

Yumurtaya verilen monosodyum glutamat'ın tavuk embriyolarında medulla spinalisin servikal bölgesinin embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi

The determination of effects of in ovo administered monosodium glutamate on the embryonic development of cervical region of medulla spinalis in chicken

ÖZET

Bu çalışmada, dünyada en yaygın kullanılan lezzet artırıcı gıda katkı maddelerinden biri olan monosodyum glutamat (MSG)'ın, medulla spinalis'in embriyonik gelişimi üzerine etkilerinin histolojik ve histometrik yöntemler kullanılarak belirlenmesi amaçlanmaktadır. Çalışmada 410 adet dömlü tavuk yumurtası kullanıldı. Yumurtalar kontrol, distile su, 0,12, 0,6 ve 1,2 mg/g yumurta MSG olmak üzere beş gruba ayrıldı ve enjeksiyonlar kuluçka başlangıcında yumurta sarısına yapıldı. Kuluçkanın 15, 18 ve 21. günlerinde her gruptan 10 yumurta açılarak elde edilen embriyolardan medulla spinalis doku örnekleri alındı. Doku örnekleri %10'luk formolde tespit edildikten sonra rutin histolojik yöntemlerle parafinde bloklandı. Bloklardan alınan 6 µm kalınlığındaki kesitler Hematoksisilen Eozin, Kluver-Barrera, Toluidine Blue, Periyodik Asit Schiff ve Crossmon'ın üçlü boyama yöntemi ile boyandı. Preparatlar ışık mikroskop altında incelenildi ve medulla spinalis dokusunda histometrik ölçümler yapıldı. 15. gün elde edilen embriyolarda yapılan histometrik ölçümler sonucunda substantia grisea yüzey alanının medulla spinalis'in kesitlerdeki toplam yüzey alanına oranı dikkate alındığında kontrol ve MSG grupları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi. 18. günde substantia grisea yüzey alanının medulla spinalis'in kesitlerdeki toplam yüzey alanına oranı açısından özellikle 0,6 mg/g yumurta dozunda MSG uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla arttığı tespit edildi. 21. günde ise substantia grisea yüzey alanının medulla spinalis'in kesitlerdeki toplam yüzey alanına oranının 0,6 mg/g ve 1,2 mg/g dozunda MSG uygulanan grupta kontrol ve distile su grubu ile karşılaştırıldığında azalmış olduğu tespit edildi. Kanalis sentralis'in enine ve boyuna çapları üzerinde yapılan değerlendirmelerde ise MSG uygulanan gruplarda, kontrol ve distile su grubuna göre kanalis sentralis'in enine ve boyuna çaplarının azaldığı dikkati çekti. Medulla spinalisin ventral kornusunda bulunan motorik nöronlarda MSG uygulanan gruplarda 15., 18. ve 21. günlerde nekroz ve nöronofaji gibi histopatolojik değişikliklere rastlandı, MSG grupları kontrol ve distile su grupları ile karşılaştırıldığında motor nöronlardaki nekrozda önemli bir artış dikkati çekti ($p<0.05$). Sonuç olarak inkübasyondan hemen önce dömlü tavuk yumurtasına verilen MSG'nin medulla spinalisin embriyonik gelişimini olumsuz yönde etkilediği ve motor nöronlarda nekroza neden olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Embriyotoksisite, medulla spinalis, monosodyum glutamat, tavuk embriyo

ABSTRACT

In this study, the aim was to determine the effects of monosodium glutamate (MSG), one of the most widely used flavor enhancing food additives in the world, on the embryonic development of the spinal cord by histological and histometric methods. For this purpose, 410 fertilized chicken eggs were divided into 5 groups as control, distilled water, 0.12, 0.6 and 1.2 mg/g egg MSG and injections were performed via the egg yolk. On the 15th, 18th and 21st day of incubation, medulla spinalis tissue samples were taken from the embryos and chicks.

How to cite this article

Bölükbaş, F., Öznurlu Y. (2021). The determination of effects of in ovo administered monosodium glutamate on the embryonic development of cervical region of medulla spinalis in chicken. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3), 298-311. <https://doi.org/10.31797/vetbio.1015200>

Research Article

Ferhan Bölükbaş^{1a}
Yasemin Öznurlu^{2b}

¹Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Aksaray University, Aksaray, Turkey

²Department of Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Selçuk, Konya, Turkey

ORCID-

^a[0000-0002-9744-0242](https://orcid.org/0000-0002-9744-0242)

^b[0000-0002-6296-3107](https://orcid.org/0000-0002-6296-3107)

Correspondence

Ferhan BÖLÜKBAŞ

ferhan.bolukbas@aksaray.edu.tr

Article info

Submission: 26-10-2021

Accepted: 30-12-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0

International License



As a result of histometric measurements made in embryos obtained on the 15th day, it was determined that there was no significant difference between the control and MSG groups when the ratio of the substantia grisea surface area to the total surface area of the medulla spinalis was taken into account. On the 18th day, it was determined that the ratio of the surface area of the substantia grisea to the total surface area of the medulla spinalis in the sections increased especially in the group administered MSG at 0.6 mg/g egg dose compared to the control group. On the 21st day, it was determined that the ratio of the surface area of the substantia grisea to the total surface area of the medulla spinalis in the sections was decreased in the 0.6 mg/g and 1.2 mg/g MSG group compared to the control and distilled water groups. In the evaluations made on the transverse and longitudinal diameters of the canalis centralis, it was seen that the transverse and longitudinal diameters of the canalis centralis decreased in the MSG groups compared to the control and distilled water groups. Histopathological changes such as necrosis and neuronophagia were observed on the 15th, 18th and 21st days in the groups treated with MSG in the motoric neurons of the ventral cornus of the spinal cord. When the MSG groups were compared with the control and distilled water groups, a significant increase in necrosis in motor neurons was seen ($p<0.05$). As a result, it was determined that in ovo administered MSG could adversely affect the embryonic development of the medulla spinalis and cause necrosis in motor neurons.

Keywords: Chicken Embryos, embryotoxicity, medulla spinalis, monosodium glutamate

GİRİŞ

Gıda katkı maddeleri içerisinde lezzet arttırıcı maddelerin çok önemli bir yeri vardır. Monosodyum Glutamat (MSG, E621), son yıllarda hazır gıdaya olan talebin artmasıyla birlikte, gıda sanayiinde, restoranlarda, paketlenmiş ve dondurulmuş hazır gıdalarda en yaygın kullanılan lezzet arttırıcı gıda katkı maddelerinden birisidir (Zanfirescu vd., 2019). Özellikle Çin, MSG'nin üretim ve tüketiminde dünyada başı çekerken, onu Endonezya, Vietnam ve Tayland gibi birkaç güneydoğu Asya ülkesi takip etmektedir (Nguyen vd., 2020). Sanayileşmiş ülkelerde günlük ortalama MSG alımının 0.3-1 g olduğu tahmin edilmektedir (Geha vd., 2000). Avrupa ülkelerinde ortalama MSG alımı 0.3 ila 0.5 g/gün arasında değişirken Asya'da bu oran daha yüksektir; Örneğin Japonya'da 1.1-1.6 g/gün, Tayvan'da 1.5-3.0 g/gün, Güney Kore'de 1.6-2.3 g/gün'dür (Beyreuther vd., 2007; Nguyen vd., 2020). Çin Restoranı Sendromu'nun tanımlanmasından sonra MSG'nin insanlarda ve hayvanlarda toksik etkilerini gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır (Williams & Woessner, 2009). Bu çalışmalar MSG'nin hepatotoksisite, nörotoksisite, genotoksisite, immunotoksisiteye neden olduğunu ve obezite ve diyabet gibi metabolik bozukluklarla ilişkili olduğunu göstermiştir (Gad vd., 2021; Hegazy vd., 2017; Kazmi vd., 2017; Nguyen vd., 2020; Oladipo vd., 2015; Zanfirescu vd., 2019). MSG'ye maruz

kalan erişkinlerde önemli etkiler gözlenirken, fetal dönemde ve yaşamın ilk yıllarında maruziyet yaşam boyunca çok daha ciddi etkilere neden olabilir. Hegazy vd. (2017), ratlarda gebelik sırasında annelere MSG verilmesinin fetal akciğer dokularında büyüme geriliğine ve histopatolojik değişikliklere neden olabileceğini göstermişlerdir. Miko vd. (2016), maternal MSG maruziyetinin ratlarda ciddi intrauterin büyüme geriliğine ve nörotoksik etkilere neden olabileceğini bildirmiştir.

Yapılan çalışmalarda MSG'nin; hafızada bozulma, depresif ve anksiyojenik davranışlar ve analjezik tepkilerdeki değişiklikler gibi nöroendokrin anormalliklere neden olabileceği bildirilmiştir (López-Pérez vd., 2010; Quines vd., 2014). Ayrıca ratlarda on gün boyunca subkutan veya oral yolla MSG maruziyeti sonucu beyin hafızadan sorumlu olan bölgesi olan hipokampus bölgesinde β -Amiloid plak birikiminde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Dief vd., 2014). Kemirgenlerdeki MSG toksisitesinin hipokampus, optik sinir, retina ve korteksin çeşitli bölgelerinde dejenerasyona neden olduğu bilinmektedir (Beas-Zárate vd., 2002; Chambille & Serviere, 1993; Olney, 1969).

MSG'nin nörotoksik etkileri hakkında çok sayıda çalışma olmasına rağmen medulla spinalis'in gelişimi üzerindeki etkileri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. İnsanlar ve memeliler gebelikleri boyunca farklı kimyasallara maruz kalabilmekte ve bunun

sonucunda da embriyonik gelişim olumsuz etkilenebilmektedir (Atay vd., 2020). Bazı kimyasal maddelerin toksik, teratojenik ve gelişimsel etkilerini belirlemeye yönelik çalışmalar insanlar üzerinde yapılamadığından bu kimyasallar hayvan modelleri üzerinde test edilmektedir. Jelinek (1977) pekçok kimyasalın embriyolojik ve teratojenik etkilerinin belirlendiği araştırmalarda kullanılan, döllenmiş tavuk yumurtalarının kullanıldığı Tavuk Embriyotoksitesite Tarama Testi-CHEST adlı bir yöntem geliştirmiştir. CHEST yöntemi ile belirlenen toksik dozun sulandırma oranının 10^{-2} ile çarpılmasıyla elde edilen sonucun, memelilerde anneye ait canlı ağırlığın kg'mı başına mg düzeyinde alınması gereken toksik doz olarak kabul edildiği bildirilmiştir (Jelinek, 1977). Tavuk embriyo modeli, in vivo çalışmalar için sıklıkla tercih edilen basit, düşük maliyetli, erişilebilir ve tekrarlanabilir bir modeldir. Ayrıca, tavuk embriyosunun nöral ve spinal gelişim aşamaları, insan embriyosunun gelişim aşamalarına çok benzemektedir (Atay vd., 2020). Bu amaçla embriyolojik, anatomik ve gelişimsel biyoloji çalışmalarında materyal olarak civciv embriyoları tercih edilmiştir (Atay vd., 2020; Çetin & Özaydın, 2021; Kandil & Sur, 2018; Öznurlu vd., 2021). Bu çalışmada model organizma olarak tavuk embriyoları kullanılmış ve MSG'nin medulla spinalis'in embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin, histolojik ve histometrik metodlarla belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METHOD

Çalışmada sağlıklı ticari Babcock Brown ırkına ait elde edilen toplam 410 adet dömlü tavuk yumurtası (50-55 g) kullanılmıştır. Her grup için MSG dozları 55g yumurta ağırlığına göre belirlendi. MSG (L-Glutamic acid monosodium salt monohydrate, Sigma) hassas terazi ile tartılarak santrifüj tüpüne aktarıldı ve otoklavda sterilize edilmiş distile su ilave edilerek sulandırıldı. 100 µL hacimde 0,12, 0,6 ve 1,2

mg/g yumurta MSG içeren test çözeltileri hazırlandı.

Enjeksiyondan önce yumurtalar kapalı bir kabinde 21 g potasyum permanganat +42 mL formaldehit/m³ karışımıyla elde edilen buhar altında 15 dakika süreyle dezenfekte edildi. Daha sonra yumurtalar 5 gruba ayrıldı. Grup 1 (Kontrol grubu, n=40 yumurta), Grup 2 (Distile su grubu, n=62 yumurta), Grup 3 (0,12 mg/g yumurta MSG enjekte edilen grup, n=80 yumurta), Grup 4 (0,6 mg/g yumurta MSG enjekte edilen grup, n=90 yumurta) ve Grup 5 (1,2 mg/g yumurta MSG enjekte edilen grup, n=138 yumurta). Gruplardaki yumurta sayıları embriyonik ölümler dikkate alınarak belirlendi. Enjeksiyon gruplarında yumurta kabuğu üzerindeki enjeksiyon bölgeleri dezenfeksiyon için %96'lık etanolle silindi. Tüm enjeksiyonlar yumurta sarısına ve kuluçka başlangıcında gerçekleştirildi. Yumurtanın yan tarafından özel yumurta delicisi ile bir delik açılarak, steril insülin enjektöründen 100 µL/yumurta test solüsyonu enjekte edildi ve ardından delikler sıvı parafin ile kapatıldı. Kuluçka işlemleri, optimal koşullarda (37,5 °C sıcaklık ve %65 nispi nem) kuluçka makinesinde gerçekleştirildi.

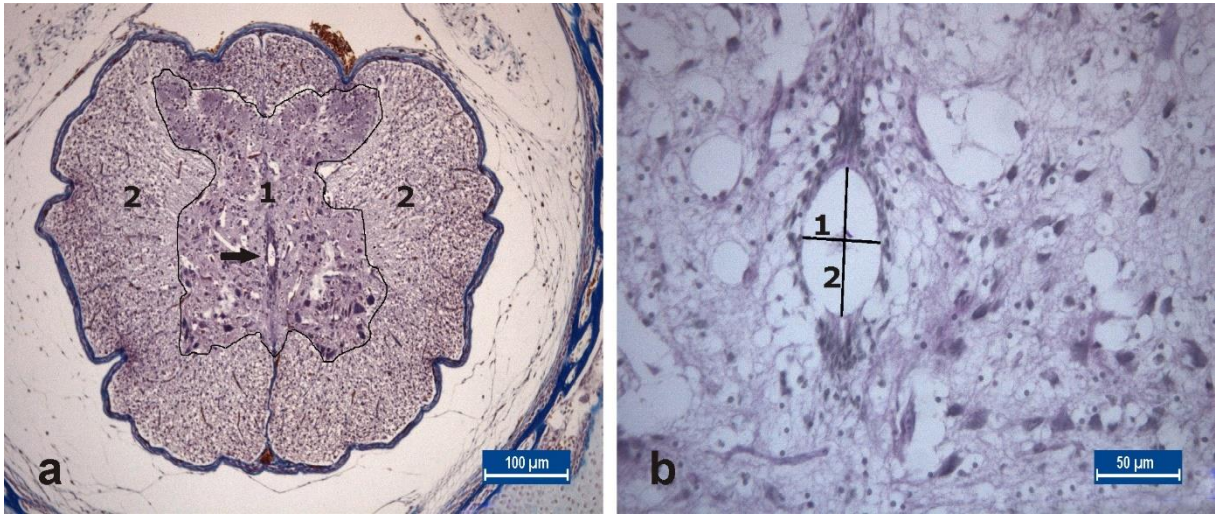
Kuluçkanın 15, 18 ve 21. günlerinde, her gruptan rastgele seçilen 10'ar adet yumurta açılarak, elde edilen embriyolardan alınan medulla spinalis dokusu örnekleri %10'luk formolde tespit edildi ve rutin histolojik yöntemlerle yıkama, dehidrasyon ve parlatmayı takiben parafinde bloklandı. Bloklardan alınan 6 µm kalınlığındaki kesitler Crossmon'ın üçlü boyama yöntemi, Hematoksilen Eozin (H&E), Periyodik Asit Schiff (PAS), Toluidine Blue ve Kluver-Barrera boyama yöntemleri ile boyandı.

Histometrik Ölçümler

Histometrik ölçümler kuluçkanın 15, 18 ve 21. gününde elde edilen medulla spinalis dokusundan alınan seri kesitlerde gerçekleştirildi. Medulla spinalis dokusu servikal segmentte değerlendirilmeye alındı. Her bir hayvana ait 3 seri kesitte substantia grisea

yüzey alanının medulla spinalis'in toplam yüzey alanına oranları hesaplandı (Şekil 1a). Ayrıca medulla spinalis'in servikal segmentine ait seri kesitlerde kanalis sentralis'in enine ve boyuna

çap ölçümleri yapıldı (Şekil 1b). Tüm histometrik ölçümler Leica IM50 ölçüm programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1. a. Servikal segmentten alınan bir kesit. Çizgiler ile sınırlanan 1: Substantia grisea, 2: Substantia alba bölgeleri. Üçlü boyama. Bar: 100 µm. b. medulla spinalis'in servikal segmentinden alınan bir kesitte kanalis sentralisin enine (1 numaralı siyah bar) ve boyuna (2 numaralı siyah bar) çapları, PAS boyama. Bar: 50 µm.

Histopatolojik Değerlendirmeler

Her grupta bulunan tüm örnekler medulla spinalisin ventral kornusunda bulunan motorik nöronlardaki nekroz ve nöronofaji açısından ışık mikroskobu altında (Leica DM2500, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Almanya) değerlendirildi ve gerekli görülen bölgelerin dijital görüntüleri (x400 büyütme) kaydedildi, ardından IM-50 görüntü analiz programı (AG CH-9435; Leica Microsystems, Heerbrugg, İsviçre) ile her alanda rastgele seçilen 10000 µm²'lik altı farklı alanda normal ve nekrotik motor nöronlar sayılarak nekrotik nöron yüzdesi hesaplandı (nekrotik motor nöron sayısı/ toplam nöron sayısıX100). Tüm değerlendirmeler, numune tanımlamasına kör iki araştırmacı tarafından yapıldı.

İstatistik Analizler

Elde edilen veriler istatistik paket programı (SPSS 25, IBM Corp. Released 2017) yardımıyla analiz edildi. Medulla spinalis dokusundan alınan kesitlerde substantia grisea'nın yüzey alanının kesitlerde izlenen toplam yüzey alanına oranları arasındaki farkın belirlenmesi, kanalis sentralis'in enine ve boyuna çaplarının

değerlendirilmesi ve nekrotik nöron yüzdesi tek yönlü varyans analizi, ardından çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey testi ile analiz edilerek grupların ortalama değerleri arasındaki farkların önem dereceleri belirlendi. $p < 0.05$ değeri önemli kabul edildi.

BULGULAR

Medulla Spinalis Dokusuna ait Histolojik ve Histometrik Bulgular

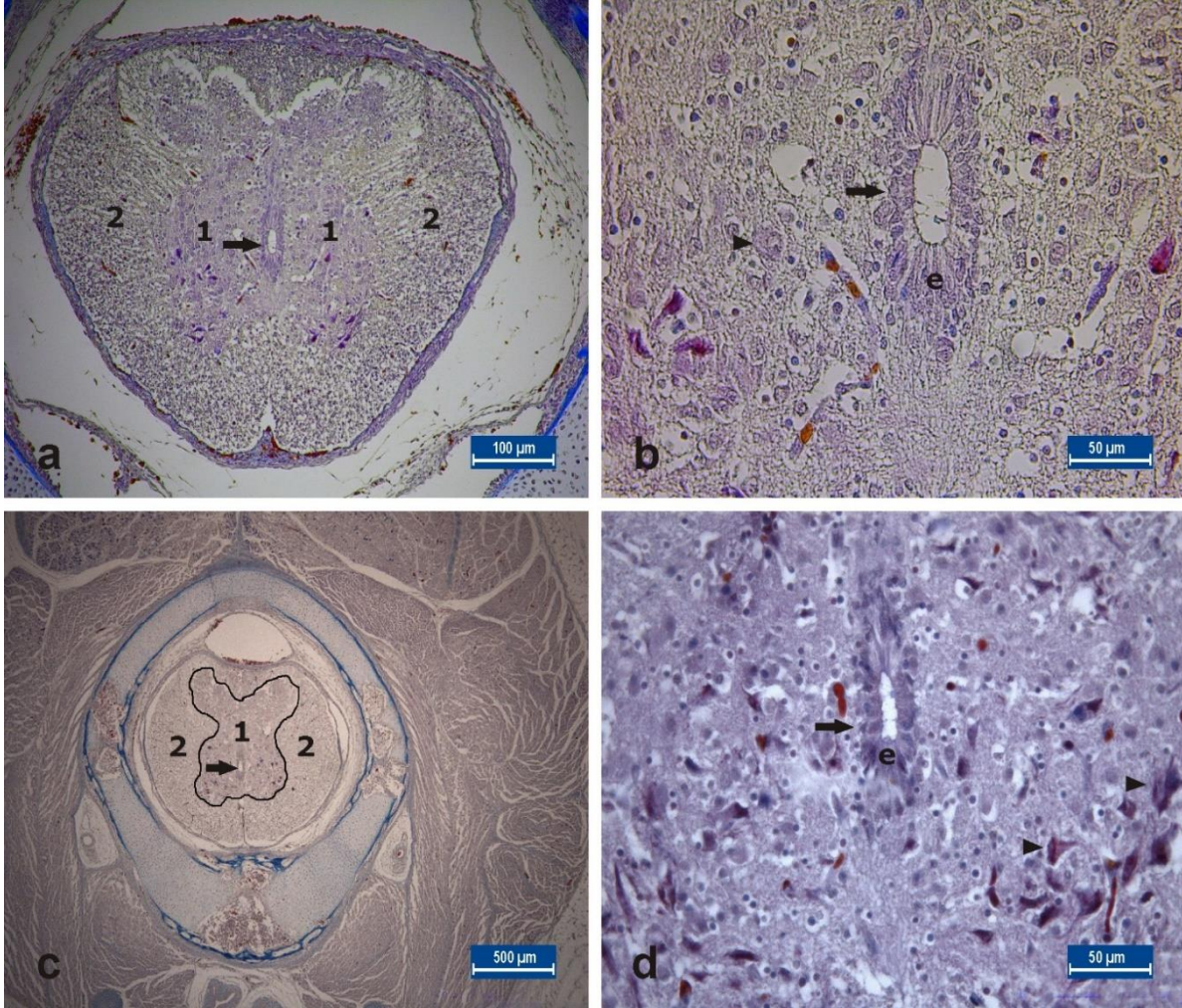
İnkübasyonun 15. günü

Bu dönemde tüm gruplarda medulla spinalis'in servikal segmentinden alınan kesitlerde ortada klasik "kelebek" şeklindeki görünümü ile substantia grisea bölgesi ve bunu çevreleyen substantia alba katmanı dikkati çekti (Şekil 2a, c). Ventral kornu'da yer alan motorik hücreler diğer hücrelerden ayırt edilebilmekteydi. Yuvarlak-oval biçimdeki kanalis sentralisin içini kübikten prizmatığe kadar değişen şekillerde ependim hücrelerinin döşediği görüldü (Şekil 2b, d).

Administered monosodium glutamate

Yapılan histometrik ölçümler sonucunda substantia grisea yüzey alanının medulla spinalis'in kesitlerde izlenen toplam yüzey alanına oranı dikkate alındığında kontrol ve MSG grupları arasında önemli bir farklılık

olmadığı tespit edildi (Tablo 1). Bununla birlikte MSG uygulanan gruplarda, kontrol ve distile su grubuna göre kanalis sentralis'in enine ve boyuna çaplarının azaldığı dikkati çekti ($p<0,05$, Tablo 2).



Şekil 2. Kuluçkanın on beşinci günü kontrol grubundan bir embriyonun medulla spinalisin servikal segmentine ait bir kesit (a, b). Kuluçkanın on beşinci günü 1,2 mg/g yumurta dozunda MSG uygulanan bir embriyoya ait medulla spinalisin servikal segmentine ait bir kesit (c, d). 1: Substantia grisea. 2: Substantia alba. Ok: Kanalis sentralis. Okbaşları: Motorik hücreler. e: Ependim hücreleri, Üçlü boyama.

Tablo 1. İnkübasyonun 15, 18 ve 21. günlerinde medulla spinalis dokusunda substantia grisea'nın kesitlerdeki toplam yüzey alanına oranı.

Gruplar n=6	15.gün	18.gün	21.gün
Kontrol	33,55±2,80 ^a	32,02±1,73 ^b	35,84±6,52 ^a
Distile su	31,42±2,26 ^a	32,58±2,86 ^{ab}	34,24±3,86 ^{ab}
0,12 mg/g MSG	31,92±6,63 ^a	32,40±3,72 ^{ab}	33,43±2,03 ^{ab}
0,6 mg/g MSG	34,92±2,29 ^a	35,68±4,10 ^a	29,35±3,10 ^b
1,2 mg/g MSG	33,26±3,84 ^a	32,27±1,78 ^{ab}	30,18±2,90 ^b

^{a,b} Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiksel öneme sahiptir ($p<0.05$).

Tablo 2. İnkübasyonun 15,18 ve 21. günlerinde açılan yumurtalardan elde edilen embriyoların medulla spinalis dokularında kanalis sentralislerin enine ve boyuna çap ölçümlerine ait değerler.

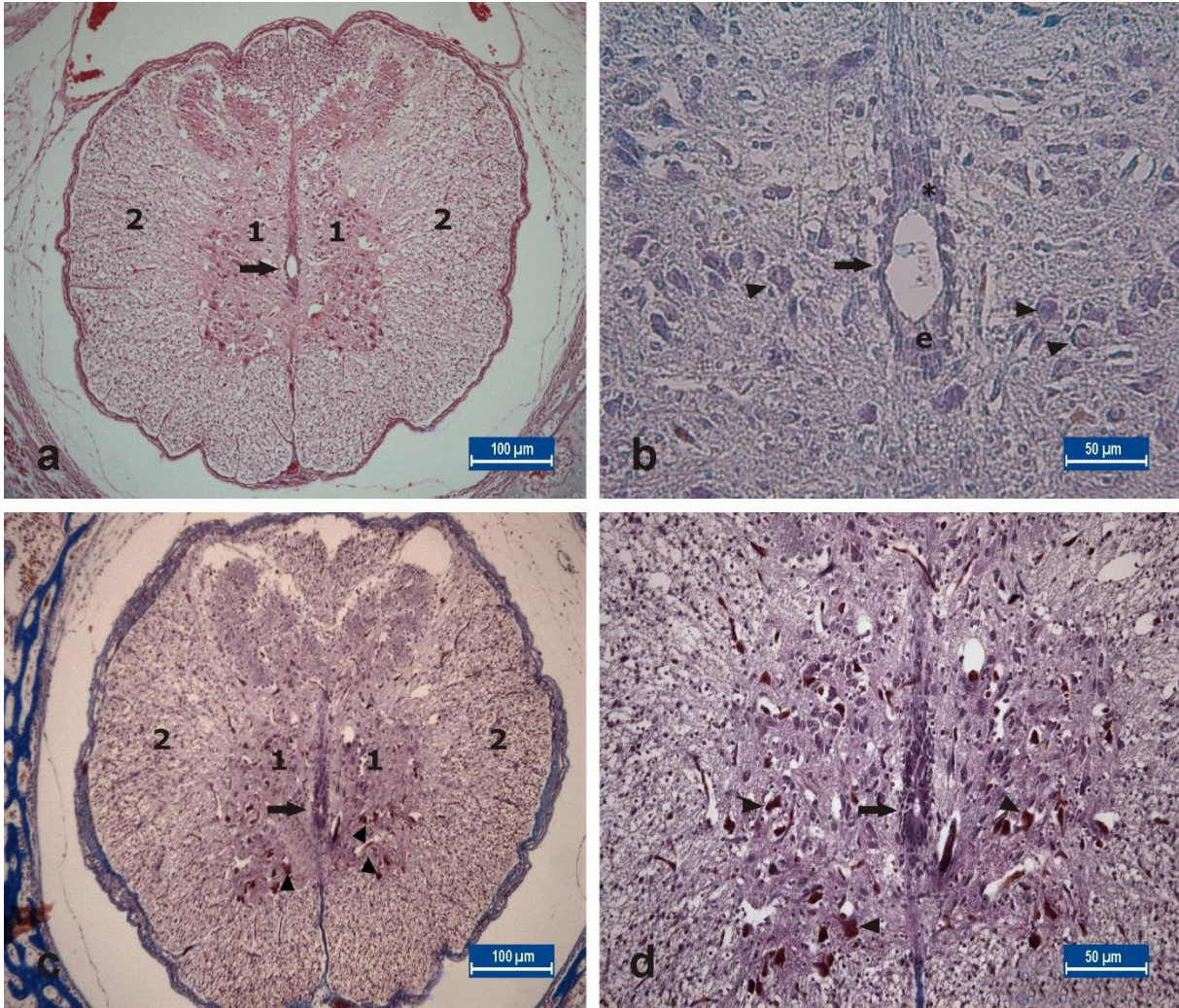
Gruplar n=6	15.gün		18.gün		21.gün	
	1 (enine çap)	2 (boyuna çap)	1 (enine çap)	2 (boyuna çap)	1 (enine çap)	2 (boyuna çap)
Kontrol	19,59±4,44 ^a	33,63±3,46 ^a	18,52±2,87 ^a	35,55±6,36 ^b	36,32±3,81 ^a	59,38±6,35 ^a
Distile su	20,50±3,56 ^a	30,78±1,63 ^a	16,76±1,47 ^a	32,53±3,61 ^a	34,07±7,44 ^a	51,41±6,90 ^b
0,12 mg/g MSG	10,66±1,32 ^b	20,13±2,55 ^b	10,97±3,23 ^b	21,86±5,12 ^b	22,76±2,22 ^b	32,47±4,45 ^c
0,6 mg/g MSG	9,63±0,73 ^b	17,09±1,57 ^b	7,18±1,7 ^c	14,10±2,48 ^c	14,63±4,25 ^c	19,9±6,98 ^d
1,2 mg/g MSG	8,23±0,92 ^b	17,80±0,64 ^b	9,72±1,94 ^b	15,43±4,43 ^c	10,80±3,34 ^c	15,47±2,37 ^d

^{a-d}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiksel öneme sahiptir (p<0.05).

İnkübasyonun 18. günü

Bu dönemde tüm gruplarda bir önceki döneme kıyasla gerek substantia grisea'nın gerekse substantia alba'nın genişlediği görüldü (Şekil 3a, c). Substantia grisea yüzey alanının toplam yüzey alanına oranının 0,6 mg/g MSG

uygulanan grupta kontrol grubuna göre arttığı tespit edildi (p<0.05, Tablo 1). Kanalis sentralisin enine ve boyuna çaplarının ise MSG uygulanan gruplarda, kontrol ve distile su grubuna göre azaldığı dikkati çekti (p<0.05, Tablo 2).

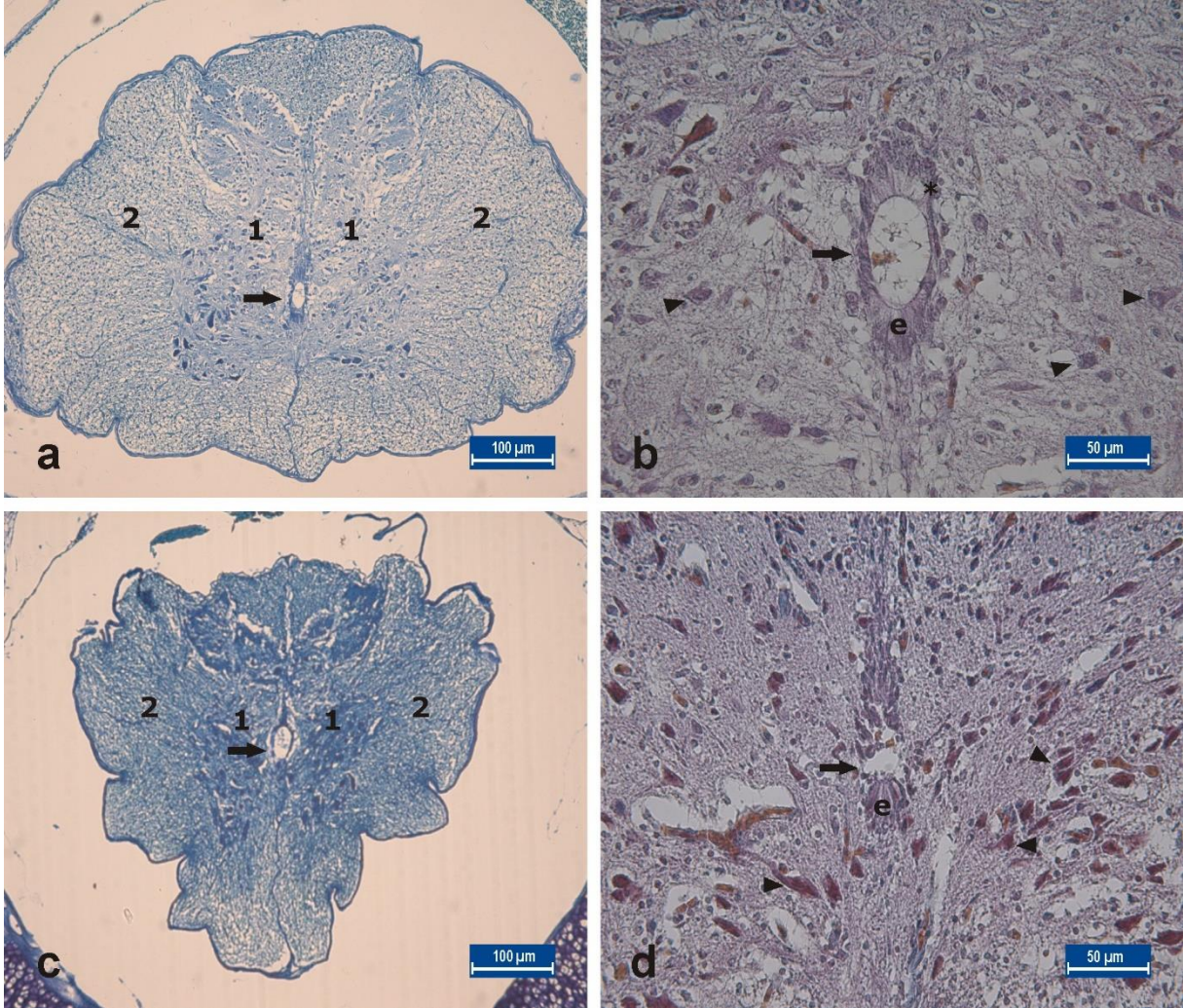


Şekil 3. Kuluçkanın on sekizinci günü kontrol grubundan bir embriyonun medulla spinalisin servikal segmentine ait bir kesit (a, b), H&E boyama. Kuluçkanın on sekizinci günü 0,6 mg/g yumurta dozunda MSG uygulanan bir embriyoya ait medulla spinalisin servikal segmentine ait bir kesit (c, d). 1: Substantia grisea. 2: Substantia alba. Ok: Kanalis sentralis. Ok başları: Motorik hücreler. e: Ependim hücreleri, Üçlü boyama.

İnkübasyonun 21. günü

Kuluçkadan çıkış günü olan bu dönemde tüm gruplarda medulla spinalis'in klasik histolojik organizasyonunu hemen hemen tamamlamış olduğu dikkati çekti (Şekil 4a, c). Substantia grisea yüzey alanınının medulla spinalisin kesitlerdeki toplam yüzey alanına oranı 0,6 mg/g

ve 1,2 mg/g dozunda MSG uygulanan gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalmış olduğu tespit edildi ($p<0.05$, Tablo 1). Kanalis sentralis'in enine ve boyuna çaplarının ise MSG uygulanan gruplarda, kontrol ve distile su grubuna göre azaldığı dikkati çekti ($p<0.05$, Tablo 2).



Şekil 4. Kuluçkanın yirmi birinci günü kontrol grubundan bir embriyonun medulla spinalisin servikal segmentine ait bir kesit (a, b). Kuluçkanın yirmi birinci günü 0,12 mg/g MSG uygulanan bir embriyoya ait medulla spinalisin servikal segmentine ait bir kesit (c, d). 1: Substantia grisea. 2: Substantia alba. Ok: Kanalis sentralis. Ok başları: Motorik hücreler. e: Ependim hücreleri, Toluidine blue boyama (a, c), Üçlü boyama (b, d).

Histopatolojik Bulgular

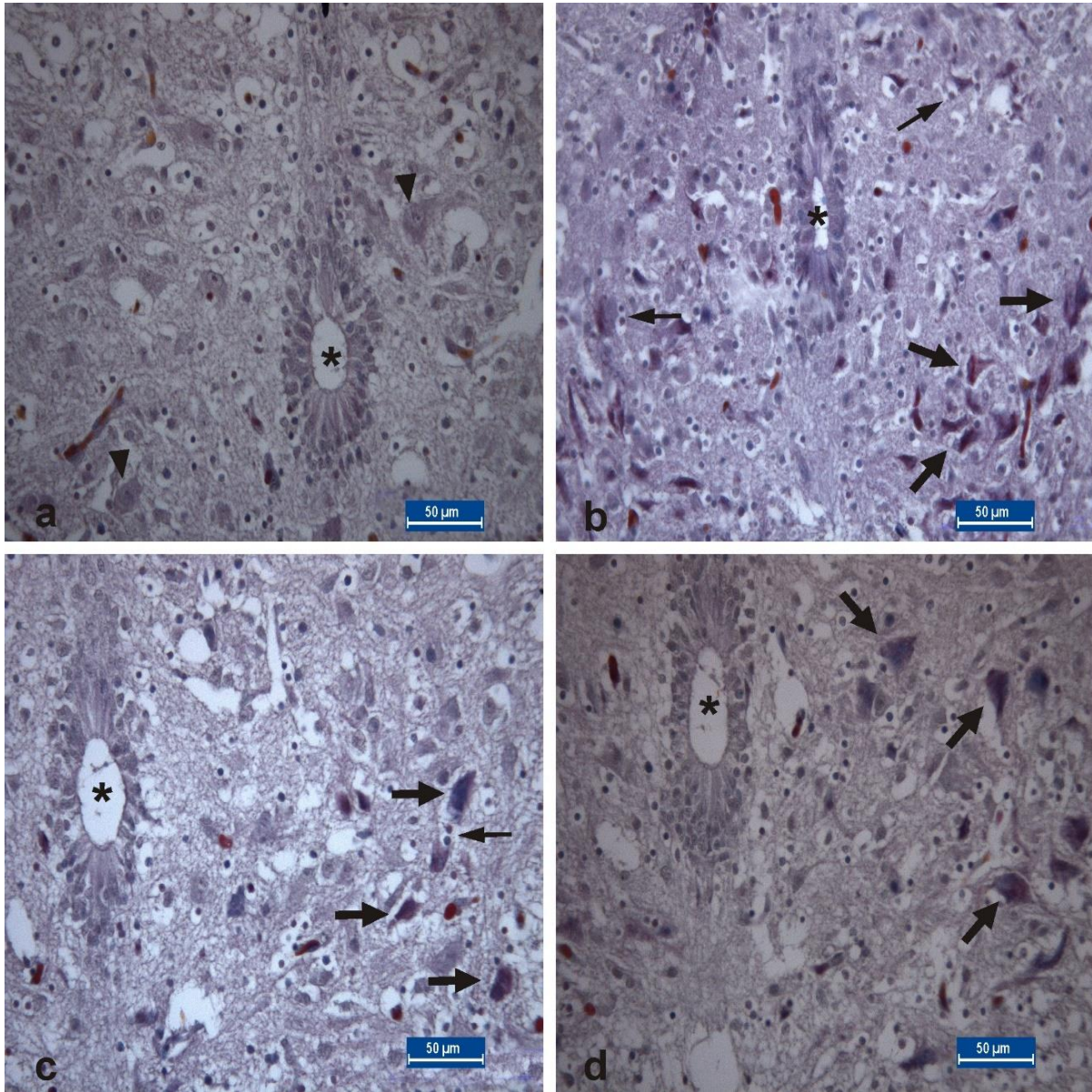
Medulla spinalisin ventral kornusunda bulunan motorik nöronlarda MSG uygulanan gruplarda 15., 18. ve 21. günlerde nekroz ve nöronofaji gibi

histopatolojik değişikliklere rastlandı (Şekil 5b,c,d, 6b,c,d, 7b,c,d) ve kontrol ve distile su grupları ile karşılaştırıldığında motor nöronlardaki nekrozda önemli bir artış dikkati çekti ($p<0.05$, Tablo 3).

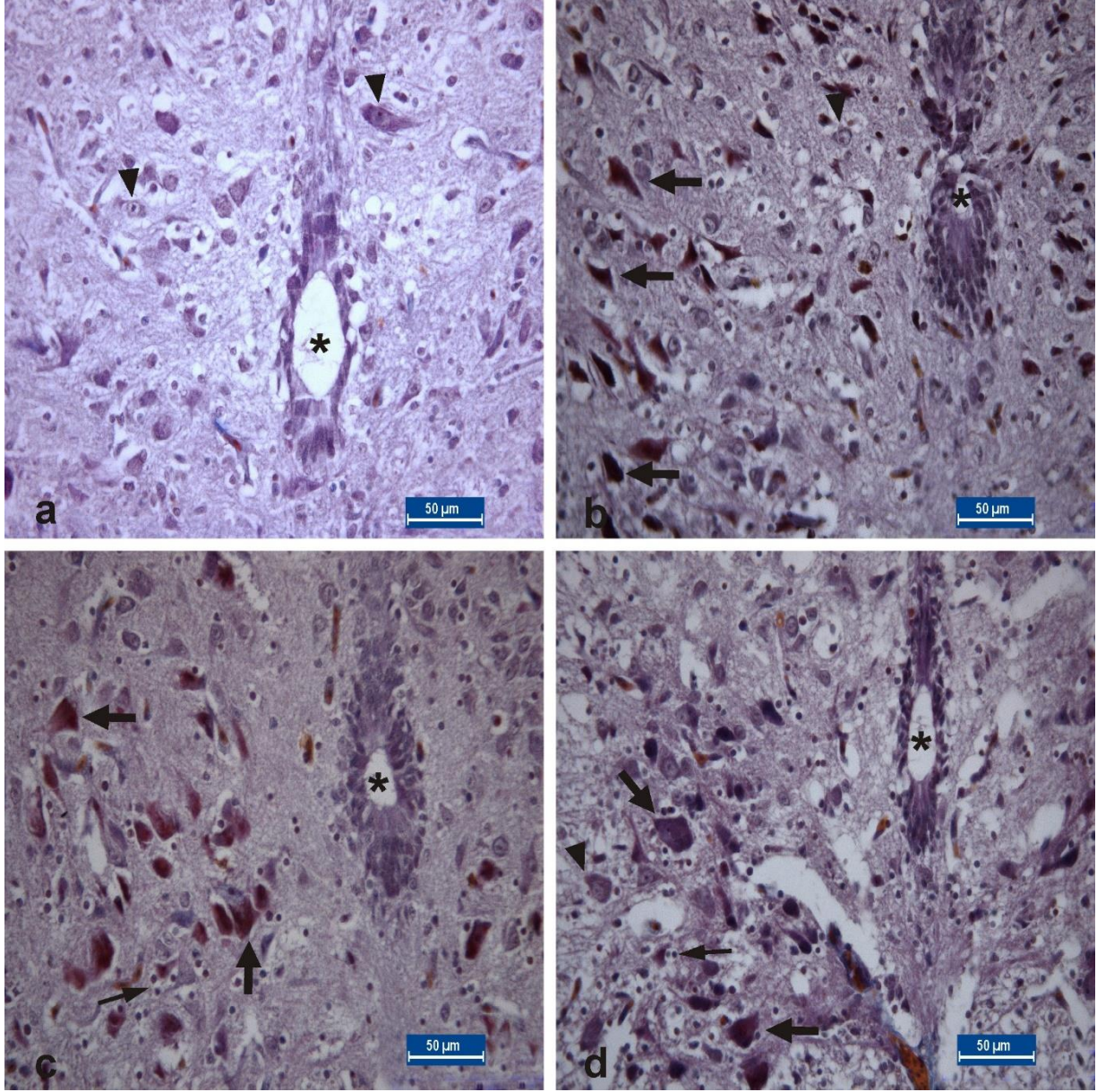
Tablo 3. İnkübasyonun 15, 18 ve 21. günlerinde medulla spinalisin ventral kornusunda bulunan motor nöronlarda nekrotik nöronların yüzdesi (%).

Gruplar n=6	15.gün	18.gün	21.gün
Kontrol	0,50±1,22 ^a	1,00±2,44 ^a	0,50±1,22 ^a
Distile su	2,25±2,62 ^a	3,50±2,38 ^a	2,75±3,40 ^a
0,12 mg/g MSG	17,80±1,92 ^b	25,40±2,07 ^b	22,40±3,43 ^b
0,6 mg/g MSG	21,40±2,70 ^b	39,00±3,80 ^c	35,80±1,64 ^c
1,2 mg/g MSG	22,00±3,53 ^b	38,40±5,50 ^c	33,40±2,88 ^c

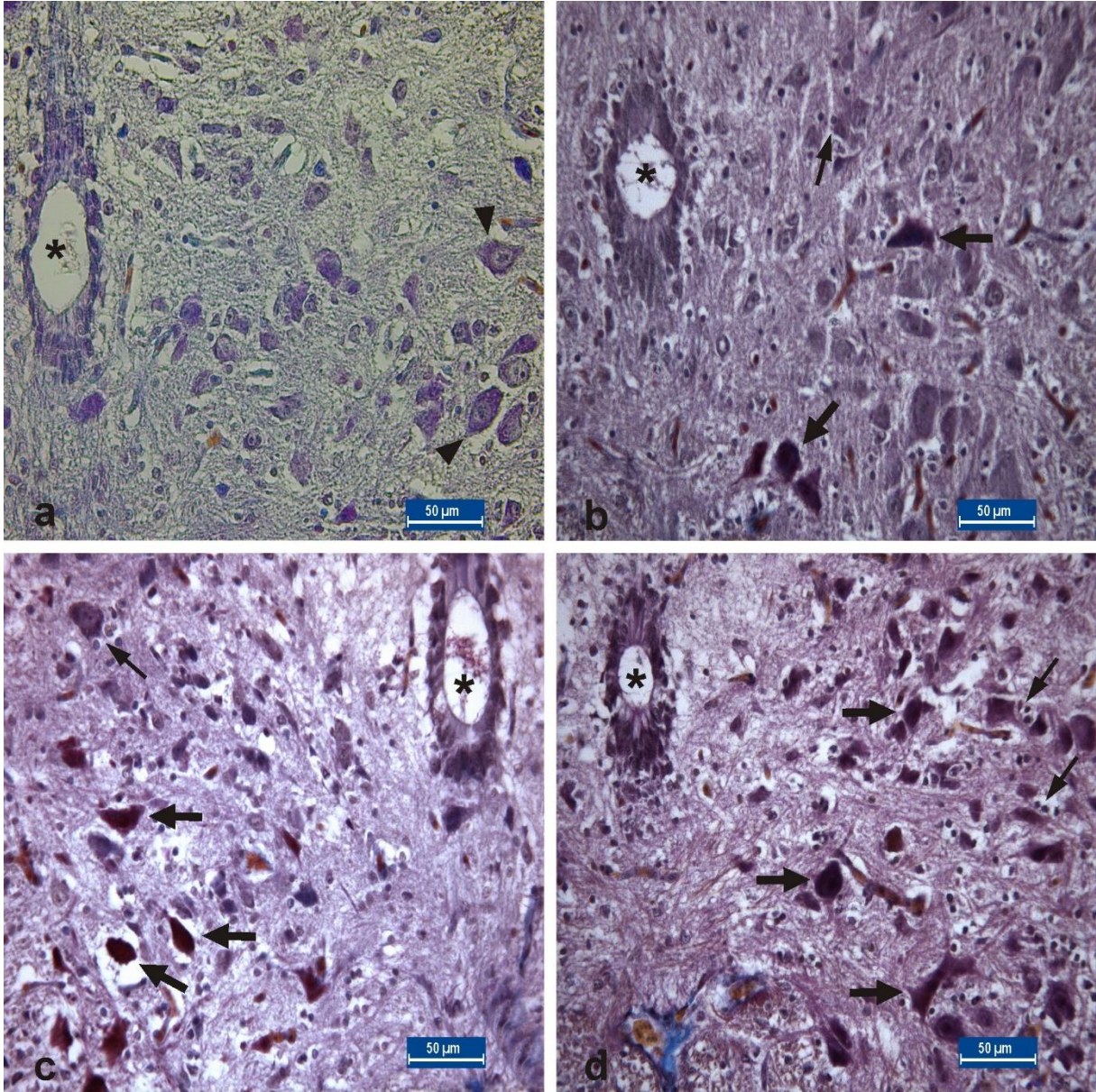
^{a,b} Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiksel öneme sahiptir ($p < 0.05$).



Şekil 5. Kuluçkanın on beşinci günü kontrol grubundan bir embriyonun medulla spinalisin servikal segmentine ait bir kesit (a). Kuluçkanın on beşinci günü 0,12 mg/g MSG uygulanan (b), 0,6 mg/g MSG uygulanan (c) ve 1,2 mg/g MSG uygulanan (d) bir embriyoya ait medulla spinalisin servikal segmentine ait bir kesit. Yıldız: Kanalis sentralis, kalın ok: Nöronlarda nekroz, ince ok: Nöronofaji, ok başı: Normal motorik hücreler. Üçlü boyama, Bar: 50 µm.



Şekil 6. Kuluçkanın on sekizinci günü kontrol grubundan bir embriyonun medulla spinalisin servikal segmentine ait bir kesit (a). Kuluçkanın on sekizinci günü 0,12 mg/g MSG uygulanan (b), 0,6 mg/g MSG uygulanan (c) ve 1,2 mg/g MSG uygulanan (d) bir embriyoya ait medulla spinalisin servikal segmentine ait bir kesit. Yıldız: Kanalis sentralis, kalın ok: Nöronlarda nekroz, ince ok: Nöronofaji, ok başı: Normal motorik hücreler. Üçlü boyama, Bar: 50 µm.



Şekil 7. Kuluçkanın yirmi birinci günü kontrol grubundan bir civcivin medulla spinalisin servikal segmentine ait bir kesit (a). Kuluçkanın yirmi birinci günü 0,12 mg/g MSG uygulanan (b), 0,6 mg/g MSG uygulanan (c) ve 1,2 mg/g MSG uygulanan (d) bir civcive ait medulla spinalisin servikal segmentine ait kesit. Yıldız: Kanalis sentralis, kalın ok: Nöronlarda nekroz, ince ok: Nöronofaji, ok başı: Normal motorik hücreler. Üçlü boyama, Bar: 50 µm.

TARTIŞMA

MSG, dünya çapında gıda endüstrisinde en çok kullanılan lezzet arttırıcı gıda katkı maddelerinden biridir (Beyreuther vd., 2007). Tüm dünyada gıdalarda MSG kullanımı hakkında süregelen bir tartışma vardır (Henry-Unaeze, 2017). MSG'nin lezzet arttırıcı gıda katkı maddesi olarak kullanımına ilişkin düzenlemeler getirilmiştir. 1971 yılında JECFA tarafından belirlenen glutamik asit ve tuzları için

kabul edilebilir günlük alım miktarı vücut ağırlığının kilogramı başına 120 mg olarak belirlenmiştir. Ancak Ağustos 2017'de Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından MSG'nin güvenilirliğinin yeniden değerlendirilmesi sonucu MSG'nin günlük alım miktarı 30 mg/kg vücut ağırlığı olarak revize edilmiştir (Nguyen vd., 2020). Gelişmiş ülkelerde ortalama MSG alımının 0,3-1,0 g/gün olduğu tahmin edilmektedir (Hajjhasani vd., 2020). Ancak son yıllarda değişen yaşam tarzları

ve yeme alışkanlıkları nedeniyle işlenmiş ve paketlenmiş gıdaların tüketiminin artması, bu kimyasalların kabul edilebilir günlük alım miktarını aşma riskini arttırmıştır (Jain & Mathur, 2015).

MSG'nin plasenta bariyerine nüfuz ettiği ve embriyonik dokulara dağıldığı bildirilmiştir (Gao vd., 1994). Bu nedenle son yıllarda çalışmalar MSG'nin gelişimsel etkilerine odaklanmıştır (Al-Qudsi & Al-Jahdali, 2012; AL-Sharkawy vd., 2017). MSG'nin gebe ratlara subkutan enjeksiyonu sonucu hem gebe ratlarda hem de fetüslerinde nöronal hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (Toth vd., 1987).

MSG tüketiminin sinir sistemi üzerindeki toksik etkilerini araştıran birçok çalışma yapılmıştır (Abass & Abd El-Haleem, 2011; Al-Qudsi & Al-Jahdali, 2012; AL-Sharkawy vd., 2017; Dief vd., 2014; Espinar vd., 2000; Hashem vd., 2012). Abass ve Abd El-Haleem (2011), MSG'ye maruz kalan ratlarda beyin ve beyincik dokusunda; piknoz, vakuolizasyon, nörodejenerasyon, koroid pleksus tıkanıklığı, gliosis ve satellitozis gibi histopatolojik değişiklikler gözlemlemişlerdir. Hashem vd. (2012) MSG'nin sadece sinir hücreleri üzerinde değil aynı zamanda sinir hücrelerini toksik etkilerden koruyan astrositler üzerinde de toksik etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Ishikawa vd. (1997) neonatal ratlarda MSG'nin öğrenme bozukluğu ile ilişkili hipokampal CA1 pramidial nöronlarda dejenerasyona neden olduğunu bildirmiştir. Khadija vd. (2009) da rasyona farklı oranlarda ilave edilen MSG'nin broiler civcivlerde orta beyinde kromatoliz, fibrolamellasyon ve gliosis ile beyincikte nöronlarda dejenerasyon ve histopatolojik lezyonlara neden olduğunu göstermişlerdir. Embriyonik dönemde MSG'ye maruz kalan hayvanlarda erişkinlik döneminde davranış bozuklukları gözlenmiştir (Horvath vd., 2013; Rosa vd., 2015).

Firgany ve Sarhan (2020) yaşlı ratlara MSG uygulamasının sonucunda MSG'nin kan beyin

bariyerini geçerek motor nöronlarda ve nöroglia hücrelerinde dejeneratif ve apoptotik değişikliklere neden olduğunu ortaya koymuştur. Kan beyin bariyerinin henüz gelişimini tamamlamadığı yenidoğan döneminde MSG uygulamasının ratlarda farklı beyin bölgelerinde ve medulla spinaliste nöronal dejenerasyona neden olduğu bildirilmiştir (Firgany & Sarhan, 2020; Kubo vd., 1993; Rivera-Carvantes vd., 2017; Rivera-Cervantes vd., 2015; Rosa vd., 2018). Al-Qudsi ve Al-Jahdali (2012) yumurtaya farklı dozlarda MSG enjekte etmiş ve inkübasyonun 7, 10 ve 14. gününde açılan yumurtalardan elde edilen tavuk embriyolarında, kontrol grubuna kıyasla MSG gruplarında embriyonik gelişme geriliği, deri altı kanama, abdominal herni, beyin deformasyonu, monoftalmi ve gaga malformasyonları gibi konjenital malformasyonlar görüldüğünü bildirmiştir. Roongruangchai vd. (2018) vitellüs kesesine farklı konsantrasyonlarda MSG'yi (1, 1.5, 2.5 ve 3 mg MSG/gm yumurta) enjekte etmiş ve MSG'nin beyin, göz, kalp ve iç organlarda büyüme geriliğine, embriyonik ölüme ve konjenital malformasyonlara neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da, kuluçkanın 15., 18. ve 21. günlerinde medulla spinalisin ventral kornusunda bulunan motorik nöronlarda MSG uygulanan gruplarda nekroz ve nöronofaji gibi histopatolojik değişikliklere rastlandı. Ayrıca MSG grupları kontrol ve distile su grupları ile karşılaştırıldığında motor nöronlardaki nekrozda önemli bir artış dikkati çekti ($p<0.05$).

Kanatlılarda merkezi sinir sistemi oluşumunun en erken göstergesinin kuluçkanın 16 ile 18. saatlerinde nöral plakayı oluşturan ektodermin lokal kalınlaşması olduğu bildirilmiştir. Nöral tüpün sefalik kısmı beyni oluşturmak için genişlemekte ve nöral tüpün geri kalan kısmı omuriliği meydana getirmektedir. Nöroepitel, nöroblast ve glia hücre hatlarını oluşturması yanında, beyin ventrikülüsleri ve medulla spinalisin kanalis sentralisini örten ependim hücrelerine de farklılaşır. Gelişim

ilerledikçe, spinal cord'un yanal duvarı, ince kalan dorsal ve ventral duvarlara kıyasla büyük ölçüde kalınlaşır. Bu süreçte, kanalis sentralis yanal olarak sıkıştırılır, böylece enine kesitte yanlardan basık olarak görünür (Sturkie 1986).

Brinkman ve Martin (1973), kanatlı medulla spinalisinde inkubasyonun on ikinci gününde servikal ve lumbal bölgelerin ayırt edilebildiğini, kuluçkanın on dördüncü gününde medulla spinalisin substansiya grisea bölgesinin yetişkinlerdekine benzer bir organizasyon gösterdiğini, dorsal ve ventral kornunun ayırt edilebildiğini bildirmişlerdir. Necker (2005) substansiya grizeanın kuluçkadan çıkışa kadar önemli bir değişiklik göstermediğini ve servikal segmentte motor nöronların belirgin olduğunu gözlemlemiştir.

Kanatlılarda medulla spinalisin embriyonik gelişimi ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. İzgi (2019), yumurtaya kuluçkanın başlangıcında 2.5, 12.5 ve 37.5 mg/kg propofol enjekte etmiş, substantia grisea yüzey alanının medulla spinalis'in kesitlerde izlenen toplam yüzey alanına oranının 15, 18 ve 21. günlerde histolojik organizasyon açısından deney ve kontrol grupları arasında belirgin bir fark gözlenmemesine karşın yapılan histometrik ölçümler sonrasında bu oranın propofol enjekte edilen gruplarda embriyoların servikal segmentlerinde arttığını, torakal ve lumbal segmentlerinde ise azaldığını bildirmiştir. Araştırmacı kanalis sentralis üzerinde yaptığı histometrik ölçümler sonucunda kontrol ve deney grupları arasında kanalın enine ve boyuna çaplarının servikal, torakal ve lumbal segmentler seviyesinde farklılıklar gösterdiğini tespit etmiştir. Bu çalışmada da yapılan histometrik ölçümlerde MSG uygulanan gruplarda substantia grisea'nın kesitlerdeki toplam medulla spinalis yüzey alanına oranında 15.gün yapılan histometrik ölçümler sonucunda kontrol ve MSG grupları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı, 18. günde özellikle 0,6 mg/g yumurta

dozunda MSG uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla arttığı, 21. günde ise 0,6 mg/g ve 1,2 mg/g dozunda MSG uygulanan grupta kontrol ve distile su grubu ile karşılaştırıldığında azalmış olduğu tespit edildi. Kanalis sentralis'in enine ve boyuna çapları üzerinde yapılan değerlendirmelerde ise MSG uygulanan gruplarda, kontrol ve distile su grubuna göre enine ve boyuna çapların azaldığı dikkati çekti.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar, MSG'nin medulla spinalisin embriyonik gelişimini olumsuz yönde etkilediğini ortaya koymaktadır. Substantia grisea'da görülen bu değişikliklerin sonucu olarak medulla spinalis'in gerek motor gerekse duyu fonksiyonlarında ileriki dönemlerde defektlere yol açabileceği muhtemeldir. Kanalis sentralis çaplarındaki azalma temel görevi beyin ve medulla spinalis'e mekanik ve immünolojik koruma sağlamak olan beyin-omurilik sıvısının (BOS) dolaşımını da etkileyecektir. BOS'un serbest dolaşımını etkileyen faktörlerin yaşamın ilerleyen dönemlerinde ciddi fonksiyon bozukluklarına neden olabileceği düşünülmektedir.

SONUÇ

Bu çalışmadan elde edilen veriler, yumurtaya MSG enjeksiyonunun tavuk embriyosunun medulla spinalis dokusunun embriyonik gelişimini olumsuz yönde etkileyebileceğini göstermektedir. Gelişimin kritik bir evresi olan prenatal dönemde MSG'ye maruz kalan embriyolar sonraki yaşamlarında bazı hastalıklara daha duyarlı olabilirler.

AÇIKLAMALAR

Etik beyan: Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi (SÜVDAMEK) Etik Kurul onayı (31.05.2017 ve 2017/48) alınarak gerçekleştirilmiştir.

Çıkar çatışması: Yazarlar, bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Abass, M., & Abd El-Haleem, M. (2011).** Evaluation of monosodium glutamate induced neurotoxicity and nephrotoxicity in adult male albino rats. *Journal of American Science*, 7(8), 264-276.
- Al-Qudsi, F., & Al-Jahdali, A. (2012).** Effect of monosodium glutamate on chick embryo development. *Journal of American Science*, 8, 499-509.
- AL-Sharkawy, A. N., Gab-Allah, M. S., El-Mashad, A.-B. I., & Khater, D. F. (2017).** Pathological study on the effect of some food additives in male albino rats. *Benha Veterinary Medical Journal*, 33(2), 75-87.
- Atay, E., Ertekin, A., Bozkurt, E., & Aslan, E. (2020).** Impact of Bisphenol A on neural tube development in 48-hr chicken embryos. *Birth Defects Research*, 112(17), 1386-1396.
- Beas-Zárate, C., Pérez-Vega, M. A. I., & González-Burgos, I. (2002).** Neonatal exposure to monosodium L-glutamate induces loss of neurons and cytoarchitectural alterations in hippocampal CA1 pyramidal neurons of adult rats. *Brain Research*, 952(2), 275-281.
- Beyreuther, K., Biesalski, H. K., Fernstrom, J. D., Grimm, P., Hammes, W. P., Heinemann, U., Kempster, O., Stehle, P., Steinhart, H., Walker, R. (2007).** Consensus meeting: monosodium glutamate - an update. *European journal of clinical nutrition*, 61(3), 304-313. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602526>
- Brinkman, R., & Martin, A. (1973).** A cytoarchitectonic study of the spinal cord of the domestic fowl *Gallus gallus domesticus*. I. Brachial region. *Brain Research*, 56, 43-62.
- Chambille, I., & Serviere, J. (1993).** Neurotoxic effects of neonatal injections of monosodium L-glutamate (L-MSG) on the retinal ganglion cell layer of the golden hamster: Anatomical and functional consequences on the circadian system. *Journal of Comparative Neurology*, 338(1), 67-82.
- Çetin, S., & Özyayın, T. (2021).** The effects of bisphenol A given in ovo on bursa of Fabricius development and percentage of acid phosphatase positive lymphocyte in chicken. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-10.
- Dief, A. E., Kamha, E. S., Baraka, A. M., & Elshorbagy, A. K. (2014).** Monosodium glutamate neurotoxicity increases beta amyloid in the rat hippocampus: a potential role for cyclic AMP protein kinase. *Neurotoxicology*, 42, 76-82.
- Espinar, A., García-Oliva, A., Isorna, E. M., Quesada, A., Prada, F. A., & Guerrero, J. M. (2000).** Neuroprotection by melatonin from glutamate-induced excitotoxicity during development of the cerebellum in the chick embryo. *Journal of pineal research*, 28(2), 81-88.
- Firgany, A. E.-D. L., & Sarhan, N. R. (2020).** Quercetin mitigates monosodium glutamate-induced excitotoxicity of the spinal cord motoneurons in aged rats via p38 MAPK inhibition. *Acta Histochemica*, 122(5), 151554.
- Gad, F. A., Farouk, S. M., & Emam, M. A. (2021).** Antiapoptotic and antioxidant capacity of phytochemicals from Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) and their potential effects on monosodium glutamate-induced testicular damage in rat. *Environmental science and pollution research international*, 28(2), 2379-2390. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10674-7>
- Gao, J., Wu, J., Zhao, X., Zhang, W., Zhang, Y., & Zhang, Z. (1994).** Transplacental neurotoxic effects of monosodium glutamate on structures and functions of specific brain areas of filial mice. *Sheng li xue bao:[Acta physiologica Sinica]*, 46(1), 44-51.
- Geha, R. S., Beiser, A., Ren, C., Patterson, R., Greenberger, P. A., Grammer, L. C., Ditto, A. M., Harris, K. E., Shaughnessy, M. A., Yarnold, P. R., Corren, J., Saxon, A. (2000).** Review of alleged reaction to monosodium glutamate and outcome of a multicenter double-blind placebo-controlled study. *The Journal of nutrition*, 130(4S Suppl), 1058-1062. <https://doi.org/10.1093/jn/130.4.1058S>
- Hajjhasani, M. M., Soheili, V., Zirak, M. R., Sahebkar, A., & Shakeri, A. (2020).** Natural products as safeguards against monosodium glutamate-induced toxicity. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23(4), 416.
- Hashem, H. E., El-Din Safwat, M. D., & Algaidi, S. (2012).** 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*, 43(2), 179-186. <https://doi.org/10.1007/s10735-011-9380-0>
- Hegazy, A. A., Ibrahim, I. H., Sabry, R. M., & Abass, E. S. (2017).** Effect of gestational exposure to monosodium glutamate on the structure of fetal rat lung. *Anatomy Physiol. Biochem. Int. J*, 3(2), 1-6.
- Henry-Unaeze, H. N. (2017).** Update on food safety of monosodium l-glutamate (MSG). *Pathophysiology*, 24(4), 243-249. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2017.08.001>
- Horvath, G., Reglodi, D., Vadasz, G., Farkas, J., & Kiss, P. (2013).** Exposure to enriched environment decreases neurobehavioral deficits induced by neonatal glutamate toxicity. *International journal of molecular sciences*, 14(9), 19054-19066.
- Ishikawa, K., Kubo, T., Shibasaki, S., Matsumoto, A., Hata, H., & Asai, S. (1997).** Hippocampal degeneration inducing impairment of learning in rats: model of dementia? *Behavioural Brain Research*, 83(1), 39-44. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(97\)86043-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-4328(97)86043-3)
- İzgi, M. (2019).** Yumurta Verilen Propofol'un Merkezi Sinir Sistemi Üzerindeki Embriyotoksik Etkilerinin Histolojik Yöntemlerle Belirlenmesi. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

- Jain, A., & Mathur, P. (2015).** Evaluating hazards posed by additives in food—a review of studies adopting a risk assessment approach. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 3(3), 243-255.
- Jelinek, R. (1977).** Methods in prenatal toxicology. In: *The chick embryotoxicity screening test (CHEST)*. Eds: Neubert D, Merker H, Kwasigroch T. Stuttgart: Georg Thieme, p. 381-6.
- Kandil, B., & Sur, E. (2018).** The light microscopic investigation of the effects of in-ovo administered bisphenol A (BPA) on the development of testes. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 65(3), 273-281.
- Kazmi, Z., Fatima, I., Perveen, S., & Malik, S. S. (2017).** Monosodium glutamate: Review on clinical reports. *International Journal of food properties*, 20(sup2), 1807-1815.
- Khadija, A., Ati, A., Mohammed, S., Saad, A., & Mohamed, H. (2009).** Response of broiler chicks to dietary monosodium glutamate. *Pakistan Veterinary Journal*, 29(4), 165-168.
- Kubo, T., Kohira, R., Okano, T., & Ishikawa, K. (1993).** Neonatal glutamate can destroy the hippocampal CA1 structure and impair discrimination learning in rats. *Brain Res*, 616(1-2), 311-314.
- López-Pérez, S. J., Ureña-Guerrero, M. E., & Morales-Villagrán, A. (2010).** Monosodium glutamate neonatal treatment as a seizure and excitotoxic model. *Brain Research*, 1317, 246-256.
- Miko, A. M., Shehu, A. M., Bello, N., Allyu, I. A., Tasiu, I., Abdussalam A.O., & Isa, A. S. (2016).** A morphometric study of the teratogenic effect of monosodium glutamate on the developing developing cerebral cortex of Wista Rat (*Rattus norvegicus*). *Nigerian Journal of Scientific Research*, 15(3): 240-244.
- Necker, R. (2005).** Embryonic development of choline acetyltransferase and nitric oxide synthase in the spinal cord of pigeons and chickens with special reference to the superficial dorsal horn. *Anatomy and embryology*, 210(2), 145-154.
- Nguyen, L., Salanta, L.-C., Socaci, S., Tofana, M., Fărcaș, A., & Pop, C. (2020).** A Mini Review About Monosodium Glutamate. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology*, 77, 2020. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-fst:2019.0029>
- Oladipo, I., Adebayo, E., & Kuye, O. (2015).** Effects of monosodium glutamate in ovaries of female Sprague-Dawley rats. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(5), 737-745.
- Olney, J. W. (1969).** Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, 164(3880), 719-721.
- Öznurlu, Y., Özaydın, T., Sur, E., & Özparlak, H. (2021).** The effects of in ovo administered bisphenol A on tibial growth plate histology in chicken. *Birth Defects Research* doi.org/10.1002/bdr2.1925 (in press). <https://doi.org/10.1002/bdr2.1925>
- Quines, C. B., Rosa, S. G., Da Rocha, J. T., Gai, B. M., Bortolatto, C. F., Duarte, M. M. M., & Nogueira, C. W. (2014).** Monosodium glutamate, a food additive, induces depressive-like and anxiogenic-like behaviors in young rats. *Life sciences*, 107(1-2), 27-31.
- Rivera-Carvantes, M. C., Jarero-Basulto, J. J., Feria-Velasco, A. I., Beas-Zárate, C., Navarro-Meza, M., González-López, M. B., Gudiño-Cabrera, G., García-Rodríguez, J. C. (2017).** Changes in the expression level of MAPK pathway components induced by monosodium glutamate-administration produce neuronal death in the hippocampus from neonatal rats. *Neuroscience*, 365, 57-69.
- Rivera-Cervantes, M. C., Castañeda-Arellano, R., Castro-Torres, R. D., Gudiño-Cabrera, G., y Velasco, A. I. F., Camins, A., & Beas-Zárate, C. (2015).** P38 MAPK inhibition protects against glutamate neurotoxicity and modifies NMDA and AMPA receptor subunit expression. *Journal of Molecular Neuroscience*, 55(3), 596-608.
- Roongruangchai, J., Viravud, Y., Plakornkul, V., Sripaoraya, K., Boonmark, W., & Roongruangchai, K. (2018).** The Teratogenic Effects of Monosodium Glutamate (MSG) on the Development of Chick Embryos. *Siriraj Medical Journal*, 70(6), 514-522.
- Rosa, S. G., Chagas, P. M., Pesarico, A. P., & Nogueira, C. W. (2018).** Monosodium glutamate induced nociception and oxidative stress dependent on time of administration, age of rats and susceptibility of spinal cord and brain regions. *Toxicology and applied pharmacology*, 351, 64-73.
- Rosa, S. G., Quines, C. B., da Rocha, J. T., Bortolatto, C. F., Duarte, T., & Nogueira, C. W. (2015).** Antinociceptive action of diphenyl diselenide in the nociception induced by neonatal administration of monosodium glutamate in rats. *European journal of pharmacology*, 758, 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.060>
- Sturkie P.D. (1986).** Avian Physiology. Fourth edition, Springer-Verlag New York, Inc., p. 10-15.
- Toth, L., Karcsu, S., Feledi, J., & Kreutzberg, G. (1987).** Neurotoxicity of monosodium-L-glutamate in pregnant and fetal rats. *Acta neuropathologica*, 75(1), 16-22.
- Williams, A., & Woessner, K. (2009).** Monosodium glutamate ‘allergy’: menace or myth? *Clinical & Experimental Allergy*, 39(5), 640-646.
- Zanfirescu, A., Ungurianu, A., Tsatsakis, A. M., Nițulescu, G. M., Kouretas, D., Veskoukis, A., Tsoukalas, D., Engin, A. B., Aschner, M., Margină, D. (2019).** A Review of the Alleged Health Hazards of Monosodium Glutamate. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(4), 1111-1134. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12448>