об'єм перикаріону овального нейрону становить $331,84 \pm 28,94 \text{ мкм}^3$ (**рис. 7**, $p < 0,001$), ядра – $178,33 \pm 20,03 \text{ мкм}^3$ (**рис. 8**, $p < 0,001$). Об'єктивно, клітини збільшені в розмірі (**рис. 9**), контури їх заокруглені (**рис. 10**). Ядра клітин також набрякають, деякі приймають ексцентричне положення в цитоплазмі. Трапляються клітини як зі світлими, так і з різко зафарбованими неправильної форми ядрами, поодинокі ядра в стані каріолізісу та каріорексісу (**рис. 11**). Кількість хроматофільної субстанції зменшується, мікроглія локально ущільнюється і накопичується, аксони обох нейронів значно стоншені (**рис. 12**), що разом у комплексі свідчить про дегенеративні зміни.

Обговорення результатів дослідження.

Отримані нами результати дослідження підтверджують, що в тварин інтактної групи структура сірого горба гіпоталамуса відповідає видовій нормі [12, 13], тривале введення глутамату натрію щурам в експерименті веде до значних деструктивних змін клітин ядер сірого горба гіпоталамуса. При аналізі морфо-

логічних та морфометричних параметрів відмічаємо достовірне збільшення розмірів перикаріону та ядер нейронів ($p < 0,001$), з'являються ядра неправильної форми, зменшується кількість хроматофільної субстанції, що свідчить про ущільнення мікроглії [14], аксони стоншуються. Такі ж зміни було відмічено при вивченні нейронів кори великих півкуль головного мозку в умовах впливу на організм солей важких металів [15]. Схожі дегенеративні пошкодження ядер гіпоталамуса відмічено в іншому експериментальному дослідженні глутамат-індукованого ожиріння у щурів [16]. Відмічено каріорексис та каріолізіс у клітинах і при вивченні структурних змін лімфатичних вузлів при тривалому впливі глутамату натрію [17].

Висновки.

При тривалому введенні глутамату натрію нейрони сірого горба гіпоталамуса щура значно збільшуються в розмірах (як перикаріон, так і ядро), відмічається поодинокі загибель нейронів, зміни форми ядер клітин, стоншення аксонів.

Комбіноване використання таких методів забарвлення як гематоксиліном та еозином, крезил віолетом, крезил віолетом та люксолом, а також імпрегнація сріблом дає можливість у повній мірі описати зміни компонентів сірого горба гіпоталамуса при тривалому впливі глутамату натрію.

Морфологічні та морфометричні параметри клітин сірого горба гіпоталамуса білого щура після 10-ти тижневого впливу глутамату натрію можуть слугувати підґрунтям для розуміння механізмів розвитку змін структурних компонентів вказаного органу.

Перспективи подальших досліджень.

Отримані дані дозволять створити моделі впливу глутамату натрію на сірий горб гіпоталамуса з метою пошуку шляхів профілактики та лікування патологічних станів даної структури.

References / Література

1. Bulyk R, Bulyk T, Smetaniuk O, Vlasova K, Kryvchanska M. Efekty melatoninu na shchilnist melatoninovykh retseptoriv u nadzorovomu yadri hipotalamusa shchuriv za umov stresu. Visnyk problem biologii i medytyny. 2021;3(161):2458. DOI: [10.29254/2077421420213161245248](https://doi.org/10.29254/2077421420213161245248). [in Ukrainian].
2. May A, Burstein R. Hypothalamic regulation of headache and migraine. Cephalalgia. 2019;39(13):1710-1719. DOI: [10.1177/0333102419867280](https://doi.org/10.1177/0333102419867280).
3. Burfeind KG, Michaelis KA, Marks DL. The central role of hypothalamic inflammation in the acute illness response and cachexia. Semin Cell Dev Biol. 2016;54:42-52. DOI: [10.1016/j.semcdb.2015.10.038](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.038).
4. Harapko T, Mateshuk-Vatseba L, Goncharuk-Khomyn M, Bekesevych A, Lytvak Yu. Changes in the Structural Organization of Lymph Nodes and Biochemical Indicators of Blood Due to the Action of Sodium Glutamate. Journal of International Dental and Medical Research. 2020;13(4):1578-84.
5. Konopelniuk V, Prybytko I, Tsyriuk O, Falalieieva T. Pathophysiological characteristics of the experimental model of obesity in female rats caused by neonatal administration of monosodium glutamate. Scientific Journal «ScienceRise: Biological Science». 2016;3(3):14-8.
6. De Farias T, Cruz M, De Sa R, Severi I, Perugini J, Senzacqua M, et al. Melatonin supplementation decreases hypertrophic obesity and inflammation induced by highfat diet in mice. Front Endocrinol. 2019;10:750.
7. Bhandari U. Effect of Embelin in Monosodium Glutamate Induced Obesity in Male Neonatal Wistar Rats. Atheroscler. Suppl. 2018;32:e138. DOI: [10.1016/j.atherosclerosissup.2018.04.423](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosissup.2018.04.423).
8. Krynytska I, Marushchak M, Naumova L, Mazur L. The Toxic Impact of Monosodium Glutamate in Rats. J Med J. 2019;53(2):91-101.
9. Joseph S, Werner H, Stegmüller J. Gallyas silver impregnation of myelinated nerve fibers. Bio Protocol. 2019;9:e3436. DOI: [10.21769/BioProtoc.3436](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3436).
10. Pyavchenko G, Shmarkova L, Nozdryn V. Changes in the number of neurons in the rat motor cortex and movement activity with age. Neurosci. Behav. Phys. 2016;46:270-273. DOI: [10.1007/s11055-016-0228-7](https://doi.org/10.1007/s11055-016-0228-7).
11. George Paxinos, ed. The Rat Nervous System. Third Edition. Academic Press; 2004. 1309 p. DOI: [10.1016/B978-0-12-547638-6.X5000-7](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-547638-6.X5000-7).
12. Schröder H, Moser N, Huggenberger S. Neuroanatomy of the Mouse Springer International Publishing; 2019. 350 p. DOI: [10.1007/978-3-030-19898-5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-19898-5).
13. Vashcheniuk M. Peculiarities of hypothalamic nuclei microstructure of the white rat under the effect of sodium glutamate and its absence. Art of Medicine. 2024;1(29):26-32. DOI: [10.21802/artm.2024.1.29.26](https://doi.org/10.21802/artm.2024.1.29.26).
14. Felsky D, Roostaei T, Nho K, Risacher SL, Bradshaw EM, Petyuk V, et al. Neuropathological correlates and genetic architecture of microglial activation in elderly human brain. Nat Commun. 2019;10(1):409. DOI: [10.1038/s41467-018-08279-3](https://doi.org/10.1038/s41467-018-08279-3).
15. Hryntsova, NB, Romaniuk AM. Morfometrychni zminy neuroniv kory velykykh pivkul holovnoho mozku v umovakh vplyvu na orhanizm solei vazhkykh metaliv. Aktualni pytannia eksperymentalnoi ta klinichnoi medytyny. 2007;1:68-69. [in Ukrainian].
16. Yannick B, Esther Ngo Lemba T, Albert Donatien A, Christian B, Théophile D. Effects of stem bark aqueous extract of Fagara tessmannii Engl (Rutaceae) on cardiovascular risks related to monosodium glutamate-induced obesity in rat: In vivo and in vitro assessments. Journal of Ethnopharmacology. 2020;260:112972. DOI: [10.1016/j.jep.2020.112972](https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112972).
17. Harapko T, Mateshuk-Vatseba L. Effects of MSG on the lymph nodes of the albino rat: Ultrastructural and morphometric studies. Eur J Anat. 2021;25(1):75-81.

ГІСТОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ЯДЕР ГІПОТАЛАМУСА ПРИ ТРИВАЛОМУ ВПЛИВІ ГЛУТАМАТУ НАТРІЮ

Ващенко М. І.

Резюме. «Глутамат-індуковане ожиріння» є однією з актуальних тем і привертає увагу наукової спільноти в контексті здоров'я та харчування. Глутамат натрію, відомий також як мононатрієва сіль глутамінової кислоти, є харчовою добавкою і застосовується для підсилення смаку. Ця речовина широко використовується в харчовій промисловості, зокрема у фаст-фуді, консервах та багатьох готових продуктах. Глутамат може впливати на апетит, збільшуючи бажання вживання висококалорійної їжі. У майбутньому така харчова поведінка призведе до збільшення маси тіла.

Одним із механізмів, що може пояснити цей ефект, є вплив глутамату на центральну нервову систему, особливо на сірий горб гіпоталамуса, так як останній відповідає за ліпідний обмін. Метою роботи є аналіз структурних змін компонентів ядер сірого горба гіпоталамуса при тривалому впливі глутамату натрію в експерименті. Матеріал дослідження представлений мікропрепаратами сірого горба гіпоталамуса двох груп білих щурів самців лінії Вістар вагою 218-260 г (інтактних та експериментальних). Зафарбовування гістологічних зрізів проводили гематоксиліном та еозином, крезил віолетом, комбінацією крезил віолету та люксолу, а також проводили імпрегнацію сріблом, після чого вивчали особливості мікроскопічної будови компонентів сірого горба гіпоталамуса за умови 10-ти тижневого введення глутамату натрію у порівнянні з інтактними тваринами. Результати дослідження дозволили описати особливості цитоархітекτονіки сірого горба, його міроморфологічну характеристику у контролі та експерименті. Після 10-ти тижневого введення глутамату натрію в мікроскопічній картині домінують нейрони, що знаходяться в стані набряку, спостерігаємо їх поодинокі загибель, фрагменти нейронів фагоцитуються гліальними елементами (нейронофагія). Морфометричний аналіз показав достовірне збільшення об'єму як перикаріону, так і ядра нейронів сірого горба гіпоталамуса. Висновки. Тривале споживання глутамату натрію зумовлює глибокі структурні зміни ядер гіпоталамуса. Морфологічні та морфометричні особливості ядер сірого горба гіпоталамуса білого щура за тривалого впливу глутамату натрію можуть слугувати підґрунтям для розуміння механізмів розвитку змін структурних компонентів вказаної ділянки головного мозку.

Ключові слова: нервова система, сірий горб, гіпоталамус, глутамат натрію, білий щур.

HISTOLOGICAL CHANGES OF HYPOTHALAMIC NUCLEI UNDER THE LONG-TERM INFLUENCE OF MONOSODIUM GLUTAMATE

Vashcheniuk M. I.

Abstract. "Glutamate-induced obesity" is one of the most popular current topics and attracts the attention of the scientific community in the context of health and nutrition. Monosodium glutamate is a food additive and used as taste enhancer. This substance is widely used in the food industry, mostly fast food. Glutamate can increase the appetite, the desire to eat high-calorie foods. In the future, this eating behavior can lead to obesity.

One of the mechanisms that can explain this effect is the influence of glutamate on the central nervous system, especially on the tuber cinereum of the hypothalamus, that is responsible for lipid metabolism. The purpose of

the work is to analyze the structural changes in the components of the nuclei of the tuber cinereum of the hypothalamus during long-term exposure to monosodium glutamate in the experiment. The material is represented by micropreparations of the tuber cinereum of the hypothalamus of two groups of white male Wistar rats weighing 218-260 g (intact and experimental). Staining of histological sections was carried out with hematoxylin and eosin, cresyl violet, a combination of cresyl violet and luxol, as well as impregnation with silver, after which the peculiarities of the microscopic structure of the components of the tuber cinereum of the hypothalamus were studied under the condition of 10-week monosodium glutamate administration in comparison with intact animals. The results of the study made it possible to describe the features of cytoarchitectonics of the tuber cinereum, its micromorphological characteristics in control and experiment. After a 10-week administration of monosodium glutamate, the microscopic picture is dominated by neurons in a state of edema, we observe their individual death, fragments of neurons are phagocytosed by glial elements (neuronophagy). Morphometric analysis showed a significant increase in the volume of both the perikaryon and the nucleus of neurons of the tuber cinereum. Conclusions. Long-term administration of monosodium glutamate leads to deep structural changes in the hypothalamic nuclei. Morphological and morphometric features of the nuclei of the tuber cinereum of the hypothalamus of a white rat under long-term exposure to monosodium glutamate can serve as a basis for understanding the mechanisms of the structural components changes development of the specified area of the brain.

Key words: nervous system, tuber cinereum, hypothalamus, monosodium glutamate, white rat.

ORCID and contributionship: / ORCID автора та його внесок до статті:

Vashcheniuk M. I.: <https://orcid.org/0000-0002-6220-2586> ^{ABCDEF}

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Vashcheniuk Mariia Ihorivna / Ващенко Марія Ігорівна

Danylo Halatsky Lviv National Medical University / Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Ukraine, 79010, Lviv, 69 Pekarska str. / Адреса: Україна, 79010, м. Львів, вул. Пекарська 69

Tel.: +380961430694 / Тел.: +380961430694

E-mail: mariia.vashcheniuk@gmail.com

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article. / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статистичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Received 16.01.2024 / Стаття надійшла 16.01.2024 року

Accepted 26.04.2024 / Стаття прийнята до друку 26.04.2024 року

DOI 10.29254/2077-4214-2024-2-173-367-373

UDC 616.36-089.87-06.616-91]-092.9

Hnatyuk M. S., Cholach S. Yu., Tatarchuk L. V., Stets N. Ya.

AGE CHANGES IN MASOMETRICAL PARAMETERS OF HEART PARTS IN EXPERIMENTAL ANIMALS WITH COBALT INTOXICATION

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University (Ternopil, Ukraine)

hnatjuk@tdmu.edu.ua

Cardiovascular disease is a significant medical and social problem today. Despite the progress in the diagnosis, correction and prevention of heart disease, morphologists and clinicians continue to study the structure and function of the heart.

We studied the mass parameters of heart parts of 120 laboratory mature white male rats, which were divided into four groups. The first group consisted of 30 intact six-month-old experimental animals, the second group consisted of 30 similar 24-month-old male laboratory rats, the third group consisted of 30 six-month-old experimental animals injected with cobalt chloride, and the fourth group consisted of 30 24-month-old rats with cobalt chloride intoxication. The chemical agent was administered daily intragastrically to rats at 4 mg/kg for 30 days. The animals were euthanised by bleeding under thiopental anaesthesia. Mass parameters of the left and right ventricles and atria, interventricular and atrial septa, and the ratio between the masses of the heart chambers were determined. Quantitative data were processed statistically.

It was found that the intoxication of experimental animals with cobalt chloride led to uneven, disproportionate hypertrophy of heart parts, accompanied by an increase in their mass parameters. The administration of cadmium chloride to experimental animals led to a dominant rise in the mass of the left ventricle and left atrium in 24-month-old rats, which was confirmed by a decrease in the ventricular index by 9.6%, an increase in the Fulton index by 6.0%, and an increase in the atrial index by 4.3%.

The studies conducted and the results obtained indicate that intoxication of laboratory white male rats with cobalt chloride leads to an uneven, disproportionate increase in the masses of heart parts. This is confirmed by the rise in the mass parameters of the ventricles and atria, Fulton and atrial indices, and a decrease in the ventricular index. The most pronounced mass changes dominated the left ventricle and left atrium of 24-month-old experimental animals.

Key words: parts of the heart, age-related changes, mass parameters, cobalt chloride.