

MONOSODYUM GLUTAMAT İLE İNDÜKLENMİŞ HİPOKAMPAL HASARDA OMEGA-3 YAĞ ASİTLERİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF OMEGA-3 FATTY ACIDS ON
MONOSODIUM GLUTAMATE-INDUCED HIPPOCAMPAL INJURY

Hayrunnisa YEŞİL SARSMAZ¹, Seren Gülşen GÜRGEN²

¹ Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Ebelik Bölümü, Histoloji ve Embriyoloji, Manisa, TÜRKİYE

² Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Histoloji ve Embriyoloji, Manisa, TÜRKİYE

Cite this article as: Sarsmaz HY, Gürgen SG. Investigation of the Protective Effect of Omega-3 Fatty Acids on Monosodium Glutamate-Induced Hippocampal Injury. Med J SDU 2024; 31(1): 21-29.

Öz

Amaç

Monosodyum glutamat (MSG) birçok hazır besinin içine katılan ve beyinde nöronlar üzerine eksitotoksik olduğu bilinen lezzet artırıcıdır. Çalışmanın amacı çocukluk dönemindeki ratların hipokampus bölgele- rindeki nöronlarda, MSG'nin olası toksik etkisine kar- şı eikosapentaenoik asit (EPA) ve beyin gelişiminde etkili olan dokosaheksaenoik asit (DHA)'in koruyucu etkilerine rağmen beyinde oluşan nöral hasarın immü- nohistokimyasal incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem

Her bir grupta çocukluk döneminde olan 4 hafta- lık, 170-205 gr ağırlığında 6 adet, toplam 24 Wistar albino dişi ratlar kullanılacaktır.

1. Grup: Kontrol grubu (0,9 % saline solution 1.3.5.7.9. günler subcutan (sc) verildi,
2. Grup: MSG uygulanan (4 mg/g 1.3.5.7.9. günler sc),
3. Grup: MSG + EPA uygulanan (4 mg/g 1.3.5.7.9. günler sc + 300 mg/kg 9 gün oral),
4. Grup: MSG + DHA uygulanan (4 mg/g 1.3.5.7.9.

günler sc + 300 mg/kg 9 günler oral), 9. Günün so- nunda beyin dokularının hipokampus CA1 bölgesinde immünohistokimya ve TUNEL tekniği uygulaması için %10 luk nötral formalin içine alınacaktır.

Bulgular

Çocukluk dönemindeki dişi ratların beyinlerinin hippo- kampüs CA1 bölgesi incelendiğinde, S100 β immuno- reaktivitesi MSG grubunda diğer gruplara göre kuvvet- li ve anlamlı reaksiyon gösterdi (p=0,000). MSG+EPA ve MSG+DHA grupları arasında fark anlamsız olduğu izlendi (p<0,05). GFAP immunoreaktivitesi yine MSG grubunda diğer gruplara göre kuvvetli ve anlamlı re- aksiyon gösterdi (p=0,000). MSG+EPA ve MSG+DHA grupları hem kendi aralarında hemde kontrol grubu ile karşılaştırmalarında fark anlamsız olduğu gözlemlendi (p<0,05). MSG grubunda nöroglial hücrelerde kuvvet- li TUNEL pozitif reaksiyon gösterdi. Kontrol grubun- da TUNEL boyama reaksiyonu zayıftı. MSG-EPA ve MSG-DHA gruplarında tüm alanlarda hipokampal nöronlarda TUNEL boyama reaksiyonunda azalma saptandı. MSG+EPA ve hem kontrol grubu arasında hem de MSG+DHA grupları arasında TUNEL boyama reaksiyonunda anlamlı bir fark gözlenmedi (p>0,05).

Sorumlu yazar ve iletişim adresi / Corresponding author and contact address: H.Y.S. /sarsmaznisa@gmail.com

Müracaat tarihi/Application Date: 03.05.2023 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 30.12.2023

ORCID IDs of the authors: H.Y.S: 0000-0002-9790-1723; S.G.G: 0000-0002-5514-1404

Sonuç

MSG, beyinde hipokampus CA1 bölgesinde, S100 β , GFAP ve TUNEL pozitif ekspresyonunda artışa neden olurken, MSG-EPA ve MSG-DHA hipokampal nöronlarda nöronal ekspresyonlarda ve apoptozisde azalmaya neden olmuştur. Bu nedenle çocukluk döneminde MSG'nin Omega-3 yağ asitleri ile birlikte kullanımının nöroglial hasarlanma ve apoptozisten koruyucu etkisi olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: GFAP, MSG, Omega-3, S100 β , TUNEL

Abstract**Objective**

Monosodium glutamate (MSG) is a flavor enhancer that is added to many ready-to-eat foods and is known to be excitotoxic to neurons in the brain. The aim of the study is to investigate immunohistochemically the neural damage that occurs in the neurons in the hippocampus regions of childhood rats, despite the protective effects of eicosapentaenoic acid (EPA) against the possible toxic effects of MSG and docosahexaenoic acid (DHA), which is effective in brain development.

Material and Method

A total of 24 Wistar albino rats will be used as 6 females in childhood in each group.
Group 1: Control group (0.9 % saline solution 1.3.5.7.9. days subcutaneous (sc),
Group 2: MSG administered (4 mg/g 1.3.5.7.9. days sc),
Group 3: MSG + EPA administered (4 mg/g 1.3.5.7.9. days sc + 300 mg/kg 9 days orally),
Group 4: MSG + DHA applied (4 mg/g 1.3.5.7.9. days sc + 300 mg/kg 9 days orally), at the end of the 9th

day, the brain tissues will be placed in 10% neutral formalin for immunohistochemistry and TUNEL technique application in the hippocampus CA1 region.

Results

When the hippocampus CA1 region of the brains of childhood rats was examined, S100 β immunoreactivity showed a strong and significant reaction in the MSG group compared to the other groups ($p=0.000$). It was observed that the difference between MSG+EPA and MSG+DHA groups was insignificant ($p<0.05$). GFAP immunoreactivity also showed a strong and significant reaction in the MSG group compared to the other groups ($p=0.000$). It was observed that the difference between MSG+EPA and MSG+DHA groups was insignificant both in comparison with each other and with the control group ($p<0.05$). In the MSG group, TUNEL showed a strong positive reaction in neuroglial cells. Expression was weak in the control group. TUNEL staining reaction was weak in the control group. A decrease in TUNEL staining reaction was detected in hippocampal neurons in all areas in the MSG-EPA and MSG-DHA groups. No significant difference was observed in the TUNEL staining reaction between MSG+EPA and both the control group and the MSG+DHA groups ($p>0.05$).

Conclusion

While MSG caused an increase in the positive expression of S100 β , GFAP and TUNEL in the hippocampus CA1 region of the brain, MSG-EPA and MSG-DHA caused a decrease in neuronal expression and apoptosis in hippocampal neurons. Therefore, it was concluded that the use of MSG together with Omega-3 fatty acids in childhood may have a protective effect against neuroglial damage and apoptosis.

Keywords: GFAP, MSG, Omega-3, S100 β , TUNEL

Giriş

Limbik sistemin bir parçası olarak hipokampus, hafıza bağımlılık ve bilişsel süreçlerden sorumludur. Hipokampal disfonksiyon birçok merkezi sinir sistemi (MSS) hastalıklarıyla ilişkili olabilmektedir. Örneğin; Alzheimer hastalığı, hafıza kaybı, epilepsi gibi hastalıklar (1-3).

Monosodyum glutamat (MSG) ise, esansiyel olmayan bir amino asit olan glutamik asitin sodyum tuzudur (4). Günümüzde lezzeti arttırmak amacıyla hazır yiyecek

ve hazır paketli gıdalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (5,6).

Bir gıda maddesi olarak kullanılmasına rağmen aşırı glutamat varlığı, geri dönüşü olmayan hücre hasarına ve hücre ölümüne kadar devam eden aşırı uyarılmaya yol açar. Serebral korteksteki glutamatın bolluğu hafıza ve öğrenme dahil olmak üzere bilişsel işlevlerde önemli rolü olduğunu gösterir. İşte tam da bu nedenle MSG'nin nöronlar üzerindeki etkileri endişe verici bir konu haline gelmiştir. Birçok çalışmada, yüksek doz parenteral uygulanan MSG'in (1-4

mg/g) neonatal periyottaki preoptik nükleuslarda, arkuat nükleuslarda, sirkum ventrikular organlarda ve hipokampüsteki nöronlarda lezyonlara neden olduğunu göstermiştir (7,8). Deney hayvanları neonatal dönemin ilk 10 günü süresince MSG enjeksiyonuna etkin kaldıklarında yetişkinlikleri süresince çeşitli obezite, büyüme geriliği, fertilitenin azalması gibi nöroendokrin hastalıklarla karşı karşıya kaldıkları bilinmektedir (9). Temel uyarıcı nörotransmitter olarak Glutamat (Glu), hipokampüsün uygun nöronal gelişimi ve aktivitesinde bulunur (9,10). Glu, uzun süreli bir potansiyalizasyon durumunda sinaptik inhibisyonda yer alır. Ayrıca, nöronal plastisite ve sinaptogenezde rol oynar. Gelişmekte olan beyinde, migrasyonu, farklılaşmayı, nöronal sağ kalımı ve ölüm tetikler (9-11).

Oldukça ciddi zararlarına rağmen hala çok yaygın kullanılan MSG'in etkilerinden korunabilmek için alternatif yöntemler hala üretilmemiştir. Ancak çeşitli nörotoksik etkilere karşı alternatif yaklaşımlar çeşitli yağ asidi destekleriyle sağlanabilmektedir. Nöral hasarda olumlu etkileri bilinen Omega 3 yağ asitlerinden dokosaheksaenoik asit (DHA) ve eikosapentaenoik asit (EPA), hücre zarı yapısı ve işlevlerinde etkili ve sağlık için oldukça önemli bir yağ asitleridir. EPA ve DHA beyin gelişimi ve fonksiyonlarının yürütülmesinde, sinir sisteminin önemli bir bileşenidir (12-14).

Bu nedenle bu çalışmada, sinir sistemi hasarını gözlemleyebilmek için astrosit reaktivitesi incelenmiştir. Bilinen üç glia reaksiyon aşaması bulunmaktadır. İlk aşamada (doğrudan aşama) iyonların ve nörotransmitter seviyelerinin düzenlenmesi ile ekstrasellüler çevrenin değiştirilmesi eğilimi vardır. Birkaç saat sonra ise, erken reaksiyonların ikinci aşaması gelişir. Glia hücreleri reaktif sentez ile kendini gösterir ve (glial fibrillary acidic protein) GFAP ve S100 β gibi çeşitli proteinlerin ekspresyonunu artırırlar. GFAP, ara glial filamentleri oluşturan sitoplazmik bir proteindir. Yapısal kararlılığı, hareketliliği ve astrositik süreçlerin hücresel mitotik aktivitesini etkiler (15-18). S100 β, santral sinir sisteminde glia hücre kaybı göstergesi olarak kullanılır. Aynı zamanda vücutta kalsiyumu bağlama fonksiyonu bulunur. Merkezi sinir sisteminde oluşan hasarlanma sonrasında iyileşme sürecinde görev alır. Vücutta temel olarak S100β astroglial ve Schwann hücrelerinde bulunmaktadır (19).

Çalışmamızda çocukluk dönemindeki ratlarda, MSG'in beyin hipokampus bölgesinde neden olabileceği nöronal hasar S100β ve GFAP sinyal molekülleri ile karşılaştırmalı olarak incelenerek, apoptotik bulgular TUNEL yöntemi ile ortaya çıkartılmıştır. Nöronal hasarı önleyebilmesi düşüncesiyle uygula-

nan EPA ve DHA'nın koruyucu etkilerinin olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Deney Hayvanı Seçimi ve Etik Onay

Bu çalışmada, çocukluk döneminde (3 haftalık) 24 adet dişi Wistar-albino sıçanlar kullanıldı. Bütün sıçanlar sabit oda Bütün sıçanlar sabit oda sıcaklığında (21-22 °C) 12 saat karanlık/12 saat aydınlık siklusa Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEHAM)'nde bakıldı. Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından (03.01.2023/ E-77637435-050.04.04-461762) sayılı ve numara ile onaylandı.

Deney Protokolü

Bu çalışmada, 3 haftalık (çocukluk) 24 adet dişi Wistar-albino sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar her grupta 6 adet olacak şekilde 4 ayrı gruba ayrıldı;

Grup 1, kontrol, salin solüsyonu (%0,9) verildi (1mL/kg). 1, 3, 5, 7 ve 9. günlerde günde bir kez subkutan (SC) ve 9 gün boyunca sonda ile benzer hacimde mısırsı yağ verildi.

Grup 2, MSG (Sigma Chemical Co.) verildi, (1, 3, 5, 7 ve 9. günlerde SC olarak 4 mg/g) verildi.

Grup 3, MSG + eikosapentaenoik asit (Sigma Chemical Co. CAS No: 86227-47-6) (4 mg/g MSG SC + 300 mg/kg EPA29, 9 gün sondayla) verildi.

Grup 4, MSG + dokosaheksaenoik asit (Sigma Chemical Co. CAS No: 81926-94-5) verildi (4 mg/g MSG SC + 300 mg/kg DHA30, 9 gün boyunca gavaj ile) verildi.

Dokuzuncu gün sabah saat 10:00'da tüm sıçanlar sakrifiye edildi ve sonrasında beyin dokuları hemen çıkarıldı ve akan suda yıkandı. Hipokampus dokusu ikiye bölünerek sağ kısmı histolojik inceleme için %10'luk nötral formalin içine yerleştirildi.

Histolojik Analiz

İmmünohistokimyasal Yöntem

Deneyin dokuzuncu gününün sonunda sıçan hipokampus dokuları toplandı. Doku örnekleri %10'luk nötral formalin solüsyonunda 48 saat bekletildi ve daha sonra rutin protokollere uygun olarak parafin bloklara gömüldü. 5 µm'lik kesitler alabilmek için bir mikrotom kullanıldı ve bunlar daha sonra bir immünohistokimyasal, TUNEL boyamaya tabi tutuldu.

Sakrifiye edilen sıçanlardan temin edilen doku kesitleri bir gece 60 °C' lik etüve konuldu. Daha sonra, iki kez değiştirilmiş olmak üzere 30'ar dakika ksilen ile şeffaflaştırma işlemine tabi tutulmuştur. Ardından %95' ten %60'a azalan derecede alkol serileri ile dehidratasyon sağlanarak distile suda 10 dakika kadar bekletilmiştir. Pap pen ile sınırlandırılan kesitler hemen ardından %0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika bırakılmıştır. Doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük Hidrojen peroksit uygulandı. Üç defa 5' er dakika PBS ile yıkanan kesitler 10 dakika blokama solüsyonu ile muamele edildi. Blokama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar S100β (Thermo Fisher, MA USA cas no:MA1-25005), GFAP (Thermo Fisher, MA USA, cas no: 13-0300), ile bir gece inkübe edilen kesitler ertesi gün PBS ile üç defa yıkanan kesitler, anti-mouserabbit biotinli ikincil antikor ve ardından streptavidin hidrojen peroksidaz ile 30' ar dakika boyandı. Bu iki boyama arasında ve son inkübasyondan sonra kesitler üç defa 5 dakika PBS ile yıkandı. İmmunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla kesitler 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC) ile 5 dakika boyanarak, Çekirdek boyası olarak Mayer'in hematoksilin'i kullanılıp, boyanan camlar lamlar ultramount ile lamelle kapatılıp, Olympus CX31 mikroskopuyla incelenerek fotoğraflandı(20). Fotoğraflarda Leica Q Win Plus analiz sistemi kullanılarak sayımlar yapıldı. Boyamalarda her bir preparatta X400 büyültmede rastgele

beş alan seçilerek hücrelerde boyanan pozitif hücre tutulumlarının yoğunluğuna ve tutulum miktar yüzdesine göre H skoru hesaplandı. Tutulum yoğunluğu semi kantitatif olarak 0 (0, tutulum yok), 1 (+, zayıf immünreaktivite), 2 (+ +, orta düzeyde immünreaktivite), 3 (+ + +, kuvvetli düzeyde immünreaktivite) olarak skorlandı. Tutulum miktar yüzdesi immünreaktivitenin bulunduğu hücre/yapıların toplam hücre/yapılara oranlanması ile; 1 (%0–10 arası, fokal), 2 (%11–50 arası, bölgesel) ve 3 (%51-100 arası, diffüz) olarak skorlandı. Her kesit için IHC boyanma skorlaması, HistoSCORE = ΣPi (i + 1) (i: boyanma derecesi, Pi: tutulum miktar yüzdesi) formülüyle her lam için tek bir sonuç hesaplandı. Elde edilen veriler deney ve kontrol grupları arasında karşılaştırmalı olarak tabloya kaydedildi ve SPSS programına aktarılarak istatistiksel analizleri yapıldı.

TUNEL Yöntemi

Parafini uzaklaştırmak için 60 °C'de 1 saat boyunca preparatlar bekletildi. Ardından 2 kez 15'er dakika ksilol'de tutuldu. Daha sonra sırasıyla etanol serilerinden geçirilen kesitler alkolden arındırılmak amacıyla iki kez 5'er dakika distile sudan geçirildikten sonra 10 dakika 20 µg/ml proteinaz K ile inkübe edilen preparatlar hemen PBS ile yıkandı. Sonra 15 dakika %3'lük hidrojen peroksit (Lab Vision, USA) ile muamele edilen dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Preparatlar PBS ile yıkandı. Ardından 10-15 dakika dengeli tamponda ve 60 dakika 37° C nemli ortamda

Tablo 1 Gruplar arasında S100β, GFAP immünokimyası ve Tunel (apoptozis) boyama sonuçları

Anova HSCORE	Gruplar	N	Mean	Std. Deviation	F	P
S100β	Kontrol	6	29,0000	3,74166	0,004	0,00*
	MSG	6	91,3333	7,65942		
	MSG+EPA	6	37,3333	3,32666		
	MSG+DHA	6	43,0000	3,74166		
GFAP	Kontrol	6	10,1667	2,40139	0,252	0,00*
	MSG	6	48,6667	5,16398		
	MSG+EPA	6	12,1667	2,85774		
	MSG+DHA	6	15,0000	3,74166		
Tunel	Kontrol	6	3,1667	1,16905	0,269	0,00*
	MSG	6	14,6667	1,63299		
	MSG+EPA	6	5,0000	0,89443		
	MSG+DHA	6	6,5000	1,37840		

(*) Gruplar arasında anlamlı farklılıkları ifade eder.

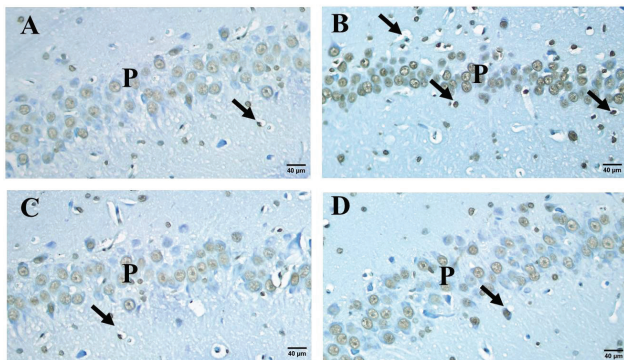
TdT enziminde (77 µL Reaksiyon Buffer + 33 µL TdT Enzim, 1ml TdT enzim) inkübe edildi. Akabinde oda sıcaklığında önceden ısıtılmış durdurma/yıkama tampionunda 10 dakika bekletilen kesitler, Anti-Digoxigenin'de 45 dakika inkübe edildi. TUNEL pozitif hücreleri belirleyebilmek için DAB ile boyanma uygulandı. 5 dk süreyle Zemin boyaması olan Metil yeşili uygulandı. Boyaması yapılan lamalar alkol serilerinden geçirildi ve akabinde 20 dk şeffaflaştırma amacı ile ksilolde bekletildi. Son olarak preparatlar entellan ve lamelle kapatıldı ve CX31 ışık mikroskobu ile fotoğrafları çekildi (Olympus, Tokyo, Japan). Her kesitten rastgele seçilen beş ayrı alan belirlenerek takribi olarak 100 hücre kadar sayıldı. Net bir şekilde kahverengi boyanan hücreler 'TUNEL Pozitif Hücre' yani "apoptotik hücre" olarak tanımlandı. Her 100 hücreden boyanan hücreler oranlanarak yüzdesi alınarak istatistiksel veri girişi yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Verilerin analizinde SPSS 23.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA) paket programı kullanıldı. Ölçüm değişkenleri olarak "ortalama ±SS" değerlerine bakıldı. Sayısal veriler normal dağılıma uygun olduğu için ANOVA testi kullanıldı (Tablo 1). P değeri 0,05'ten küçük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını anlayabilmek ve gösterebilmek için post hoc çoklu karşılaştırma testi (Tukey) uygulandı.

Bulgular

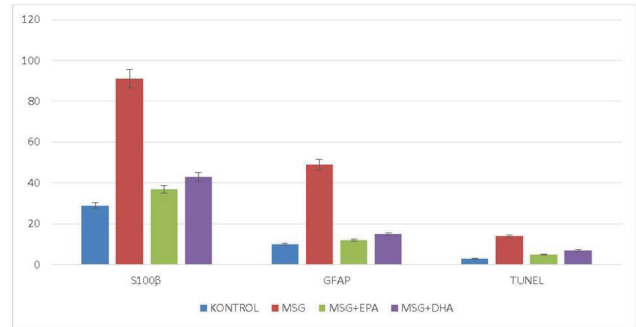
Astrositler normal morfolojik karakterde ve S100β antikor ile yoğun bir boyanma gösterdi. S100β immüno-boyaması MSG+EPA ve MSG+DHA grupları arasında hariç ($p>0,05$) olmak üzere tüm gruplar arasında anlamlı farklılık göstermektedir ($p=0,00$) (Tablo 1) (Gra-



Figür 1:

Beyin hipokampus CA1 bölgesi TUNEL yöntemi. → Tunel pozitif nöroglial hücreler, P: Piramidal Tabaka, Kontrol (A), MSG (B), MSG-EPA (C), MSG-DHA (D) X400 OM, Methyl green zemin boyaması.

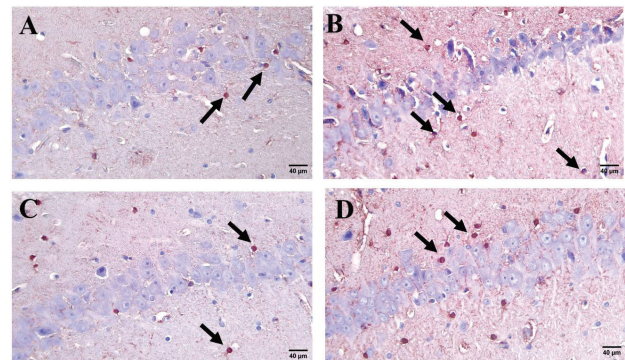
fik 1) (Figür 2). Bu anlamlı farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını ve hangi gruplar arasında olduğunu göstermek için Posthoc (Tukey) çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Buna göre S100β boyaması, kontrol grubu ve tüm diğer gruplar arasında nöroglia hücrelerin boyama yoğunluğu açısından anlamlı derece farklılık gözlenmiştir ($p=0,000$) (Figür 2). MSG grubu ve MSG+EPA, MSG+ DHA grupları arasında anlamlı derece boyama yoğunluğu açısından kuvvetli artış gözlenmiştir ($p<0,05$). Sadece MSG+EPA ve MSG+DHA grupları arasında anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$) (Tablo 2) (Grafik 1) (Figür 2).



Grafik 1:

S100β, GFAP immünohistokimya ve Tunel boyama sonuçları ort±ss değerleri.

Hippokampus CA1 bölgesindeki nöroglia hücrelerin GFAP immünoboyanma yoğunlukları bazı gruplar arasında anlamlı farklılık göstermekteyken ($p<0,005$) bazı gruplar arasında farkın anlamsız olduğu görülmektedir ($p>0,05$) (Figür 3). Bu anlamlı farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını ve hangi gruplar arasında olduğunu göstermek için Posthoc (Tukey) çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Buna göre GFAP immü-



Figür 2:

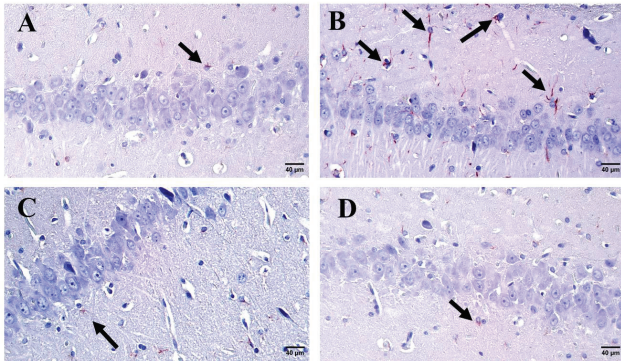
Beyin hipokampus CA1 bölgesi S100β immünoboyaması. → S100β immüno pozitif nöroglial hücreler, P: Piramidal Tabaka, Kontrol (A), MSG (B), MSG-EPA (C), MSG-DHA (D) X400 OM, Mayers Hematoksilen zemin boyaması.

Tablo 2 S100 β , GFAP immunohistokimya ve TUNEL yöntemi sonuçları çoklu grup karşılaştırmaları

Posthoc çoklu karşılaştırma testi (Tukey)	S100 β	GFAP	TUNEL
Kontrol vs. MSG	0,00*	0,00*	0,00*
Kontrol vs. MSG+EPA	0,039*	0,785	0,100
Kontrol vs. MSG+DHA	0,00*	0,140	0,001*
MSG vs. MSG + EPA	0,00*	0,00*	0,00*
MSG vs. MSG + DHA	0,00*	0,00*	0,00*
MSG+EPA vs. MSG+DHA	0,226	0,556	0,220

(*) Veriler p değerleridir.

noboyaması, kontrol grubu ve MSG grubu arasında nöroglia hücrelerin boyanma yoğunlukları açısından kuvvetli oranda artmış bir boyanma yoğunluğu görülmektedir ($p=0,000$) (Figür 3). Ancak kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$). MSG grubu ve MSG+EPA grubu arasında, ayrıca MSG grubu ve MSG+ DHA grubu arasında GFAP immünoboyama yoğunluğu açısından kuvvetli ve anlamlı derecede artış gözlenmiştir ($p=0,000$). Sadece MSG+EPA ve MSG+DHA gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$) (Figür 3).



Figür 3:

Beyin hipokampus CA1 bölgesi GFAP immünoboyaması. →: GFAP immün pozitif nöroglial hücreler, P: Piramidal Tabaka, Kontrol (A), MSG (B), MSG-EPA (C), MSG-DHA (D) X400 OM, Mayers Hematoksilen zemin boyaması.

Hippokampus CA1 bölgesindeki TUNEL pozitif hücrelerin yüzdeleri karşılaştırıldığında; kontrol grubu ve MSG grupları arasında TUNEL pozitif hücrelerin yüzdesinde anlamlı oranda bir artış gözlenmektedir ($p=0,000$). Kontrol grubu ve MSG+EPA arasında TUNEL pozitif hücrelerin yüzdesinde anlamlı oranda bir fark gözlenmezken ($p>0,05$), kontrol grubu ve MSG+DHA grupları arasında anlamlı fark gözlenmekte-

dir ($p>0,05$). MSG grubunun hem MSG+EPA grubu, hem de MSG+ DHA grubu arasında TUNEL pozitif hücre yüzdeleri farkı kuvvetli ve anlamlı derecede artış göstermiştir ($p=0,000$). Sadece MSG+EPA ve MSG+DHA gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$) (Tablo 2) (Grafik 1) (Figür 1).

Tartışma

MSG dünya genelinde tüketimi dikkat çekici boyutta olan bir lezzet artırıcıdır (21). Gıdalarda kullanımı sıklıkla olan MSG'nin toksik etkileri olduğu yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. Ayrıca MSG'nin nekroz, apoptozis ve hafıza ile ilgili zihinsel ve öğrenme mekanizmalarında bozukluklara neden olduğu bildirilmiştir. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda MSG'nin selektif nörodejenerasyona neden olduğu gösterilmiştir (22). Hipotalamusta yer alan arcuate çekirdekte ileri seviyede nekroza sebep olmuştur (23).

Önceki çalışmalar, MSG'nin artan sinirlilik, hipoaktivite ve spontan değişken davranışlarda eksiklikler gibi ciddi davranışsal anormalliklere neden olduğunu bildirmektedir (24). Geha ve ark. MSG'nin uyuşma, halsizlik, baş dönmesi ve baş ağrıları gibi nöronal semptomlar ürettiğini bildirmiştir (25). Daha önceki çalışmalar, MSG'nin serebral hemisferlerde, serebellumda, beyin sapı ve diensefalonda mitokondriyal lipid peroksidasyonunu ve antioksidan durumunu değiştirdiğini ve sıçan beyinlerinde hipotalamik nöronlarda hasara neden olduğunu bildirmiştir (9,26). Yapılan başka bir çalışmada, yüksek doz uygulanan MSG'nin nöroendokrin anormalliklerine nörodejenerasyon ve nörotoksositeye ve farklı organlarda oksidatif hasara yol açtığı gösterilmiştir (27-29).

Jaworska- Adamu ve ark. (2021) yapmış oldukları bir çalışmada, 7 ve 28 günlük olan çalışma gruplarına

habanero bibelerinin yağ süspansiyonunu sıçanlara vermiş, kontrol grubuna da fıstık yağını vermişlerdir. Hippokampus dokuları incelenen sıçanların, astrosit GFAP immünoreaktivitesi boyama yoğunluğu her iki grupta kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Astrosit S100 β immünoreaktivitesi boyama yoğunluğu 7 günlük grupta artmış görülmekteyken, 28 günlük grupta ise düştüğü gözlenmektedir. Bu durumda hippokampal CA1 bölgesindeki astrositlerdeki reaktif değişikliklere neden olduğu ve bu glial hücrelerin ekzisitotoksik hasara karşı nöronları koruduğu sonucuna varılmıştır (30). 2019'da yayınlanan başka bir çalışmamızda, iki taraflı karotid arter iskemi reperfüzyon modeli oluşturularak hippokampus dokuları incelendi. Bu çalışmaya göre S100 β ve GFAP immünoboyaması yapılan beyin dokularında, iskemi şiddeti arttıkça boyama yoğunluğunun arttığı gözlemlendi. Ayrıca bu çalışmada beyine verilen hasarın akciğer organında hasara yol açtığı da gösterilmektedir (31). Krawczyk ve ark. sinir sistemi yapısı için glutamatın yüksek konsantrasyonunun ekzisitotoksik olduğunu ve bunun da glial reaktiviteye neden olduğunu vurgulamışlardır. Bu nedenle MSG enjekte edilen genç sıçanların hippokampus CA1 bölgesinde S100 β ve GFAP ekspresyonunda artış olduğunu, aynı zamanda hücrelerin çoğalmasında ve hipertrofisi durumlarında Ki-67 antijeninin varlığından söz etmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, hücre hipertrofisi ile birlikte glutamatın zararlı etkisine yanıt olarak astroglia'nın geç reaktivitesini gösteren erken reaksiyonlarda veya hiperplazide proteinlerin ekspresyonunun arttığını göstermektedir (32). Bizim çalışmamızda ise, çocukluk dönemindeki ratların beyinlerinin hipokampus CA1 bölgesi incelendiğinde, S100 β immünoreaktivitesi MSG grubunda diğer gruplara göre kuvvetli ve anlamlı reaksiyon gösterdiği bariz bir şekilde görülmektedir ($p=0,000$). GFAP immünoreaktivitesi yine MSG grubunda diğer gruplara göre kuvvetli ve anlamlı reaksiyon göstermiştir ($p=0,000$). Çalışmamızda, sadece MSG enjekte edilen grupta sinir sistemi hasarını gözlemlenemizi sağlayan astrositler hem GFAP ile hem de S100 β ile kuvvetli boyanmıştır (Figür 2, Figür 3).

Omega-3 yağ asitlerinin (DHA, EPA ve ALA), antiinflamatuvar ve antihipertansif özellikler taşımakta olup, balık yağında fazlasıyla vardır (29). Lonergan ve ark.'nın yayınladıkları bir çalışmada, gama radyasyon maruziyetine bırakılan sıçanların hippokampuslarında oluşan nöronal hasar üzerine EPA'nın koruyucu bir etki sergilediğini göstermişlerdir (33). Bu çalışmaya benzer şekilde Martin ve arkadaşları, radyasyona maruziyet ve yaşlanmaya bağlı sıçan beyinde oluşan apoptotik hücre ölümü üzerine, omega-3 yağ asitlerinden EPA'nın ciddi düzeyde onarıcı etkisinin

olduğunu ortaya koymuşlardır (34). Sarsılmaz ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, sıçan corpus striatum'unda omega-3 yağ asitlerinin oksidatif hasara karşı koruyucu etkiler taşıdığını ortaya koymuşlardır (35).

Gürgen ve arkadaşları, MSG'nin hippokampusun CA1 ve DG bölgesindeki BDNF, NMDA-R ve NPY nöral sinyal molekülerinin azalmasına neden olduğu için çocuklarda MSG'nin aşırı tüketiminin hafıza ile ilişkili nöronları etkiledikleri sonucuna ulaşmışlardır. Bunun çözümlerinden biri olarak omega-3 yağ asitlerinin koruyucu etkisini incelemişlerdir. MSG'nin yaratmış olduğu nörotoksik etkiye karşı omega-3 yağ asitlerinin koruyucu etki gösterdikleri sonucuna varmışlardır (20). Alzoubi ve arkadaşları, uyku yoksunluğunun neden olduğu hafıza bozuklukları üzerine omega-3 yağ asitlerinin etkisinin pozitif olduğunu göstermişlerdir (36). Singh ve arkadaşları, sıçanlarda kronik kurşun kaynaklı nörotoksikite ve davranış bozukluğu üzerinde omega-3 yağ asidinin nöroprotektif etkisini araştırmışlardır. Sonuçlara göre; omega-3 yağ asidi, kurşun zehirlenmesi olan sıçanlarda davranışsal eksiklikleri ve histopatolojik bulguları ve oksidatif stresi iyileştirmiştir (37). Lou ve arkadaşları, yüksek endojen omega-3 PUFA'lara sahip yağ-1 farelerinin, global iskemi yaralanma modelinde hipokampal CA1 nöronları ve bilişsel işlevler üzerinde koruyucu etkiler sergilediğini gösterdiği sonucuna ulaşmışlardır (38). Zararsız ve arkadaşları, formadehite maruz kalan sıçanların beyinciklerindeki değişiklikler ve bu değişikliklerin üzerine omega-3 yağ asitlerinin etkisini araştırmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, gün aşırı intraperitoneal %10 formaldehit enjekte edilen sıçanlara verilen omega-3 yağ asitleri sayesinde serbest radikallerin artışını önlediği sonucuna ulaşılmıştır (39). Literatür verilerine uyumlu olan çalışmamızda, MSG'nin yaratmış olduğu nöronal hasar sonrası uygulanan omega-3 yağ asitleri (EPA ve DHA) sayesinde, çocukluk dönemindeki sıçanların beyin hippokampuslarında iyileşme etkisi gösterdiği sonucuna ulaşılmaktadır.

Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptozis, normal gelişim ve doku homeostazında çok önemli bir rol oynar. Apoptozisin, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda da rol oynadığı bilinmektedir. Jahanshahi M ve arkadaşlarının sıçanlar üzerine yaptıkları bir çalışmada; bir gruba sadece scopolamine hydrobromide (3 mg/kg) intraperitoneal verilmiş, diğer bir gruba ise scopolamine hydrobromide (3 mg/kg) yanında ginkgo biloba ekstraktı(40, 80 mg/kg) 7 gün boyunca intraperitoneal olarak vermişlerdir. Apoptotik nöronları inceleyebilmek için ise, hippokampus dokuları alarak tunel boyama yapmışlardır. Bu çalışmanın sonucuna göre; scopolamine enjekte edilen grubun hippokam-

püs dokusunun her alanında apoptotik nöron sayılarında artış gösterdiğini, scopolamine yanında verilen ginko biloba ekstraktının koruyucu bir etkisi olduğunu apoptotik nöron sayısı sonuçlarındaki azalmayı göerek yorumlamışlardır (40). Bu çalışmaya benzer şekilde bizim yaptığımız çalışmada ise; MSG grubunda apoptotik nöron sayılarında artış ve kuvvetli TUNEL pozitif reaksiyon gözlemlendi. MSG yanında Omega 3 yağ asitleri DHA ve EPA uygulanan gruplarda ise, MSG+DHA'nın apoptotik nöron sayısı MSG+EPA daha yüksektir. Bu da bize hücre ölümünün daha az olması sebebiyle EPA'nın koruyuculuğunun daha yüksek olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç

Sonuç olarak MSG'nin, çocukluk döneminde olan yavru sıçanların beyin hipokampus CA1 bölgesindeki nöronlarında S100 β , GFAP ve TUNEL pozitif ekspresyonlarda artışa neden olurken, Omega-3 yağ asitleri (EPA, DHA) verilen gruplarda, hipokampal nöronlardaki nöronal ekspresyonlarda ve apoptoziste azalmaya neden olduğu görülmüştür. Bu nedenle MSG'nin hipokampus bölgesindeki nöronlarda sinir iletimini, nöronal uyarlabilirliğini ve sinaptik plastisitenin düzenlenmesini olumsuz etkileyebileceği sebebi ile nöronal inhibisyona neden olabileceğini görmekteyiz. Ayrıca MSG'nin yanında EPA ve DHA gibi beyin ve hipokampus üzerine koruyucu etkileri olduğu bilinen omega-3 yağ asitlerinin kullanımının MSG'nin nörodejeneratif etkisinden koruyabilecek çözümlerden biri olabileceğini düşünmekteyiz.

Çıkar Çatışması Beyanı

Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Etik Kurul Onayı

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (03.01.2023/ E-77637435-050.04.04-461762). Çalışma hayvan refahına uygun olarak yürütülmüştür.

Finansman

Bu araştırma, kamu, ticari veya kâr amacı gütmeyen sektörlerdeki finansman kuruluşlarından herhangi bir finansal destek almamıştır.

Verilerin Ulaşılabilirliği

Yazarlar, ilgili tüm verilerin makaleye dahil edildiğini onaylayabilir.

Yazar Katkıları

HYS: Verilerin İşlenmesi; Formal Analizler; Araştırma; Metodoloji; Validasyon; Görselleştirme; Makalenin Yazımı.

GSG: Çalışmanın planlanması; Formal Analizler; Araştırma; Metodoloji; Proje Yönetimi; Kaynakların Sağlanması; Denetim; Validasyon; Makalenin düzenlenmesi.

Kaynaklar

- Schwartzkroin PA. Role of the hippocampus in epilepsy. *Hippocampus*. 1994;4(3):239-42.
- Kesner RP, Goodrich-Hunsaker NJ. Developing an animal model of human amnesia: the role of the hippocampus. *Neuropsychologia*. 2010;48(8):2290-302.
- Marlatt MW, Lucassen PJ. Neurogenesis and Alzheimer's disease: biology and pathophysiology in mice and men. *Current Alzheimer Research*. 2010;7(2):113-25.
- Zealand FSAN. Monosodium glutamate, a safety assessment. Technical report series no. 20. 2003.
- Yamaguchi S, Kimizuka A. Psychometric studies on the taste of monosodium. *Glutamic acid: Advances in Biochemistry Physiology*. 1979:35.
- Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, Ryba NJ, et al. An amino-acid taste receptor. *Nature*. 2002;416(6877):199-202.
- Hashem HE, El-Din Safwat M, Algaidi S. The effect of monosodium glutamate on the cerebellar cortex of male albino rats and the protective role of vitamin C (histological and immunohistochemical study). *Journal of Molecular Histology*. 2012;43:179-86.
- Gao J, Wu J, Zhao X, Zhang W, Zhang Y, Zhang Z. Transplacental neurotoxic effects of monosodium glutamate on structures and functions of specific brain areas of filial mice. Sheng Li Xue Bao:[*Acta Physiologica Sinica*]. 1994;46(1):44-51.
- Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The Journal of Nutrition*. 2000;130(4):1007S-15S.
- Platt SR. The role of glutamate in central nervous system health and disease—a review. *The Veterinary Journal*. 2007;173(2):278-86.
- Luján R, Shigemoto R, López-Bendito G. Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience*. 2005;130(3):567-80.
- Minogue AM, Lynch AM, Loane DJ, Herron CE, Lynch MA. Modulation of amyloid- β -induced and age-associated changes in rat hippocampus by eicosapentaenoic acid. *Journal of Neurochemistry*. 2007;103(3):914-26.
- Li M, Zhu Q, Hu C, Giesy JP, Kong Z, Cui Y. Protective effects of eicosapentaenoic acid on genotoxicity and oxidative stress of cyclophosphamide in mice. *Environmental Toxicology*. 2011;26(3):217-23.
- Gamoh S, Hashimoto M, Sugioka K, Hossain MS, Hata N, Misawa Y, et al. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats. *Neuroscience*. 1999;93(1):237-41.
- Montgomery D. Astrocytes: form, functions, and roles in disease. *Veterinary Pathology*. 1994;31(2):145-67.
- Norenberg MD. Astrocyte responses to CNS injury. *Journal of Neuropathology Experimental Neurology*. 1994;53(3):213-20.
- Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microscopy Research Technique*. 2003;60(6):614-32.
- Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Cell Research*. 2009;1793(6):1008-22.
- Yardan T, Erenler AK, Baydin A, Aydin K, Cokluk C. Usefulness of S100B protein in neurological disorders. *The Journal of the Pakistan Medical Association*. 2011;61(3):276-81.
- Gurgen SG, Sayin O, Cetiin F, Sarsmaz HY, Yazici GN, Umur

- N, et al. The effect of monosodium glutamate on neuronal signaling molecules in the hippocampus and the neuroprotective effects of omega-3 fatty acids. *Acs Chemical Neuroscience*. 2021;12(16):3028-37.
21. Nijijima A, Togyama T, Adachi A. Cephalic-phase insulin release induced by taste stimulus of monosodium glutamate (umami taste). *Physiology Behavior*. 1990;48(6):905-8.
 22. Rogers PJ, Blundell JE. Umami and appetite: effects of monosodium glutamate on hunger and food intake in human subjects. *Physiology Behavior*. 1990;48(6):801-4.
 23. Hu L, Fernstrom JD, Goldsmith PC. Exogenous glutamate enhances glutamate receptor subunit expression during selective neuronal injury in the ventral arcuate nucleus of postnatal mice. *Neuroendocrinology*. 1998;68(2):77-88.
 24. Shivasharan BD, Nagakannan P, Thippeswamy BS, Veerapur VP. Protective effect of calendula officinalis L. flowers against monosodium glutamate induced oxidative stress and excitotoxic brain damage in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2013;28(3):292-8.
 25. Geha RS, Beiser A, Ren C, Patterson R, Greenberger PA, Grammer LC, et al. Multicenter, double-blind, placebo-controlled, multiple-challenge evaluation of reported reactions to monosodium glutamate. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2000;106(5):973-80.
 26. Farombi EO, Onyema OO. Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin. *Human and Experimental Toxicology*. 2006;25(5):251-9.
 27. Moreno G, Perelló M, Gaillard RC, Spinedi E. Orexin stimulates hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function, but not food intake, in the absence of full hypothalamic NPY-ergic activity. *Endocrine*. 2005;26:99-106.
 28. Chaparro-Huerta V, Rivera-Cervantes M, Torres-Mendoza B, Beas-Zarate C. Neuronal death and tumor necrosis factor- α response to glutamate-induced excitotoxicity in the cerebral cortex of neonatal rats. *Neuroscience Letters*. 2002;333(2):95-8.
 29. Farombi E, Onyema O. Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin. *Human Experimental Toxicology*. 2006;25(5):251-9.
 30. Jaworska-Adamu J, Krawczyk A, Rycerz K, Golynski M. Reactivity of astrocytes in hippocampal CA1 area in rats after administration of habanero peppers. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2021;59(1):1-7.
 31. Yeşil H, Tuğlu İ. The relation of oxidative stress and apoptosis to histopathologic alterations in the lungs as a result of global cerebral ischemia. *Biotechnic and Histochemistry*. 2019;94(8):555-68.
 32. Jaworska-Adamu J, Krawczyk A, Rycerz K. Immunohistochemical evaluation of hippocampal CA1 region astrocytes in 10-day-old rats after monosodium glutamate treatment. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2015;18:767-74.
 33. Lonergan PE, Martin DS, Horrobin DF, Lynch MA. Neuroprotective effect of eicosapentaenoic acid in hippocampus of rats exposed to γ -irradiation. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(23):20804-11.
 34. Martin DS, Lonergan PE, Boland B, Fogarty MP, Brady M, Horrobin DF, et al. Apoptotic changes in the aged brain are triggered by interleukin-1 β -induced activation of p38 and reversed by treatment with eicosapentaenoic acid. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(37):34239-46.
 35. Sarsilmaz M, Songur A, Özyurt H, Kuş İ, Özen OA, Özyurt B, et al. Potential role of dietary ω -3 essential fatty acids on some oxidant/antioxidant parameters in rats' corpus striatum. *Prostaglandins, Leukotrienes Essential Fatty Acids*. 2003;69(4):253-9.
 36. Alzoubi KH, Mayyas F, Abu Zamzam HI. Omega-3 fatty acids protects against chronic sleep-deprivation induced memory impairment. *Life Sciences*. 2019;227:1-7.
 37. Singh PK, Singh MK, Yadav RS, Nath R, Mehrotra A, Rawat A, et al. Omega-3 fatty acid attenuates oxidative stress in cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus tissue and improves neurobehavioral activity in chronic lead-induced neurotoxicity. *Nutritional Neuroscience*. 2019;22(2):83-97.
 38. Luo CM, Ren HX, Wan JB, Yao XL, Zhang XJ, He CW, et al. Enriched endogenous omega-3 fatty acids in mice protect against global ischemia injury. *Journal of Lipid Research*. 2014;55(7):1288-97.
 39. Zararsiz I, Meydan S, Sarsilmaz M, Songur A, Ozen OA, Sogut S. Protective effects of omega-3 essential fatty acids against formaldehyde-induced cerebellar damage in rats. *Toxicology and Industrial Health*. 2011;27(6):489-95.
 40. Jahanshahi M, Nickmahzar EG, Babakordi F. Effect of Ginkgo biloba extract on scopolamine-induced apoptosis in the hippocampus of rats. *Anatomical Science International*. 2013;88(4):217-22.