



T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**GLİFOSAT TOKSİSİTESİNDE GALLİK ASİT'İN
KARACİĞERDEKİ KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN
İNCELENMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. MAHSUM BARÇIN

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. BURAK VELİ ÜLGER

DİYARBAKIR -2024

BEYAN

Bu tezin tamamen tarafıma ait olduğunu, tezin yazımındaki tüm aşamalarda etik dışı yazımın olmadığını ve telif haklarına uygun davrandığımı, edindiğim tüm verileri bilimsel çerçevede temin ettiğimi, belirtmiş olduğum tüm bilgi ve yorumlara da referans gösterdiğimi beyan ederim.

Ağustos 2024

Mahsum BARÇIN

TEŞEKKÜR

Çalışmamda desteklerini esirgemeyen uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana yön veren değerli tez hocam Prof. Dr. Burak Veli ÜLGER hocama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Genel cerrahi eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan başta sayın anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Abdullah OĞUZ hocam olmak üzere tüm değerli öğretim üyelerimiz Dr. Öğrt. Üyesi Hatice Gülşen YILMAZ, Prof. Dr. Sadullah GİRĞİN, Prof. Dr. Ercan GEDİK, Prof. Dr. Mehmet YILMAZ, Prof. Dr. Mehmet Veysi BAHADIR, Doç. Dr. Ulaş ADAY, Doç. Dr. Mehmet Tolga KAFADAR, Doç. Dr. Murat SEVMİŞ hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Histoloji Anabilim Dalında görevli Dr. Eda YILDIZHAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca beni her zaman destekleyen bu günlere gelmemi sağlayan ailem; annem, babam, kardeşlerim ve eşime teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalışmaktan onur duyduğum değerli uzman ve asistan doktor arkadaşlarım; Op. Dr. Esra HAMURCU, Op. Dr. M. Ali KIRŞAN, Op. Dr. Gizem YAMAN, Op. Dr. İbrahim Halil ÖCAL, Op. Dr. Mehmet RENÇBER, Op. Dr. Faruk TATLI, Op. Dr. Hikmet ÖZESMER, Op. Dr. Faik Veysel AKPULAT, Op. Dr. Mehmet Mazlum İNAN, Op. Dr. Şakir KOCA, Dr. Azat KÖZGÜN, Dr. Baran DEMİR, Dr. Aydın BARS, Dr. Ömer Serhat DAĞ, Dr. Mazlum GÜNDÜZ, Dr. Ferdi BAYRAK, Dr. Abdulkadir AKBAŞ, Dr. Alper KIZIL, Dr. Ferhat IŞIK, Dr. Mervan KAMAR, Dr. Hasan ALKLAY, Dr. Bilal URUÇ, Dr. Çağrı ARSLAN, Dr. Dilan YILDIZ, Dr. Hasip GÖZÖNÜNDE, Dr. Zehra ŞEKHO, Dr. Ayşe MUTLU, Dr. İsmail ATAM, Dr. Mirkan Can AYHAN, Dr. Veli İÇKE'ye teşekkür ederim.

Bu tez, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığınca TIP.22.026 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLO LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Karaciğer Embriyolojisi.....	7
2.2. Karaciğer Histolojisi.....	7
2.3. Karaciğer Anatomisi	8
3. MATERYAL ve METOD	16
3.1.Glifosat Dozunun Belirlenmesi ve Temini	16
3.2.Gallik Asit Dozunun Belirlenmesi ve Temini.....	16
3.3.Deney Gruplarının Belirlenmesi	16
3.4.Histopatolojik incelemeler	17
3.4.1.Hematoksilen&Eozin Boyama Protokolü	19
3.4.2.Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Protokolü	20
3.5.İmmunohistokimyasal incelemeler	22
3.6.Biyokimyasal Analizler.....	23
3.6.1.Total Antioksidan Kapasitesi (TAS).....	23
3.6.2.Total Oksidan Kapasitesi (TOS)	23
3.6.3.Kan Serum Malondialdehit (MDA) ve Interlökin-6 (İl-6) Değerlerinin Ölçülmesi .	23
3.7.Serum biyokimyasal değerlerin ölçülmesi Testleri.....	24

3.8.İstatistiksel Analiz.....	24
4. BULGULAR	25
4.1.Histopatolojik incelemeler	25
4.2.İmmunohistokimyasal incelemeler	30
4.3.Biyokimyasal Analizler.....	34
4.3.1.Total Antioksidan Kapasitesi (TAS).....	34
4.3.2.Total Oksidan Kapasitesi (TOS)	35
4.3.3.Kan Serum Malondialdehit (MDA) Değerlerinin Ölçülmesi	35
4.3.4.Kan Serum Interlökin-6 (İl-6) Değerlerinin Ölçülmesi	36
4.3.5.Serum biyokimyasal değerlerin ölçülmesi Testleri	38
5. TARTIŞMA.....	42
6. SONUÇ:.....	46
KAYNAKLAR:	47

TABLO LİSTESİ

TABLO 1 HEPATİK ARTER ANATOMİ ÇEŞİTLERİ VE SIKLIĞI (52,53).....	12
TABLO 2 KARACİĞER HASTALIKLARINDA LABORATUVAR PARAMETRELERİ (52).	15
TABLO 3 HİSTOLOJİK TAKİBİNİN AŞAMALARI.....	18
TABLO 4 HEMATOKSİLEN & EOZİN BOYAMA İŞLEMİNİN AŞAMALARI.....	20
TABLO 5 PERİYODİK ASİT SCHIFF BOYAMA İŞLEMİNİN AŞAMALARI.....	22
TABLO 6 GRUPLAR ARASI KARACİĞER HASARI ORTALAMASI ALINAN GRUPLARIN ORTALAMA±STANDART SAPMALARI.....	26
TABLO 7 GRUPLAR ARASI ORTALAMASI ALINAN SERUM MDA, IL-6 (NORMAL DEĞERİ: <8 PG/ML), TAS VE TOS DEĞERLERİNİN ORTALAMA±STANDART SAPMALARI.....	37
TABLO 8 GRUPLAR ARASI ORTALAMASI BAKILAN SERUM AST (U/L), ALT (U/L), İNDİREK BİLİRUBİN (MG/DL), DİREK BİLİRUBİN (MG/DL), TOTAL BİLİRUBİN (MG/DL) VE ALBUMİN (MG/DL) DEĞERLERİNİN ORTALAMA±STANDART SAPMALARI.....	41

ŞEKİL LİSTESİ

ŞEKİL 1 KARACİĞERİ ASAN LİGAMENTLER	9
ŞEKİL 2 HEPATOGASTRİK VE HEPATODUODENAL LİGAMENTLER (49).	9
ŞEKİL 3 KARACİĞERİN SEGMENTLERİ (48)	10
ŞEKİL 4 HEPATİK ARTER ANATOMİSİ (48).	11
ŞEKİL 5 HEPATİK ARTER VARYASYONLARI (49).	11
ŞEKİL 6 PORTAL VENİN ANATOMİSİ (45).	13
ŞEKİL 7 PORTAL VENİN DALLANMASI (45).	13
ŞEKİL 8 HEPATİK ZONLAR VE MİKROANATOMİ (54).	14
ŞEKİL 9 SIÇANLARDA KARACİĞER ANATOMİSİ (55).	15
ŞEKİL 10 KARACİĞER DOKULARINDA OLUŞAN HASARIN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ SONUCU OLUŞAN ORTALAMALARIN GRAFİĞİ.	25
ŞEKİL 11 KONTROL GRUBUNDA KARACİĞER DOKUSUNUN IŞIK MİKROSKOBU ALTINDAKİ GÖRÜNTÜSÜ (H&E, BAR 50 µM).	26
ŞEKİL 12 GA GRUBUNDA KARACİĞER DOKUSUNUN IŞIK MİKROSKOBU ALTINDAKİ GÖRÜNTÜSÜ (H&E, BAR 50 µM).	27
ŞEKİL 13 GLP GRUBUNDA KARACİĞER DOKUSUNUN IŞIK MİKROSKOBU ALTINDAKİ GÖRÜNTÜSÜ. HEPATOSİTLERDE DEJENERASYON, VENA SENTRALİSTE DEJENERASYON, HEMORAJİ, İŞİNSAL DİZİLİMİN BOZULMASI VE KONJESYON OLUŞMASI (H&E, BAR 50 µM).	27
ŞEKİL 14 GLP+GA GRUBUNDA KARACİĞER DOKUSUNUN IŞIK MİKROSKOBU ALTINDAKİ GÖRÜNTÜSÜ. KONJESYONDA AZALMA, DAHA DÜZGÜN İŞİNSAL DİZİLİM VE BELİRGİN HEPATOSİT HÜCRELERİ (H&E, BAR 50 µM).	28
ŞEKİL 15 GLP GRUBUNDA KARACİĞER DOKUSUNUN IŞIK MİKROSKOBU ALTINDAKİ GÖRÜNTÜSÜ. HEPATOSİTLERDE PAS POZİTİF (+) REAKSİYONUNDA AZALMA (PAS, BAR: 50 MM)	28
ŞEKİL 16 GLP+GA GRUBUNDA KARACİĞER DOKUSUNUN IŞIK MİKROSKOBU ALTINDAKİ GÖRÜNTÜSÜ. GLP GRUBUNA KIYASLA DAHA FAZLA PAS POZİTİF (+) REAKSİYONLAR (BAR: 50 MM, PAS).....	29
ŞEKİL 17 KONTROL GRUBUNDA KARACİĞER DOKUSUNUN IŞIK MİKROSKOBU ALTINDAKİ GÖRÜNTÜSÜ. HEPATOSİT HÜCRELERİNDE PAS POZİTİF (+) (BAR: 50 MM, PAS)	29
ŞEKİL 18 GA GRUBUNDA KARACİĞER DOKUSUNUN IŞIK MİKROSKOBU ALTINDAKİ GÖRÜNTÜSÜ. HEPATOSİT HÜCRELERİNDE PAS POZİTİF (+) (BAR: 50 MM, PAS)	30
ŞEKİL 19 KONTROL GRUBUNDAKİ KARACİĞER DOKULARINDA OLDUKÇA HAFİF DÜZEYDE BCL-2 POZİTİF EKSPRESYONLAR. BCL-2 İMMUNOHİSTOKİMYA BOYAMA. HEMATOKSİLEN ZIT BOYAMA İŞLEMİ. (BAR: 50 MM.).....	30

ŞEKİL 20 GA GRUBUNA AİT KARACİĞER DOKULARINDA OLDUKÇA HAFİF DÜZEYDE BCL-2 POZİTİF EKSPRESYONLAR. BCL-2 İMMUNOHİSTOKİMYA BOYAMA. HEMATOKSİLEN ZIT BOYAMA İŞLEMİ. (BAR: 50 MM.).....	31
ŞEKİL 21 GLP GRUBUNA AİT KARACİĞER DOKULARINDA BCL-2 POZİTİF EKSPRESYONLAR. BCL-2 İMMUNOHİSTOKİMYA BOYAMA. HEMATOKSİLEN ZIT BOYAMA. (BAR: 50 MM.).....	31
ŞEKİL 22 GLP+GA GRUBUNA AİT KARACİĞER DOKULARINDA GLP GRUBUNA KIYASLA BELİRGİN DÜZEYDE DAHA HAFİF BCL-2 POZİTİF EKSPRESYONLAR. BCL-2 İMMUNOHİSTOKİMYA BOYAMA. HEMATOKSİLEN ZIT BOYAMA. (BAR: 50 MM.).....	32
ŞEKİL 23 GLP GRUBUNA AİT KARACİĞER DOKULARINDA IL-6 POZİTİF EKSPRESYONLAR. BOYAMA İŞLEMİ: IL-6 İMMUNOHİSTOKİMYA. HEMATOKSİLEN, ZIT BOYAMA İŞLEMİ (BAR: 50 MM.).....	32
ŞEKİL 24 GLP+GA GRUBUNA AİT KARACİĞER DOKULARINDA GLP GRUBUNA KIYASLA BELİRGİN DÜZEYDE DAHA HAFİF IL-6 POZİTİF EKSPRESYONLAR. BOYAMA İŞLEMİ: IL-6 İMMUNOHİSTOKİMYA. HEMATOKSİLEN, ZIT BOYAMA İŞLEMİ. (BAR: 50 MM.).....	33
ŞEKİL 25 KONTROL GRUBUNA AİT KARACİĞER DOKULARINDA OLDUKÇA HAFİF DÜZEYDE IL-6 POZİTİF EKSPRESYONLAR. BOYAMA İŞLEMİ: IL-6 İMMUNOHİSTOKİMYA. HEMATOKSİLEN, ZIT BOYAMA İŞLEMİ. (BAR: 50 MM.).....	33
ŞEKİL 26 GA GRUBUNA AİT KARACİĞER DOKULARINDA OLDUKÇA HAFİF DÜZEYDE IL-6 POZİTİF EKSPRESYONLAR. BOYAMA İŞLEMİ: IL-6 İMMUNOHİSTOKİMYA. HEMATOKSİLEN, ZIT BOYAMA İŞLEMİ. (BAR: 50 MM.).....	34
ŞEKİL 27 SERUM TAS DEĞERLERİNİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ SONUCU OLUŞAN ORTALAMALARININ GRAFİĞİ.	35
ŞEKİL 28 SERUM TOS DEĞERLERİNİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ SONUCU OLUŞAN ORTALAMALARININ GRAFİĞİ.	35
ŞEKİL 29 SERUM MDA DEĞERLERİNİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ SONUCU OLUŞAN ORTALAMALARININ GRAFİĞİ.	36
ŞEKİL 30 SERUM IL-6 DEĞERLERİNİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ SONUCU OLUŞAN ORTALAMALARININ GRAFİĞİ.	37
ŞEKİL 31 ALT DEĞERLERİNİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ SONUCU OLUŞAN ORTALAMALARININ GRAFİĞİ.	38
ŞEKİL 32 AST DEĞERLERİNİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ SONUCU OLUŞAN ORTALAMALARININ GRAFİĞİ.....	39
ŞEKİL 33 İNDİREK BİLİRUBİN DEĞERLERİNİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ SONUCU OLUŞAN ORTALAMALARININ GRAFİĞİ.....	40
ŞEKİL 34 DİREK BİLİRUBİN DEĞERLERİNİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ SONUCU OLUŞAN ORTALAMALARININ GRAFİĞİ.....	40
ŞEKİL 35 ALBUMİN DEĞERLERİNİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ SONUCU OLUŞAN ORTALAMALARININ GRAFİĞİ.....	41

KISALTMALAR

ALT:	Alanin Aminotransferaz
AST:	Aspartat Aminotransferaz
DAB:	Diaminobenzidine
EDTA:	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
GA:	Gallik Asit
GLP :	Glifosat
H&E:	Hematoksilen & Eozin
IL:	İnterlökin
İVK:	İnferior Vena Kava
MDA :	Malondialdehit
PAS:	Periyodik Asit Schiff
SMA:	Superior Mezenterik Arter
SMV:	Superior Mezenterik Ven
TAS:	Total Antioksidan Seviyesi
TOS:	Total Oksidan Seviyesi

ÖZET

Glifosat Toksisitesinde Gallik Asit'in Karaciğerdeki Koruyucu Etkinliğinin İncelenmesi

Araş. Görevlisi Adı Soyadı: Dr. Mahsum BARÇİN

Danışman: Prof. Dr. Burak Veli ÜLGER

Anabilim Dalı: Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Giriş ve Amaç: Glifosat (GLP) dünya çapında en yaygın kullanılan herbisitlerden bir tanesidir. Memelilerde hepatotoksisite gibi önemli toksik etkiler yarattığı daha önce yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır. Doğal bir antioksidan olan Gallik asit (GA) ise meyvelerde, sebzelerde, yeşil çayda, kahvede ve sumakta bulunan doğal bir polifenolik bileşiktir. Planladığımız bu çalışmada doğal bir antioksidan olan Gallik asitin hepatotoksitede koruyucu etkinliğinin olup olmayacağını incelemeyi amaçladık.

Materyal ve Metod: Çalışmamızda 8-10 haftalık, 28 adet Wistar Albino cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar 7'li gruplar halinde 4 grup olarak ayrıldı. Grup 1: Kontrol grubu, Grup 2: GLP grubu, Grup 3: GA grubu, Grup 4: GLP + GA grubu olarak belirlendi.

Bulgular: İmmunohistokimyasal değerlendirmede Bcl-2 ve IL-6 sitokinlerinin GLP grubunda pozitif ekspresyonlar gösterdi. GLP+GA grubunda inflamasyon yolaklarını baskıladığı izlendi.

TAS değerinin GLP grubunda en düşük, GLP grubu ile GLP+GA grubu arasında anlamlı bir düşüklük olduğu izlendi. En yüksek TAS değeri GLP+GA grubunda görüldü. TOS değerinde ise en yüksek GLP grubunda izlendi. GLP grubu ile GLP+GA grubu arasında anlamlı bir yükseklik olduğu görüldü. MDA düzeylerine bakıldığında GLP grubunda en yüksekken, GLP+GA grubunda daha düşük izlendi.

AST düzeyi en yüksek GLP grubunda görülürken, GLP+GA grubuyla aralarında anlamlı fark olduğu ve GLP+GA grubunda daha düşük olduğu izlendi. İndirek bilirubin değerinin en yüksek GLP grubunda olduğu ve GLP ile GA uygulandığında düştüğü görüldü. Direk bilirubin, ALT ve albümin değerlerinde gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmedi.

Sonuç: Glifosat sıçan karaciğerinde histopatolojik, immünolojik ve biyokimyasal parametreleri olumsuz yönde etkilerken, Glifosat ile Gallik asit birlikte uygulandığında bu parametrelerin büyük bir kısmında olumlu yönde iyileşme izlendi.

Anahtar Kelimeler: Glifosat, Gallik asit, Hepatotoksite, Oksidatif stres

ABSTRACT

Investigation of the Protective Activity of Gallic Acid on the Liver in Glyphosate Toxicity

Introduction and purpose: Glyphosate (GLP) is one of the most widely used herbicides worldwide. It has been proven in previous studies that it creates significant toxic effects such as hepatotoxicity in mammals. Gallic acid (GA), a natural antioxidant, is a natural polyphenolic compound found in fruits, vegetables, green tea, coffee and sumac. In this study, we aimed to examine whether gallic acid, a natural antioxidant, would have a protective effect on hepatotoxicity.

Material and Method: In our study, 28 male Wistar Albino rats, aged 8-10 weeks, were used. The rats were divided into 4 groups of 7. Group 1: Control group, Group 2: GLP group, Group 3: GA group, Group 4: GLP + GA group.

Results: Immunohistochemical evaluation showed positive expressions of Bcl-2 and IL-6 cytokines in the GLP group. It was observed that it suppressed inflammation pathways in the GLP+GA group.

It was observed that the TAS value was lowest in the GLP group, and there was a significant decrease between the GLP group and the GLP+GA group. The highest TAS value was seen in the GLP+GA group. The highest TOS value was observed in the GLP group. A significant increase was observed between the GLP group and the GLP+GA group. Considering MDA levels, they were highest in the GLP group and lower in the GLP+GA group.

While the AST level was highest in the GLP group, it was observed that there was a significant difference between them and the GLP + GA group and was lower in the GLP + GA group. It was observed that the indirect bilirubin value was highest in the GLP group and decreased when GLP and GA were applied. No significant difference was observed between the groups in direct bilirubin, ALT and albumin values.

Conclusion: While glyphosate negatively affected the histopathological, immunological and biochemical parameters in rat liver, a positive improvement was observed in most of these parameters when glyphosate and gallic acid were applied together.

Keywords: Glyphosate, Gallic acid, Hepatotoxicity, Oxidative stress



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Herbisitler tarımda sıkça kullanılan ve kullanımı sonucu bitkilerde, toprakta, suda ve gıda ürünlerinde kalıntılarına sıklıkla rastlanılan böcek öldürücü ajanlardır (1,2). Glifosat (GLP) (N-(fosfometil) ise dünya çapında en yaygın kullanılan herbisitlerden bir tanesidir (3). Glifosat 1990 yılından bugüne kadar ekinlerin koruyuculuğunu arttırması ile bilinen ve aynı zamanda olgunlaşma sürecinde de olumlu etki eden geniş spektrumlu herbisit olarak kullanılmaktadır (4-6). Uzun yıllardır tarımdaki kullanımının artmasıyla birlikte insan sağlığı üzerindeki olumsuz sonuçları da ortaya çıkmıştır (7). Glifosatın tarımda yaygın kullanımı sadece çiftçiler için bir tehdit oluşturmazken, aynı zamanda toplum içinde büyük tehlikeler yaratmaktadır (8-11).

Glifosat aromatik özellikte olup, amino asit sentezini inhibe eder (4-6). Memelilerde hepatotoksisite, nefrotoksisite, nörotoksisite ve üreme sistemi toksisitesi gibi önemli toksik etkiler yarattığı daha önce yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır (8-11). Ayrıca hemanjiyokarsinomlar, tümörler ve malign lenfomalar, böbrek ve karaciğer adenomları, miyotik bozukluklara da sebep olduğu bilinmektedir (12). Glifosatın memelilerde ve hayvanlarda hücre ve organ bozuklukları, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal etkilere neden olduğu da düşünülmektedir (13). Glifosat kullanımının dokularda serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (14). Ayrıca tarımsal bir ilaç olan glifosatın endotoksikasyona ve bu durumun da inflamasyona neden olduğu bildirilmiştir (15-18). Endotoksin maruziyetinin TNF- α , Interlökin-1, Interlökin-6 ve Interlökin-8 benzeri çeşitli sitokinlerin salınmasına sebep olduğu ve akut inflamatuvar yanıtlara yol açtığı gösterilmiştir (18-21). Oksidatif hasarın önemli bir göstergesi olan Malondialdehit (MDA) glifosat entoksikasyonuna bağlı gelişen oksidatif stresin düzeyini belirlemek için kullanılmaktadır (22). Glifosat maruziyetinden sonra oluşabilecek apoptozisi göstermek amacıyla Bax, P53, Caspaz-3 ve Bcl-2 gibi proapoptotik markerlar kullanılmaktadır (23).

Gallik asit (3,4,5- trihidroksi benzoik asit) (GA), polifenolik bileşikler içeren bitkilerden elde edilir. Meyvelerde, sebzelerde, yeşil çayda, kahvede ve sumakta bulunan doğal bir polifenolik bileşikler arasında yer alarak yaygın kullanım alanına sahiptir (24,25). GA, yiyecek sanayisinde katkı maddesi olarakta kullanılmaktadır (26,27).

Gallik asidin biyolojik aktivitesi, oksidatif stresin başlamasını ve dolayısıyla lipid peroksidasyonunu engellemesi yeteneğinden kaynaklanmaktadır (28). Gallik asidin antiviral, antifungal, antimikrobiyal, antikanser, antiinflamatuvar, antioksidan, antimutajenik ve antiapoptotik özellikler gibi önemli birçok farmakolojik fonksiyonlara sahip olduğu bilinmektedir (26,27). Ayrıca yapılan çalışmalarda Gallik asitin tümör anjiyogenezini baskılayarak tümör gelişiminin farklı evrelerindeki kolon kanseri ve mide kanseri benzeri kanser türlerine olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (29-31).

Planladığımız bu çalışmada Gallik asitin karaciğer toksisitesinde koruyucu etkinliğinin olup olmayacağını incelemeyi amaçladık. Bu amaçla histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemelere başvurduk. Ayrıca alınan kan örneklerinden serum Molandialdehit (MDA), Interlökin-6 (IL-6), Total Oksidan düzeyleri (TOS) ve Total Antioksidan düzeylerini (TAS) ELISA kitler kullanarak değerlendirdik. Biyokimyasal değerlendirmelerde ise ALT, AST, Direkt Bilirubin, İndirekt Bilirubin, Total Bilirubin ve Albumin düzeylerini araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer Embriyolojisi

Vucudumuzun en büyük organı olan karaciğer, duodenumun distal endodermal çıkıntısı olarak erken fetal gelişim dönemlerinde ve gebeliğin üçüncü haftasında hepatik divertikül şeklinde meydana gelmektedir (32). Hepatik divertikül perikard ile yolk salkı arasına uyan alanda bulunan septum transversum olarak isimlendirilen mezoderm plağını penetre etmektedir (33).

Safra kanallarının oluşması, hepatik divertikül ve duodenum arasındaki bağlantının daralmasıyla oluşur (34). Karaciğer kordonlarının, karaciğer parankimine dönüştükten sonrası, safra kanallarının iç yüzünü oluşturur. Hematopoetik hücreler septum transversumdan gelişen diğer yapılardır (35,36).

Septum transversuma yerleşen hepatik hücrelerden sonra, karın boşluğunda kaudale doğru organlar gelişir. Membranöz yapı olan septum transversum, omentum minus ve falciform ligamentini meydana getirir. Bu yapılar birlikte ventral mezogastriumu meydana getirir (37).

Karaciğer, yenidoğanlarda ortalama olarak 120 gram ağırlığındadır. Yetişkinlik döneminde doğumdaki ağırlığının 12 katına denk gelmektedir (36). On ikinci haftadan sonra safra yolları gelişir ve safra sentezi başlar. Sentezlenen safra duodenuma drene olur (38). Üçüncü trimesterde azalan hematopoietik aktivite, doğumla birlikte birkaç hematopoietik hücre adasıyla sınırlı kalır (38-41).

2.2. Karaciğer Histolojisi

Tunica fibrosa hepatis, karaciğerin etrafını sarar ve karaciğer içine girerek karaciğeri lobüllere ayırır devamında Glisson kapsülünü oluşturur. Karaciğer dokusu, lobüllerinin altıgen yapısından dolayı, uzunlamasına kesitlerde poligonal olarak görülür (41,42).

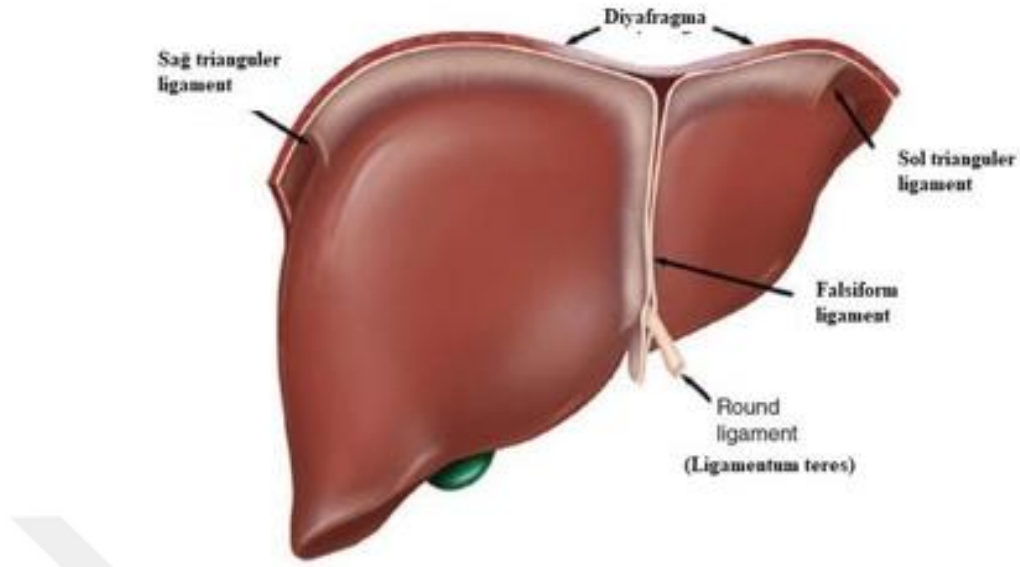
Çapı ve yüksekliği yaklaşık 2 milimetre olan her lobülün birbirleriyle temas ettiği yerde, bağ dokusundan oluşan ve Glisson üçgeni adı verilen sahalar

bulunur. Portal alan altıgen şekilli lobülün köşelerinde bulunur. Portal pentat, a. hepatica proprianın dalı, v. porta hepatisin dalı, safra kanalı, lenf ve sinirini içeren beşli yapıya denir (43). Portal alandaki sinüzoidler, hücre kordonları arasındaki mesafeyi doldurur. Buradaki sinüzoidler v. centralis ile vv. interlobulares arasındaki lobuluslar içerisinde ilerleyerek birleştirir. Kupffer ve endotel hücreleri retikuloendotelial sistemin elemanları olup sinüzoidlerin iç duvar yapısında bulunur. Disse aralığı, kollajen fibrilleri ve hücre dışı matriksi barındıran alan olup, sinüzoid endoteli ve hepatosit membranı arasındaki mesafeye denir ve genişliği yaklaşık 0,3- 0,5 µm'dur (44-47).

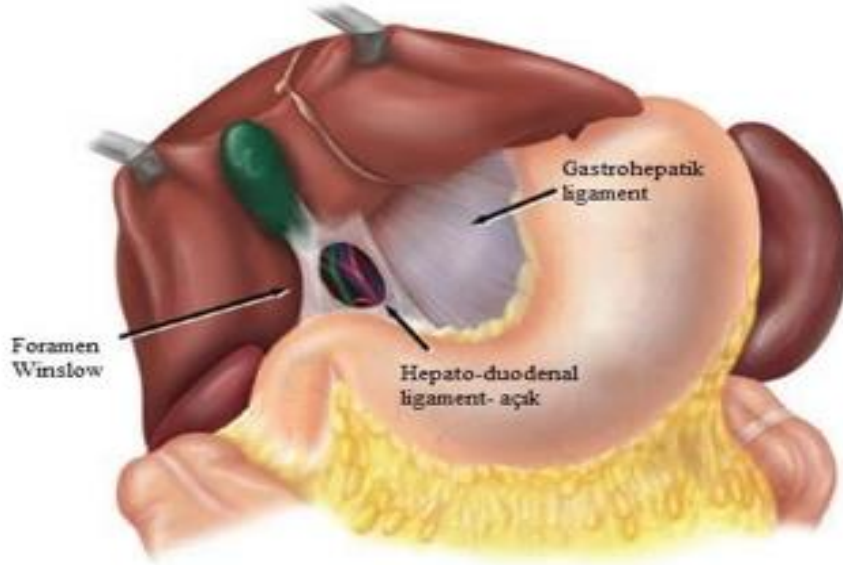
2.3. Karaciğer Anatomisi

Karaciğer, yaklaşık 1.2-1.6 kilogram ağırlığında solid bir organdır. Karaciğerin alt hizası iz düşümü sağ kostal sınıra denk gelir. Karaciğerin apikal yüzeyini diyafragma sarar. Karaciğer, posterior kısımda ise inferior vena kavanın üzerinde yer alır. Karaciğer sağ lobunun büyük bir çoğunluğuyla sol lob, göğüs kafesinin içerisinde yerleşir ve Glisson kapsülüyle çevrelenir (48,49).

Periton karaciğer yüzeyini kaplayıp, hepatik arka yüz, safra kesesi yatağı ve porta hepatisin dışındaki alanları sararak oluşturduğu katlantılarla karaciğeri asan ligamentleri oluşturur. Lateral sınırlarda yer alan sol ile sağ triangular ligamentler de koroner ligament olarak adlandırılan diyafragmatik peritoneal katlantıyla meydana gelir. Karaciğer önde diyafragmadan karın duvarı boyunca umblikusa uzanan falsiform ligamentini oluşturur. Ligamentum Rotundum umblikustan başlayıp umblikal fissüre doğru falciform ligamentinin altından seyreder. Umblikal fissür karaciğerin sol alt yüzeyine denk gelir ve sol portal pedikülü barındırır. Ligamentum venozum ise karaciğerin sol posterior yüzünde yer alıp sol portal venden inferior vena kavaya doğru uzanan bir fissür içinde bulunur. Bu ligamentler, karaciğeri karın içinde sabitlemektedir (Şekil 1 ve Şekil 2). Epipliok foramen (Foramen Winslowi) porta hepatisin sağında yer alıp omentum minusa açılan boşluktur. Foramen Winslowi'nin önemi, pringle manevrası ile karaciğerin kan akımının kontrol altına alınmasını sağlamasıdır (48,49).



Şekil 1 Karaciğeri asan ligamentler



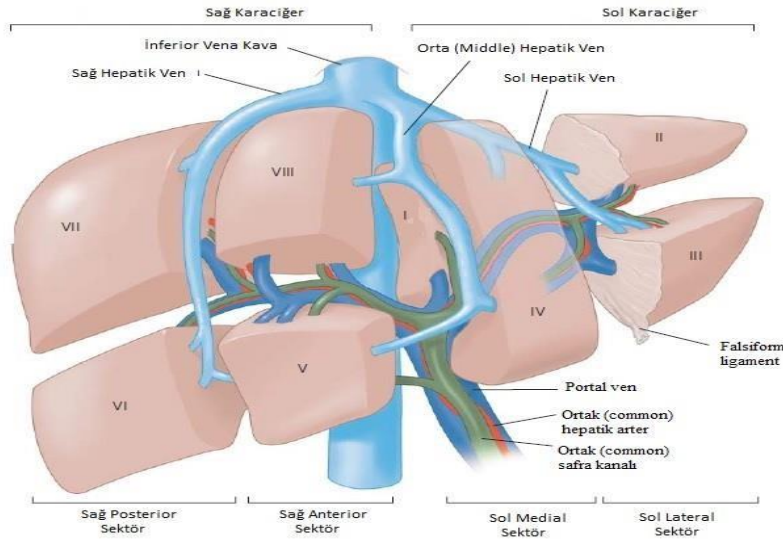
Şekil 2 Hepatogastrik ve hepatoduodenal ligamentler (49).

2000 yılında yapılan Brisbane toplantısında Uluslararası Hepatopankreatobiliyer Birliği eşliğinde evrensel terminoloji amacıyla hazırlanan öneri kabul edildi. Bu terminoloji sisteminde vasküler ve biliyer anatomiye dayalı ayrımlar yer almaktadır (50). Fonksiyonel karaciğer anatomisi portal tirad akıma göre beslenen 8 adet segmentten meydana gelmektedir.

1957'de Couinaud, Goldsmith ve Woodburne tarafından tanımlanan sol karaciğer ve sağ karaciğer terimleri, karaciğer sağ lob ve karaciğer sol lob terimleri yerine kullanılmıştır (49). Cantle çizgisi, safra kesesi yatağından ve vena kavanın soluna doğru ön ve arka olarak uzanan hayali çizgidir. Bu çizgi ile sol ve sağ karaciğer ayrımı yapılır (49).

Sağ karaciğer, segment VI ve VII (posterior sektör), segment V ve VII (anterior sektör) olarak sağ hepatic venden geçen hat ile iki ayrı sektöre bölünür (Şekil 3) (49). Umbilikal fissürün içinden sol hepatic arter, portal ven ve hepatic ductus geçer. Bu hat ile karaciğer sol lobu anterior ve posterior olarak 2 sektöre ayırır (48,49)

Kaudat lob olan segment I'in safra akımı ve vasküler beslenmesi sağ ve sol pediküllerden olur. Kaudat lobun venöz dönüşü ise direkt inferior vena kavaya olmaktadır (49).



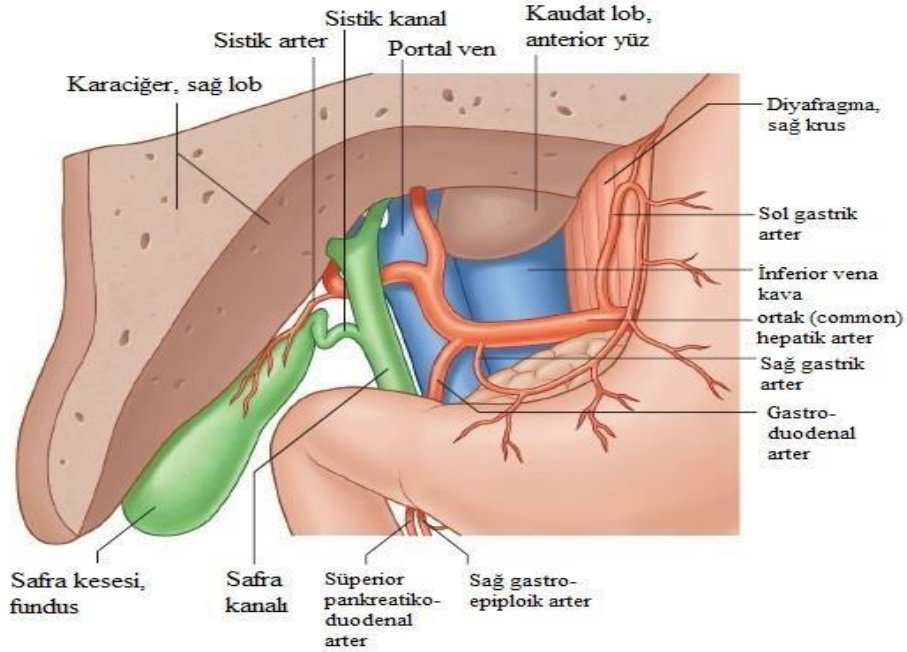
Şekil 3 Karaciğerin segmentleri (48)

Karaciğere gelen kan akımının büyük çoğunluğu vena porta (% 75), % hepatic arterden (%25) gelir (48). Hepatic arter çoğunlukla trunkus çölyakustan dallanır (Şekil 4) ve çeşitli varyasyonlar olabilmektedir. SMA'dan da köken dallanabilmektedir (51).

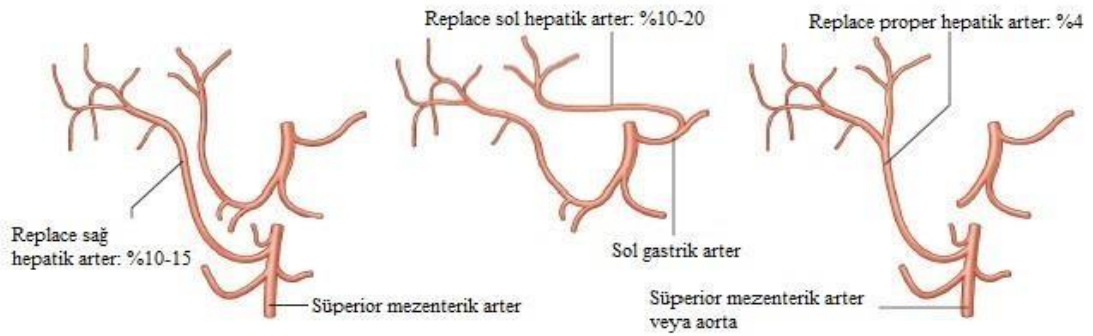
Pankreas üst sınırından ana hepatic arter ilerler ve gastroduodenal arter dalını verir. Devamında karaciğere giden distalına ise arteria hepatica propria

denir. Arteria hepatica propriadan da çoğunlukla sağ gastrik arter ayrılır (48,51). Sağ hepatic arterden de %95 oranında sistik arter çıkar ve buradan safra kesesine gelir (51).

Hepatic arteriyel anatomi %25-45 oranında varyasyon gösterir (Şekil 5 ve Tablo 1). Aksesuar hepatic arterler, klasik beslenmeye ilave olarak karaciğer bölümlerine ek arteriyel beslenme sağlamaktadır (51).



Şekil 4 Hepatic arter anatomisi (48).



Şekil 5 Hepatic arter varyasyonları (49).

Hiatt ve arkadaşları, karaciğer nakil vericilerinin oluşan 1000 olguluk çalışmalarında, karaciğer arteriyel anatomisini 6 tip olarak tanımlamışlardır (Tablo 1) (52).

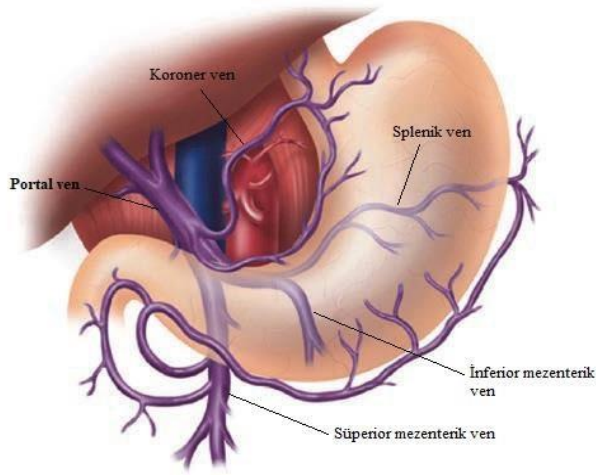
Tip	Arteriyel Anatomi	Sıklığı
1	Klasik anatomi	% 55-76
2	Aberran sol hepatik arter	% 10-20
3	Aberran sağ hepatik arter	% 10-15
4	Hem sağ hem sol aberran arterler	% 2
5	Replace ortak hepatik arter	% 1.5-4
6	Aortadan ayrılan ortak hepatik arter veya diğer	% 0.2-0.5

Tablo 1 Hepatik arter anatomi çeşitleri ve sıklığı (52,53)

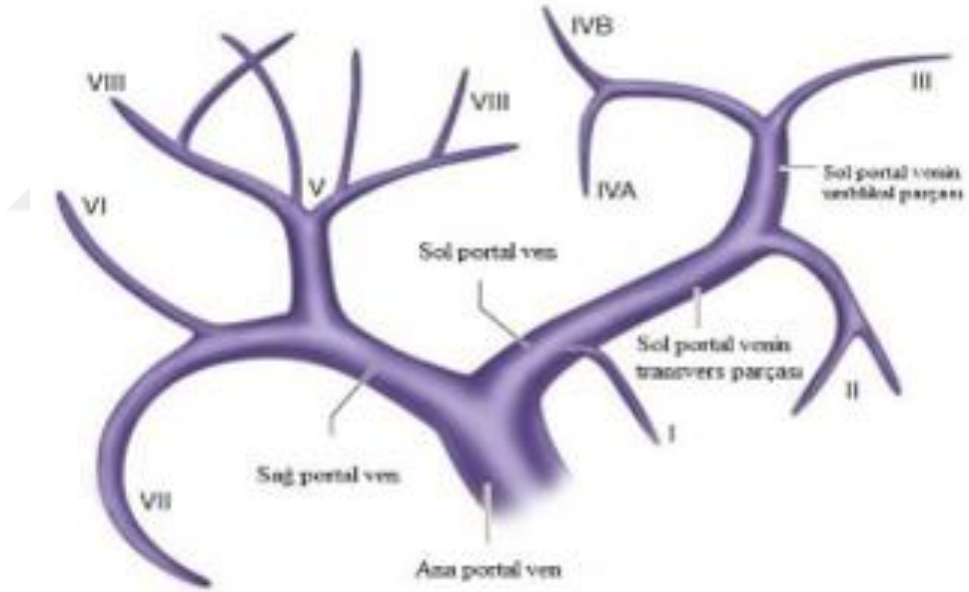
Portal ven sistem, karaciğerin oksijenizasyonun yaklaşık %50 ile %70'ini sağlamaktadır. Portal venöz sistemde valv sistemi yoktur. Bu nedenle düşük basınçta yüksek akım oluşmaktadır ve portal ven basıncı sistem boyunca herhangi bir noktada ölçülebilmektedir (49).

Sağlıklı bireylerde portal ven basıncının normal değeri 3-5 mmHg'dır. Bu basıncın artması durumunda gastrik ve özefageal varisler oluşabilmekte ve ölümcül edici kanamalara neden olabilmektedir (48).

Portal ven, SMV ile splenik venin birleşiminden oluşur. Koroner ven de portal vene ya da splenik vene bazen de ikisinin birleşim yerine de drene olabilmektedir (Şekil 6 ve 7).



Şekil 6 Portal venin anatomisi (45).

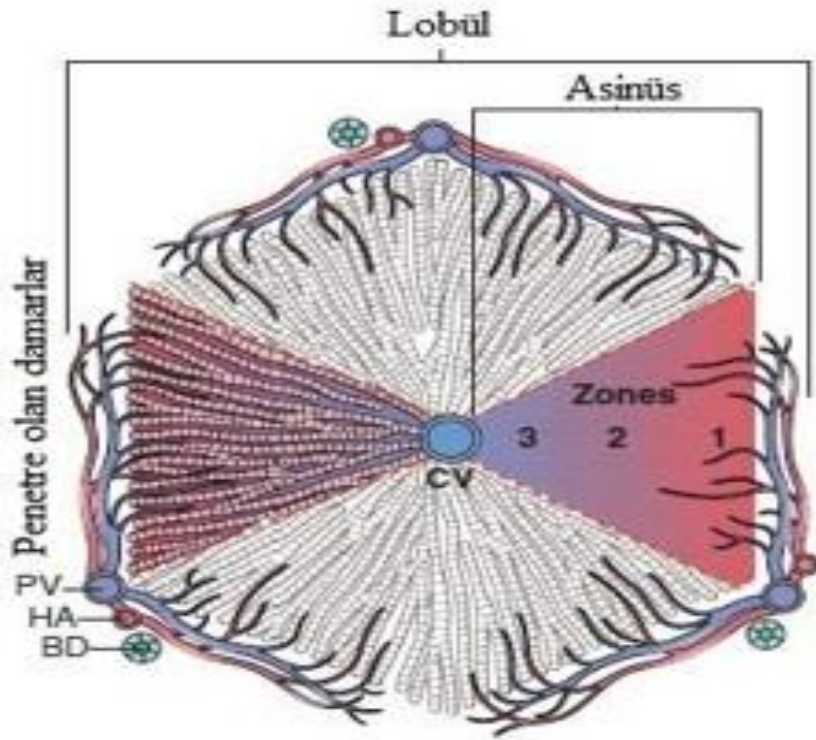


Şekil 7 Portal venin dallanması (45).

Karaciğer, sağ, sol ve orta hepatik venler olmak üzere üç ana venden oluşur. Bu venler, oblik seyrederek suprahepatik olarak inferior vena kavaya dökülür. Karaciğer inferiorunda da tıpkı kaudat lob gibi direkt inferior vena kavaya drene olan hepatik venler yer alır (48). Karaciğerin lenfatik drenajının

%80'lik büyük kısmı portal olmak üzere, yüzeysel ve sublobar lenfatikler aracılığıyla olmaktadır (51).

Genel olarak karaciğerin mikroanatomik tarifi lobüler model üzerinden yapılmaktadır (Şekil 8). Karaciğer lobülleri yaklaşık 1-2 mm genişliğinde, hegzagonal yapıda olup çevresi portal triad ile sınırlı, medilalinde de hepatik venin uç dalı yer alır (52,54)



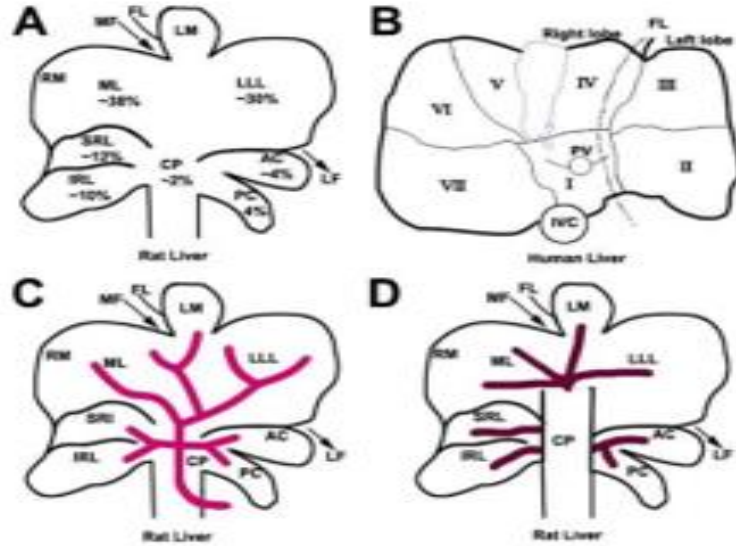
Şekil 8 Hepatik zonlar ve mikroanatomi (54).

Karaciğer enzimlerinin serum düzeyi karaciğerin hasar durumunu, fonksiyonu ve sentez durumunu hakkında bilgi verebilir (Tablo 2). Karaciğer fonksiyon testleri hepatosellüler hasar hakkında fikir verir. Sentez fonksiyonu gösteren ise albümin ve protrombin zamanıdır (48).

Karaciğer hastalıklarında laboratuvar değerlendirme	
Test Kategorisi	Kan Ölçümü
Hepatosit bütünlüğü	Sitozolik hepatoselüler enzimler Serum aspartat aminotransferaz (AST) Serum alanin aminotransferaz (ALT) Serum laktat dehidrojenaz (LDH)
Biliyer salgı fonksiyonu	Safrada normalde salgılanan maddeler Serum bilirubin Total: konjuge ve unkonjuge Direkt: sadece konjuge İdrar bilirubini Serum safra asitleri Plazma membran enzimleri (safra kanalikül hasarında) Serum alkalın fosfataz (ALP) Serum gama-glutamıl transpeptidaz (GGT)
Hepatosit fonksiyonu	Kana salgılanan proteinler Serum albümin Protrombin zamanı (PT) Parsiyel tromboplastin zamanı (PTT) Hepatosit metabolizması Serum amonyak Aminopirin solunum testi (hepatik demetilasyon)

Tablo 2 Karaciğer hastalıklarında laboratuvar parametreleri (52).

Sıçan karaciğerleri multilobüle olup ve dört ana lobdan meydana gelir. Sıçan karaciğerleri de portal akıma göre isimlendirilir (Şekil 9) ve çeşitli vasküler varyasyonlar içermektedir. Ancak sıçanlarda safra kesesi yoktur (55).



Şekil 9 Sıçanlarda karaciğer anatomisi (55).

3. MATERYAL ve METOD

Etik Kurul Onamının Alınması

Etik kurul onamı, Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'nın (DÜHADEK) 28/04/2022 tarihli toplantısında kararlaştırılan 2022/10 protokol numarası onaylanmıştır.

Çalışmanın deneysel bölümü Dicle Üniversitesi Sabahattin Payzın Araştırma Merkezi'nden (DÜSAM) temin edilen sıçanlar üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Proje Desteği

Dicle Üniversitesi Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nce (DÜBAP) (TIP.22.026) desteklenmiştir.

3.1.Glifosat Dozunun Belirlenmesi ve Temini

Çalışmada kullanılacak olan Glifosat (CAS numarası 1071-83-6, saflık> %99.5) Sigma-Aldrich'ten satın alınmıştır. Glifosat grubuna 50 mg/kg/gün dozdan 15 gün boyunca distile su içerisinde i.p. olarak verilmiştir (56). Deneyde kullanılan Glifosat dozu Dünya Sağlık Örgütü'ne göre (50 mg/kg) LD₅₀ 'nin 1/5'ine den gelmektedir (57).

3.2.Gallik Asit Dozunun Belirlenmesi ve Temini

Çalışmada kullanılacak olan Gallik asit (CAS Number: 149-91-7) Sigma-Aldrich'ten satın alındı. Gallik asit 15 gün süreyle 100 mg/kg/gün dozda gavaj yardımıyla peroral (p.o.) olarak verildi (58,59).

3.3.Deney Gruplarının Belirlenmesi

Her grupta 7 rat olan, toplam 28 rattan oluşan 4 farklı grup oluşturuldu. Çalışmamızda DÜSAM' dan temin edilen ve 320-400 gram ağırlığında 8-10 haftalık 28 tane Wistar Albino cinsi ve cinsiyeti erkek olan sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar 22±2 °C'de, %60 nemli ortamda 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlıkta normal beslenme ile kısıtlama yapılmaksızın beslendi.

Suları, cam biberonlarda çelik kaplarda çeşme suyu olarak, yemler ise çelik kapta verildi. Gruplar; kontrol grubu, Gallik asit grubu, Glifosat grubu ve Gallik asit+Glifosat grubu olarak dört gruba ayrıldı.

Grup I (n=7): Kontrol grubu olup, 15 gün boyunca herhangi bir işlem uygulanmadı.

Grup II (n=7): Glifosat grubu olup, 15 gün, günde bir kez 50 mg/kg'dan intraperitoneal (i.p.) Glifosat distile suda çözünerek günlük taze hazırlanarak verildi.

Grup III (n=7): Gallik asit grubu olup, 15 gün, günde bir kez 100 mg/kg'dan gavajla oral (p.o.) olarak Gallik asit distile suda çözünerek günlük taze hazırlanarak verildi.

Grup IV (n=7): Glifosat + Gallik asit grubu olup, 15 gün, günde bir kez eş zamanlı olarak, Glifosat 50 mg/kg'dan i.p. ve Gallik asit ise 100 mg/kg'dan gavajla p.o. verildi.

Deney bitiminde 10 mg/kg dozunda Xylazine ve 90 mg/kg dozunda Ketamin ve i.p. yapılarak genel anestezi altında, kalpten kan alınıp ekzanguinasyon ile ratlar sakrifiye edildi. Kan örnekleri serum kısımlarına ayrıldıktan sonra EDTA'lı tüplere konularak, 10 dakika 3000 rpm hızda santrifüj edildi. Serum kısımları iki ayrı ependorf tüpüne konuldu. Tüplerden birinden ELISA kitler çalıştırılarak Malondialdehit (MDA), Interlökin- 6 (IL-6), Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAS) ve Toplam Oksidan Kapasitesi (TOS) seviyelerine bakıldı. İkinci ependorf tüpünden ise İndirek Bilurubin (İ. Bilurubin), Direk Bilurubin (D. Bilurubin), Total Bilurubin (T. Bilurubin) Aspartat aminotransferaz, Alanin aminotransferaz ve Albumin düzeylerine bakıldı. Biyokimyasal incelemelerin tamamı Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde bulunan Merkez Biyokimya Laboratuvarında çalışıldı. Çıkarılan karaciğer dokuları ise immünohistokimyasal ve histopatolojik değerlendirme incelemeler için formaldehit (%10 tamponlanmış) içerisinde Histoloji/Embriyoloji laboratuvarına gönderildi.

3.4.Histopatolojik incelemeler

Deney bitiminde alınan karaciğer dokuları %10'luk Formaldehit içerisinde fikse edildi, 12 saat çeşme suyunda yıkandı. Sonrasında dokular

dehidrasyon için artan alkol serilerinden geçirilip parafin bloklara konuldu. Elde edilen parafin bloklardan rotary mikrotomla 5 mikronluk kesitler alındı ve doku histopatolojisini incelemek amacıyla Hematoksilen & Eozin boyası ile dokularda oluşan bazal membran kalınlıkları ve suda çözünmeyen polisakkaritleri belirlemek için PAS boyama protokolleri uygulandı. Histopatolojik incelemeler Işık mikroskobu altında yapıldı. Histopatolojik takip aşamaları Tablo-3'te açıklandı (Tablo-3).

İşlem sırası	Uygulanan işlem	Uygulanan süre
1	%70 'lik Alkol	120 dk
2	%80 'lik Alkol	90 dk
3	%96 'lık Alkol I	30 dk
4	%96 'lık Alkol II	30 dk
5	%100 'lük Alkol I	30 dk
6	%100 'lük Alkol II	30 dk
7	Xylene I	25 dk
8	Xylene II	25 dk
9	Yumuşak parafin+ Xylene	45 dk
10	Yumuşak parafin	60 dk
11	Yumuşak parafin + Sert parafin	90 dk
12	Sert Parafin	180 dk
13	Bloklara Gömme	-

Tablo 3 Histolojik takibinin aşamaları

Rutin histolojik takiplerin ardından alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler, pozitif şarjlı lamlara konularak boyama öncesi 1 saat 58°C’deki etüvde parafin depolimerizasyonu oluşturuldu. Oluşan karaciğer dokusu hasar skorlaması için Camargo ve arkadaşlarının tanımladığı skala kullanıldı (60).

3.4.1.Hematoksilen&Eozin Boyama Protokolü

Kesitler 5 µm kalınlığında olup H&E ile boyandı. Bu boyama işlemi Tablo-4’te detaylı olarak sıralandı.

İşlem sırası	Uygulanan işlem	Uygulanan süre
1	Xylene I	30 dk
2	Xylene II	30 dk
3	%100’lük Alkol I	5 dk
4	%100’lük Alkol II	5 dk
5	%96’lık Alkol	5 dk
6	%90’lık Alkol	5 dk
7	%80’lik Alkol	5 dk
8	%70’lik Alkol	5 dk
9	Distile su	7 dk
10	Harris Hematoksilen solüsyonu	6 dk
11	Çeşme suyu	5 dk
12	%1 alkolik Eozin	3 dk

13	%70'lik Alkol	1 dk
14	%80'lik Alkol	1 dk
15	%90'luk Alkol	1 dk
16	%96'luk Alkol	1 dk
17	%100'luk Alkol I	1 dk
18	%100'luk Alkol II	1 dk
19	Xylene I	30 dk
20	Xylene II	30 dk
21	Entellan ile kapatma	-

Tablo 4 Hematoksilen & Eozin boyama işleminin aşamaları

3.4.2.Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Protokolü

Kalınlığı 5 µm olan kesitler Periyodik Asit Schiff (Bio Optica) kit prosedürü takip edilerek boyandı. Boyama işlemi Tablo-5'te detaylı olarak sıralandı.

İşlem sırası	Uygulanan işlem	Uygulanan süre
1	Xylene I	30 dk
2	Xylene II	30 dk
3	%100'luk Alkol I	5 dk
4	%100'luk Alkol II	5 dk
5	%96'luk Alkol	5 dk
6	%90'luk Alkol	5 dk

7	%80'lik Alkol	5 dk
8	%70'lik Alkol	5 dk
9	Distile su	7 dk
10	A solüsyonu	10 dk
11	Distile su	-
12	B solüsyonu	20 dk
13	Distile su	-
14	C solüsyonu	2 dk
15	D solüsyonu	2 dk
16	Distile su	-
17	E solüsyonu	3 dk
18	Çeşme suyu	5 dk
19	%70'lik Alkol	1 dk
20	%80'lik Alkol	1 dk
21	%90'lık Alkol	1 dk
22	%96'lık Alkol	1 dk
23	%100'lük Alkol I	1 dk
24	%100'lük Alkol II	1 dk
25	Xylene I	30 dk

26	Xylene II	30 dk
27	Entellan ile kapatma	-

Tablo 5 Periyodik Asit Schiff boyama işleminin aşamaları.

3.5.İmmunohistokimyasal incelemeler

Deney bitiminde alınan karaciğer dokuları Formaldehit (%10'luk) içinde fikse edildi. Daha sonra 12 saat çeşme suyunda yıkandıktan sonra artan alkol serilerinden geçirilip parafin bloklara konuldu. Bloklardan rotary mikrotomla 5 mikronluk (μm) kesitler alındıktan sonra, immunohistokimyasal değişiklikleri incelemek amacıyla inflamasyon belirteci olan IL-6 ve apoptozis göstergesi olan Bcl-2 primer antikoları ile boyandı. Rutin histolojik doku takibi sonrasında Xylene'de 2x30 dakika boyunca deparafinize edildi. Ardından azalan alkol serilerinin her birinde 5 dakika bekletilip distile suya kadar getirildi. Daha sonra kesitler, antijen retrieval işlemi için EDTA solüsyonuna alındı. Ardından mikrodalga fırında 3x6 dakika boyunca ısıtıldı. Devamında mikrodalga fırından çıkarılan kesitler 15 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Yıkama işlemi, Tamponlanmış fosfat salin (PBS) çözeltisi içerisinde 3x5 dakika gerçekleştirildi. Daha sonra hidrofobik kalemle kesitlerdeki dokular çizilip bara dizildi. Metanol ile hazırlanmış hidrojen peroksit (%3'lük) kesitlerin üzerine damlatılarak 20 dakika boyunca endojen peroksit blokajı gerçekleştirildi ve tekrar PBS'de 3x5 dakika yıkandı. Bu kesitlere Ultra V Block solüsyonunda (Thermo) damlatılarak 7 dakika boyunca inkübe edildi. Devamında Blocking solüsyonu kesitlerden uzaklaştırıldı. 1/250 oranında dilüe (Antibody diluent) edilen örnekler yıkama işleminden geçirilmedi. Primer antikor IL-6 ve Bcl-2 (Santa Cruz) ile +4 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Sonraki gün kesitler oda sıcaklığında (28 °C) bir saat ek inkübasyona bırakıldı. Ardından kesitler PBS ile 3x5 dakika yıkandı. Anti rabbit sekonder antikorla kesitler (Thermo) 30 dakika boyunca inkübe edildi. Sekonder antikordan alınan kesitler PBS ile 3x5 dakika boyunca yıkandı. Kesitler streptavidin peroksidaz (Thermo) yardımıyla oda ısısında 30 dakika süreyle enzimi bağlamak için inkübasyona bırakıldı. Streptavidin peroksidaz inkübasyonu yapıldı. Ardından PBS ile 3x5 dakika boyunca yıkandı. Daha sonra kesitler 3,3'diaminobenzidine (DAB)

kromojen (Thermo) ile reaksiyona bırakıldı. Reaksiyonun ve spesifik tutunumun gözleendiği mikroskopik incelemede kesitler PBS'e alınarak reaksiyon işlemleri sonlandırıldı. Son olarak 40 saniye boyunca Gill Hematoksilen ile zıt boyama işlemleri yapıldı. Çeşme suyunda yıkama işlemleri 5 dakika yapıldıktan sonra artan alkol serilerinden geçirildi. Xylene'de 2x30 dakika bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı.

3.6.Biyokimyasal Analizler

3.6.1.Total Antioksidan Kapasitesi (TAS)

Çalışmamızda bütün gruplardaki ratlardan alınan kan (venöz) örnekleri EDTA'lı tüplere konuldu. 3000/dk devirde 10 dakika süresince +4°C'de santrifüj yapıldı. Çalışma zamanına kadar plazma örnekleri -80°C'de bekletildi. Kitler ve serum örnekleri oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi. TAS µmol/L düzeyi Rel Assay Diagnostic Türkiye kitiyle inceleme yapıldı. TAS'ın ölçü birimi µmol/L (mikromolar/litre) olarak belirlendi ve okuma cihazı (Beckman Coulter marka AU5800 model) kullanıldı. Tam otomatik metod olan ve geliştirilmesi Erel tarafından yapılan metod kullanıldı (61).

3.6.2.Total Oksidan Kapasitesi (TOS)

Çalışmamızda bütün gruplardaki ratlardan alınan kan (venöz) örnekleri EDTA'lı tüplere konuldu. 3000/dk devirde 10 dakika boyunca +4°C'de santrifüj yapıldı. Çalışma zamanına kadar plazma örnekleri -80°C'de bekletildi. Kitler ve serum örnekleri oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi. TOS miktarları Rel Assay Diagnostic Türkiye kitiyle incelendi. TOS'un ölçü birimi mmol/L (milimolar/litre) olarak belirlendi ve okuma cihazı (Beckman Coulter marka AU5800 model) kullanıldı. Tam otomatik metod olan ve geliştirilmesi Erel tarafından yapılan metod kullanıldı (62).

3.6.3.Kan Serum Malondialdehit (MDA) ve Interlökin-6 (Il-6) Değerlerinin Ölçülmesi

Çalışmada ratlardan alınan kan örnekleri MDA ve Il-6 analizleri için biyokimya tüpüne konuldu. Alınan kanlar oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra, 5 dakika 5000 x g/devirde santrifüj edilip plazmaları

ayrıştırıldı. Rat serum örnekleri -80 °C derecede, çalışma gününe kadar saklandı. MDA düzeyi ölçümleri için Bostonchem marka (Cat: BLS-8612Ra), II-6 ölçümleri için ise yine Bostonchem marka (Cat: BLS-1158Ra) test kitleri kullanıldı. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) yöntemiyle ölçümleri yapılarak sonuçlar $\mu\text{mol/l}$ olarak ifade edildi.

3.7.Serum biyokimyasal değerlerin ölçülmesi Testleri

Serum Albümin (BioSystems,) Direkt bilirubin (BioSystems), Total bilirubin (BioSystems), İndirek bilirubin (BioSystems), AST (BioSystems, Aspartate Aminotransferase) ve ALT (BioSystems, Alanine Aminotransferase) değerleri spektrofotometre ile ölçüldü.

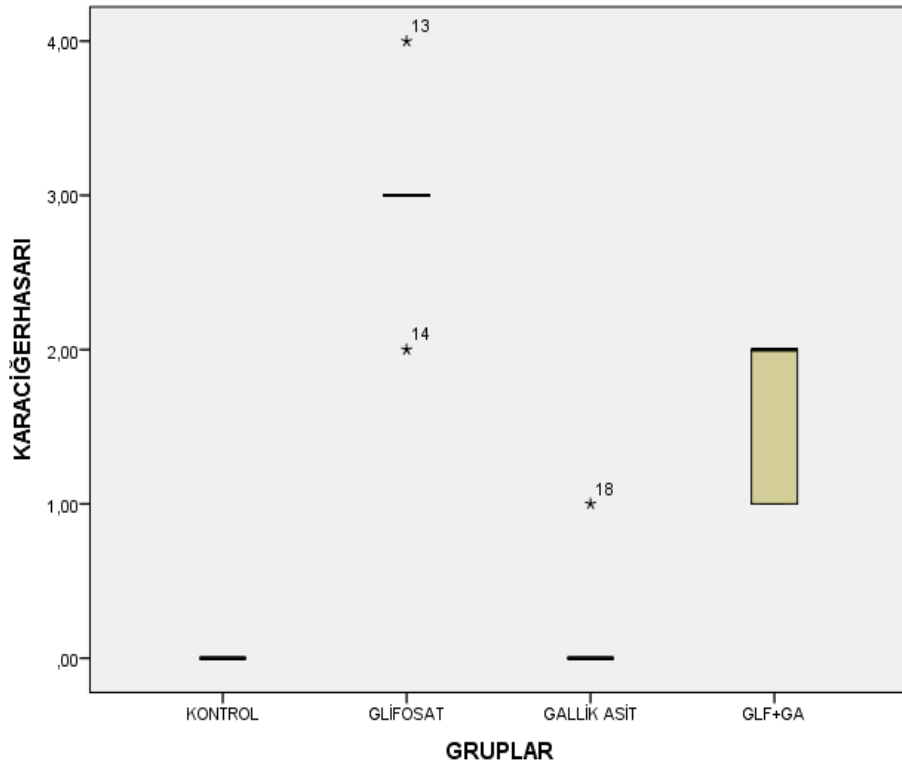
3.8.İstatistiksel Analiz

İstatistiğimizi SPSS for Windows version 20 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) programını kullanarak yaptık. Verilerimizi Shapiro Wilk testiyle değerlendirdik. Sonuca göre kriter olarak basıklık (kurtosis) ve çarpıklık (skewness) sonuçlarının -1,5 ve +1,5 arasında olması ve Shapiro-Wilk testinin $p>0,05$ olması normal dağılım olarak kabul ettik. Dağılımı normal olmayan verilere ise Kruskal Wallis-H testi uyguladık. Anlamlı sonuçlanan değişkenler arasındaki farklılıkların tespiti amacıyla Mann Whitney-U testini kullanıldı. Çıkan değerlerin $p<0.05$ olması anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1.Histopatolojik incelemeler

Işık mikroskobu altında tüm gruptaki sıçanlardan alınan karaciğer dokuları incelendiğinde oluşan hasarın skorlanması sonucu Kruskal Wallis- H testi istatistiksel olarak anlamlı değerlendirildi.



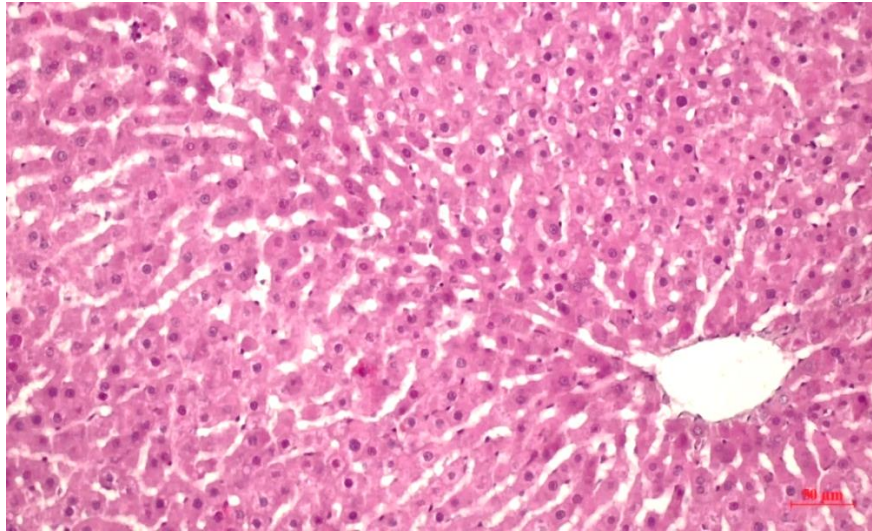
Şekil 10 Karaciğer dokularında oluşan hasarın istatistiksel analizi sonucu oluşan ortalamaların grafiği.

Gruplar arası karşılaştırmada ise Mann Whitney- U testi kullanıldı. Bu testin sonuçlarına göre (Şekil 10); en yüksek hasar skorlaması GLP grubunda oluşurken, GLP+GA grubu arasında ise anlamlı bir iyileşme olduğu izlendi ($p < 0.05$). Kontrol grubuyla GA grubu karşılaştırıldığında ise oluşan hasar skorlaması arasında anlamlı fark görülmedi (Tablo-6, $p > 0.05$).

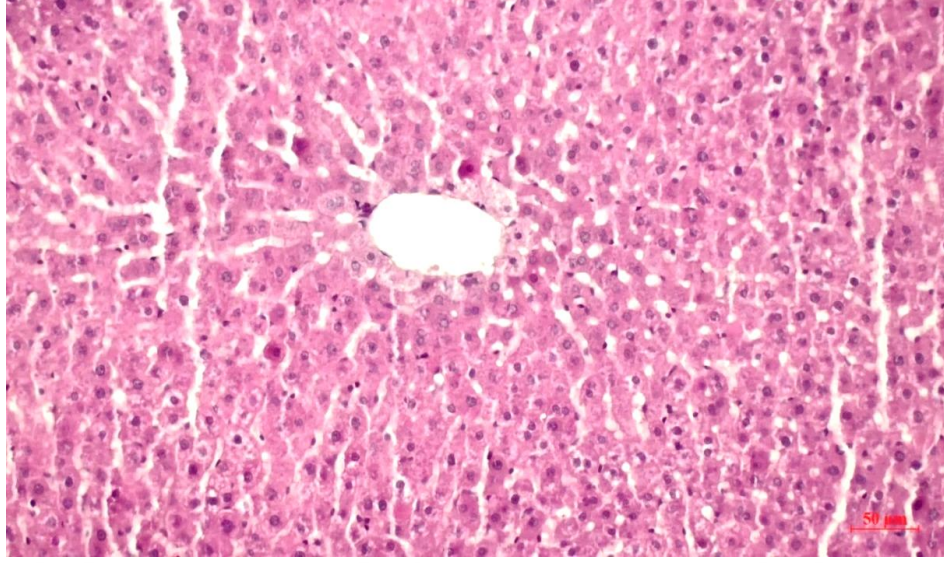
Gruplar	Karaciğer Dokusu Hasarı
Kontrol	0.00±0.00
GLP	3.00±0.57
GA	0.14±0.37
GLP+GA	1.57±0.53

Tablo 6 Gruplar arası karaciğer hasarı ortalaması alınan grupların Ortalama±Standart sapmaları.

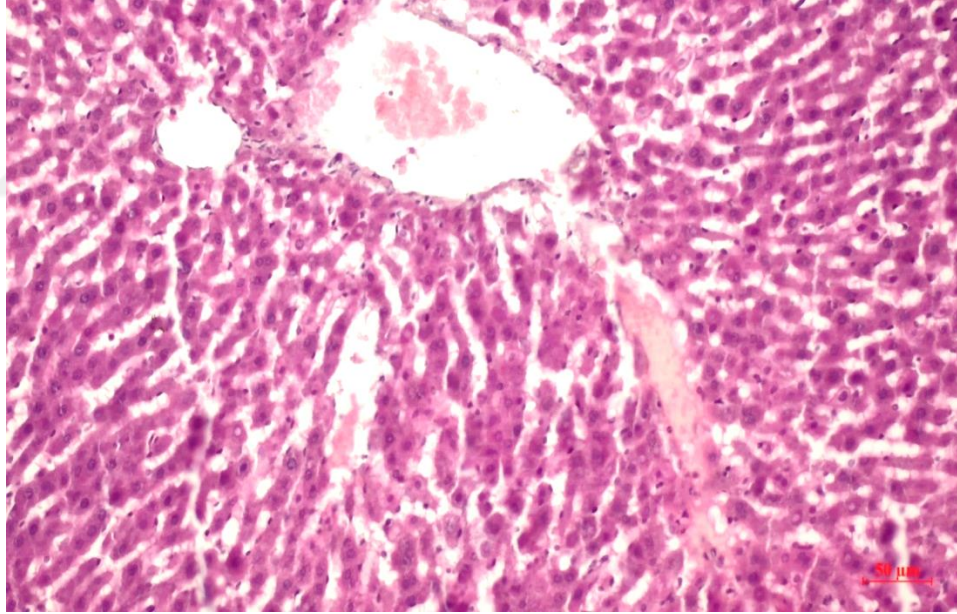
Dokuların ışık mikroskobu altındaki incelemelerinde ise H&E boyaması sonucu kontrol grubu ve GA grubunun karaciğer dokuları normal görünümde izlendi (Şekil 11, 12). GLP grubunun karaciğer dokularında ise hemoraji, sinüzidal dizilimin bozulması ve karaciğer dokusunun bütünlüğünde dejenerasyonların meydana geldiği görüldü (Şekil 13). GLP+GA grubuna bakıldığında ise meydana gelen bozulmaların düzeldiği fakat tamamen sağlıklı görünüme kavuşmadığı izlendi (Şekil 14). GLP ile eş zamanlı GA uygulanması karaciğer dokusunda oluşan histopatolojik değişikliklere olumlu etki etmiş.



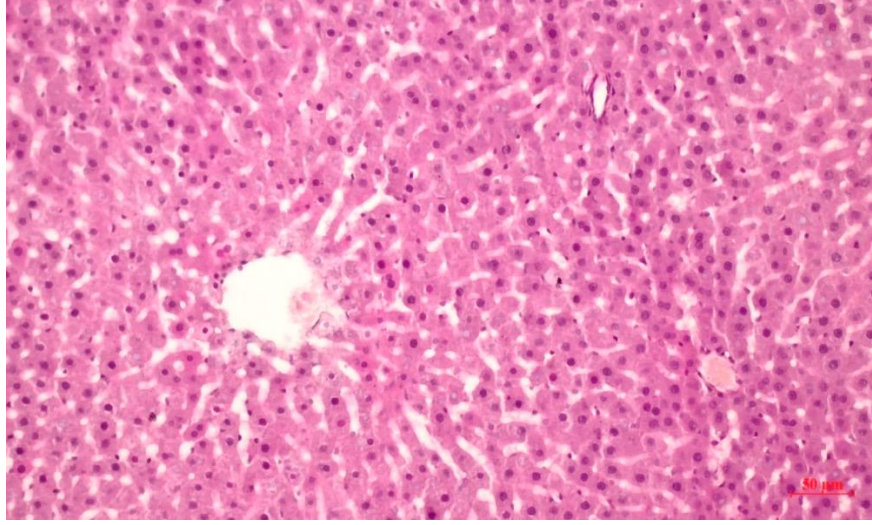
Şekil 11 Kontrol grubunda karaciğer dokusunun ışık mikroskobu altındaki görüntüsü (H&E, Bar 50 µm).



Şekil 12 GA grubunda karaciğer dokusunun ışık mikroskobu altındaki görüntüsü (H&E, Bar 50 µm).

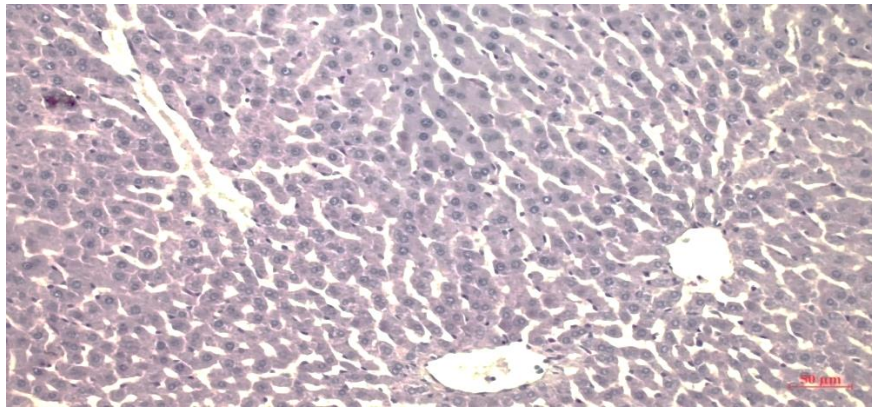


Şekil 13 GLP grubunda karaciğer dokusunun ışık mikroskobu altındaki görüntüsü. Hepatositlerde dejenerasyon, vena sentraliste dejenerasyon, hemoraji, ışınsal dizilimin bozulması ve konjesyon oluşması (H&E, Bar 50 µm).

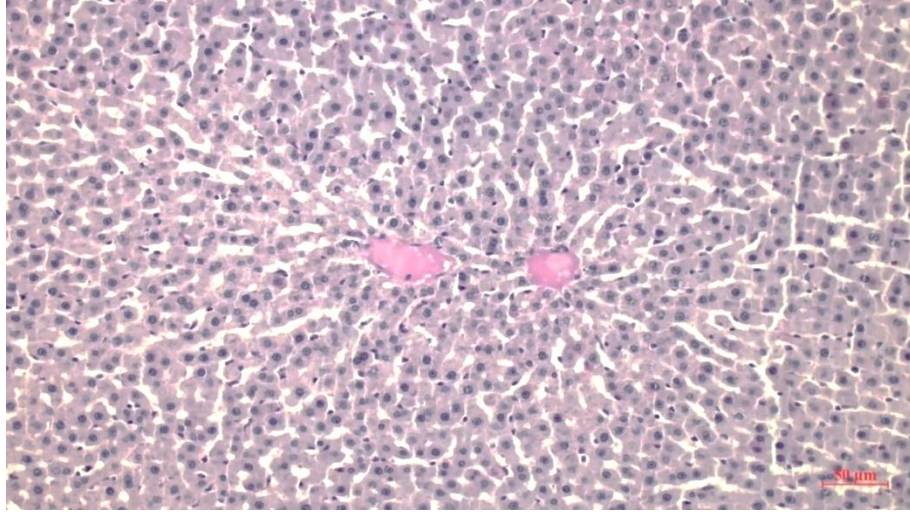


Şekil 14 GLP+GA grubunda karaciğer dokusunun ışık mikroskobu altındaki görüntüsü. Konjesyonda azalma, daha düzgün ışınsal dizilim ve belirgin hepatosit hücreleri (H&E, Bar 50 µm).

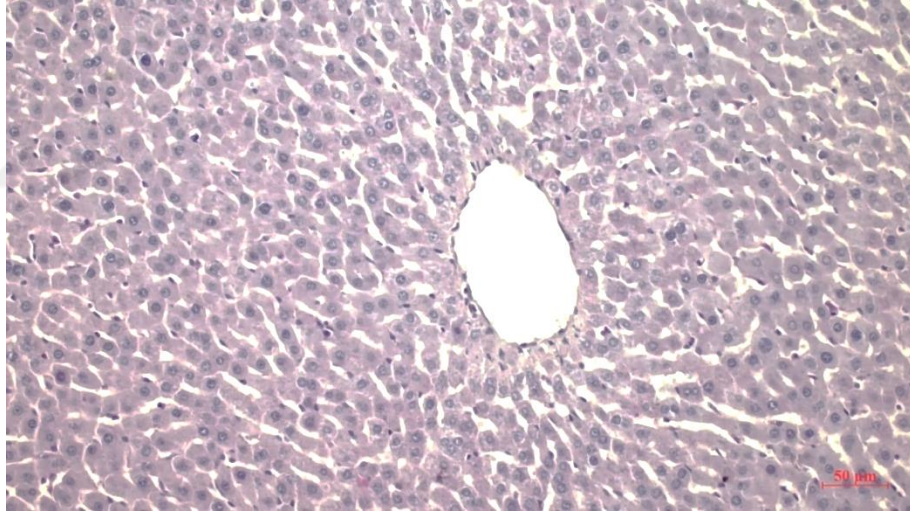
Karaciğer dokularının yine ışık mikroskobik incelemelerinde PAS boyanması sonucu glikojen yoğunlukları karşılaştırıldığında GLP grubunun hepatositlerinde bu yoğunluğun belirgin şekilde azaldığı (Şekil 15), fakat GLP+GA grubunda ise arttığı izlendi (Şekil 16). GLP ile GA verilmesi karaciğer dokularında oluşan hasarın histopatolojik olarak azalmasına sebep olduğu görüldü. Kontrol grubuyla GA grubunun hepatositlerindeki glikojen yoğunluğu ise normal görünümde izlendi (Şekil 17,18).



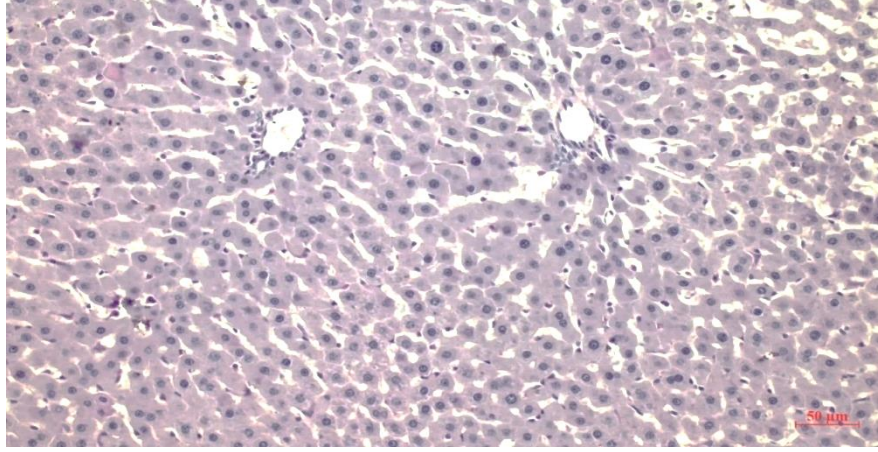
Şekil 15 GLP grubunda karaciğer dokusunun ışık mikroskobu altındaki görüntüsü. Hepatositlerde PAS pozitif (+) reaksiyonunda azalma (PAS, Bar: 50 µm)



Şekil 16 GLP+GA grubunda karaciğer dokusunun ışık mikroskobu altındaki görüntüsü. GLP grubuna kıyasla daha fazla PAS pozitif (+) reaksiyonlar (Bar: 50 µm, PAS)



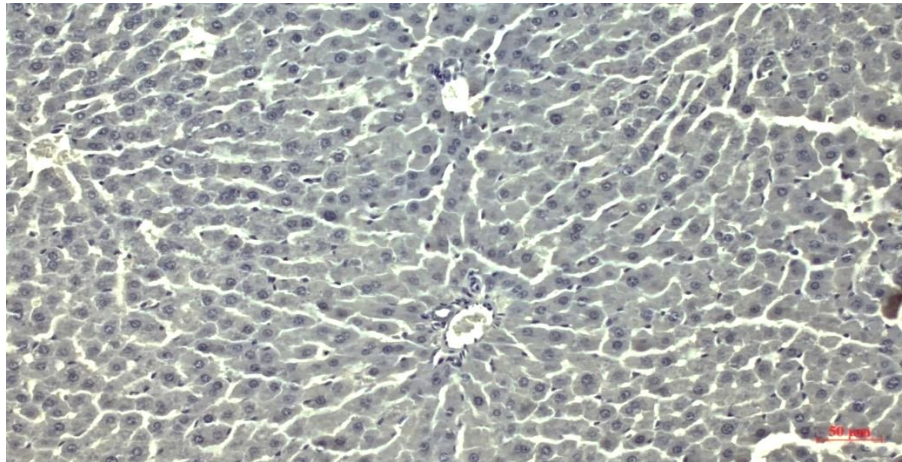
Şekil 17 Kontrol grubunda karaciğer dokusunun ışık mikroskobu altındaki görüntüsü. Hepatosit hücrelerinde PAS pozitif (+) (Bar: 50 µm, PAS)



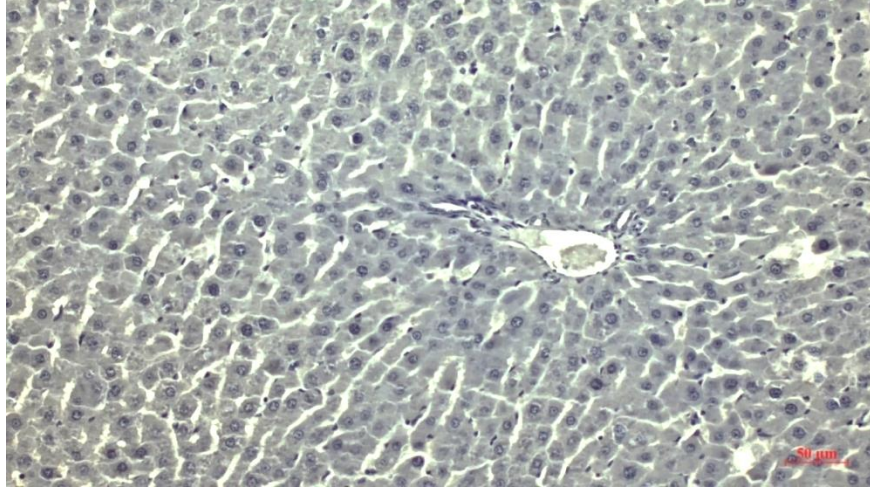
Şekil 18 GA grubunda karaciğer dokusunun ışık mikroskobu altındaki görüntüsü. Hepatosit hücrelerinde PAS pozitif (+) (Bar: 50 µm, PAS)

4.2. İmmunohistokimyasal incelemeler

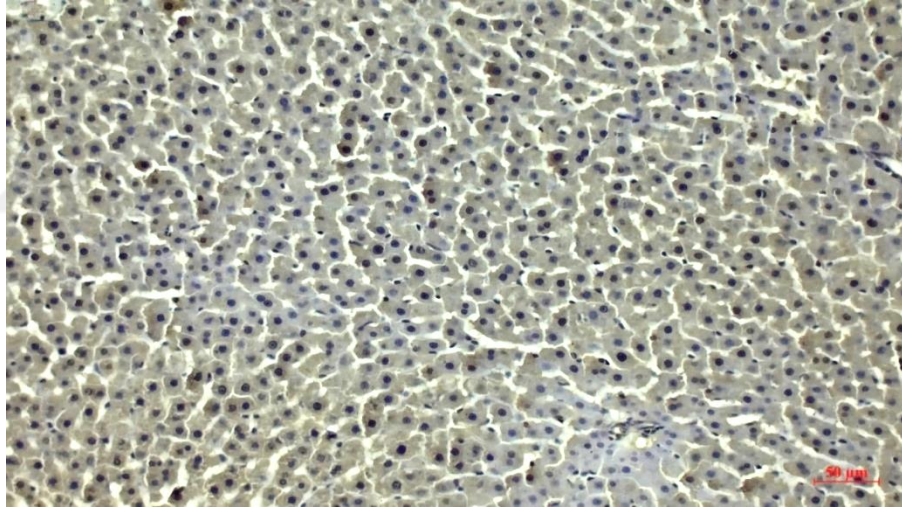
İşık mikroskobu altında karaciğer dokuları incelendiğinde; proapoptotik protein olan Bcl-2 reaksiyonlarının kontrol grubunda (Şekil 19) oldukça hafif düzeyde ekspresyon verdiği izlenirken, benzer bulgular GA grubunda (Şekil 20) da görüldü. GLP grubunda (Şekil 21) ise Bcl-2 ekspresyonları diğer gruplara kıyasla daha yoğun izlendi. GLP+GA grubunu (Şekil 22) incelediğimizde ise GLP grubuna kıyasla daha hafif düzeyde Bcl-2 pozitif ekspresyonların olduğu, GLP+GA grubunda GA'ya bağlı pozitif düzeyde azaldığı izlendi.



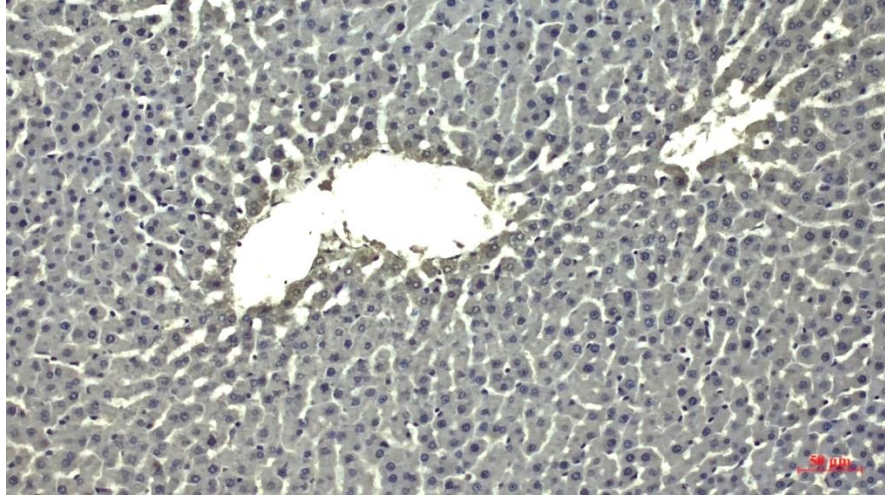
Şekil 19 Kontrol grubundaki karaciğer dokularında oldukça hafif düzeyde Bcl-2 pozitif ekspresyonlar. Bcl-2 immunohistokimya boyama. Hematoksilen zıt boyama işlemi. (Bar: 50 µm.)



Şekil 20 GA grubuna ait karaciğer dokularında oldukça hafif düzeyde Bcl-2 pozitif ekspresyonlar. Bcl-2 immunohistokimya boyama. Hematoksilen zıt boyama işlemi. (Bar: 50 µm.)

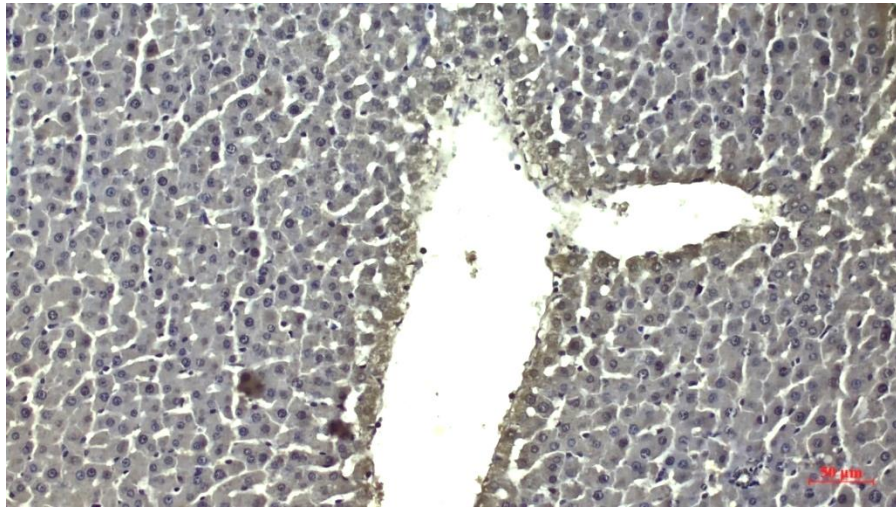


Şekil 21 GLP grubuna ait karaciğer dokularında Bcl-2 pozitif ekspresyonlar. Bcl-2 immunohistokimya boyama. Hematoksilen zıt boyama. (Bar: 50 µm.)

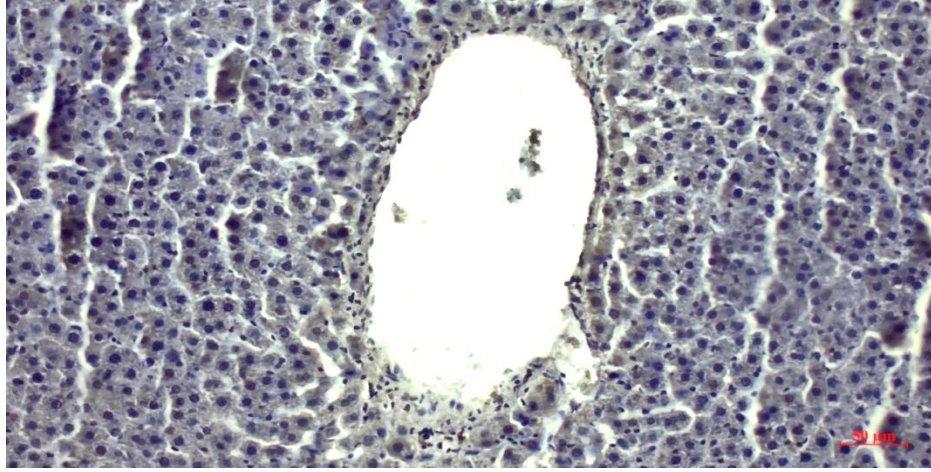


Şekil 22 GLP+GA grubuna ait karaciğer dokularında GLP grubuna kıyasla belirgin düzeyde daha hafif Bcl-2 pozitif ekspresyonlar. Bcl-2 immunohistokimya boyama. Hematoksilen zıt boyama. (Bar: 50 µm.)

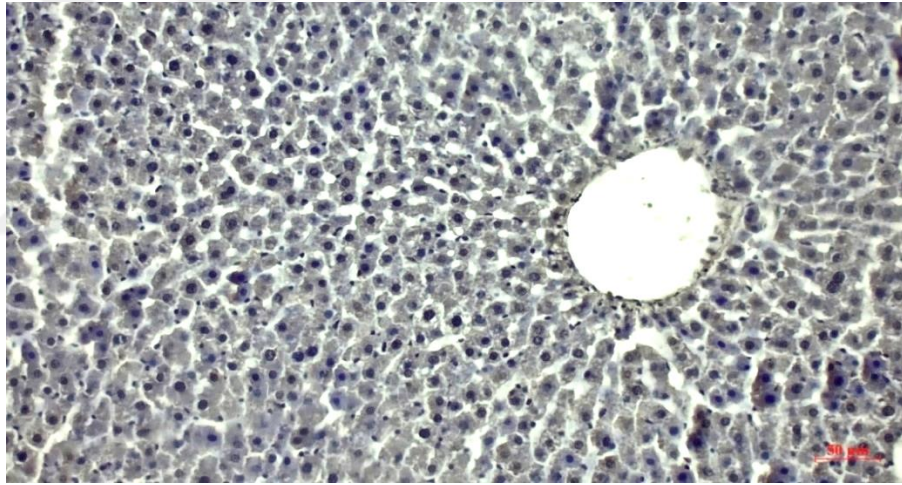
Il-6 immünreaktivite ekspresyonlarına bakıldığında ise; hepatosit sitoplazmalarında ve vena centralisin etrafında GLP grubunun yoğun ekspresyon gösterdiği görüldü (Şekil 23). GLP+GA grubunda ise ekspresyonlar daha az görüldü (Şekil 24). Kontrol grubu (Şekil 25) ile GA (Şekil 26) grubunda ise ekspresyon yoğunlukları benzer şekilde hafif düzeyde izlendi.



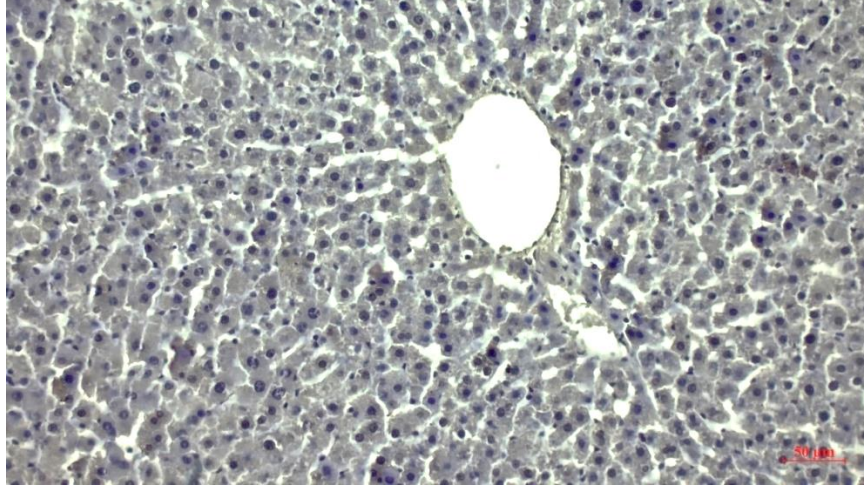
Şekil 23 GLP grubuna ait karaciğer dokularında Il-6 pozitif ekspresyonlar. Boyama işlemi: Il-6 immunohistokimya. Hematoksilen, zıt boyama işlemi (Bar: 50 µm.)



Şekil 24 GLP+GA grubuna ait karaciğer dokularında GLP grubuna kıyasla belirgin düzeyde daha hafif IL-6 pozitif ekspresyonlar. Boyama işlemi: IL-6 immunohistokimya. Hematoksilen, zıt boyama işlemi. (Bar: 50 µm.)



Şekil 25 Kontrol grubuna ait karaciğer dokularında oldukça hafif düzeyde IL-6 pozitif ekspresyonlar. Boyama işlemi: IL-6 immunohistokimya. Hematoksilen, zıt boyama işlemi. (Bar: 50 µm.)

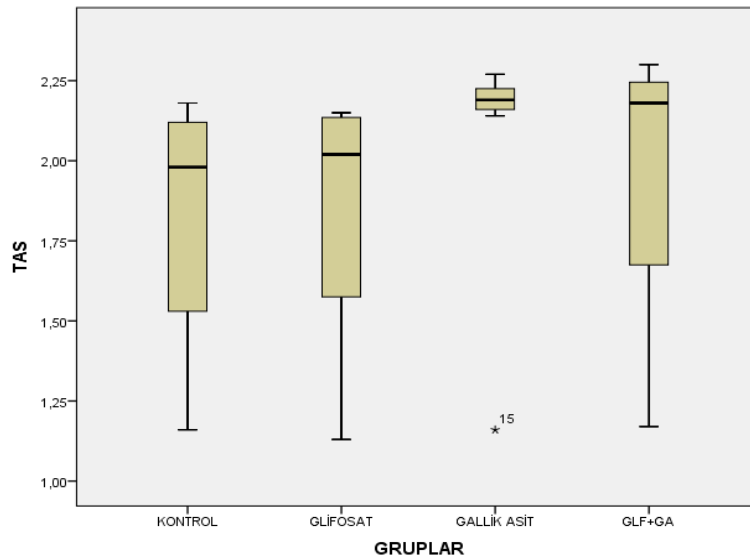


Şekil 26 GA grubuna ait karaciğer dokularında oldukça hafif düzeyde IL-6 pozitif ekspresyonlar. Boyama işlemi: IL-6 immunohistokimya. Hematoksilen, zıt boyama işlemi. (Bar: 50 µm.)

4.3. Biyokimyasal Analizler

4.3.1. Total Antioksidan Kapasitesi (TAS)

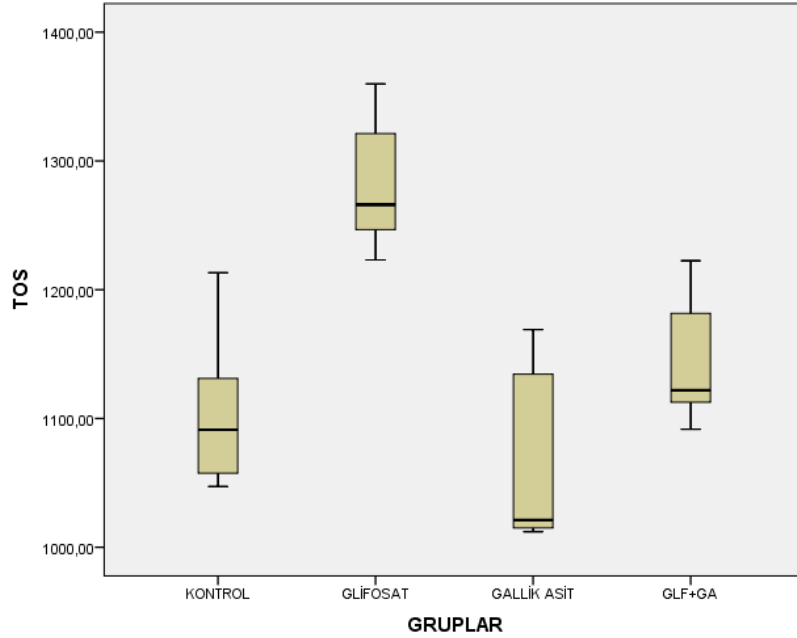
Bütün çalışma gruplarının TAS değerlerine bakıldığında en yüksek TAS değerinin GA grubunda olduğu izlendi (Tablo 7). Gruplar arası yapılan karşılaştırmada ise grupların TAS düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü ($p>0.05$) (Şekil 27).



Şekil 27 Serum TAS değerlerinin istatistiksel analizi sonucu oluşan ortalamalarının grafiği.

4.3.2.Total Oksidan Kapasitesi (TOS)

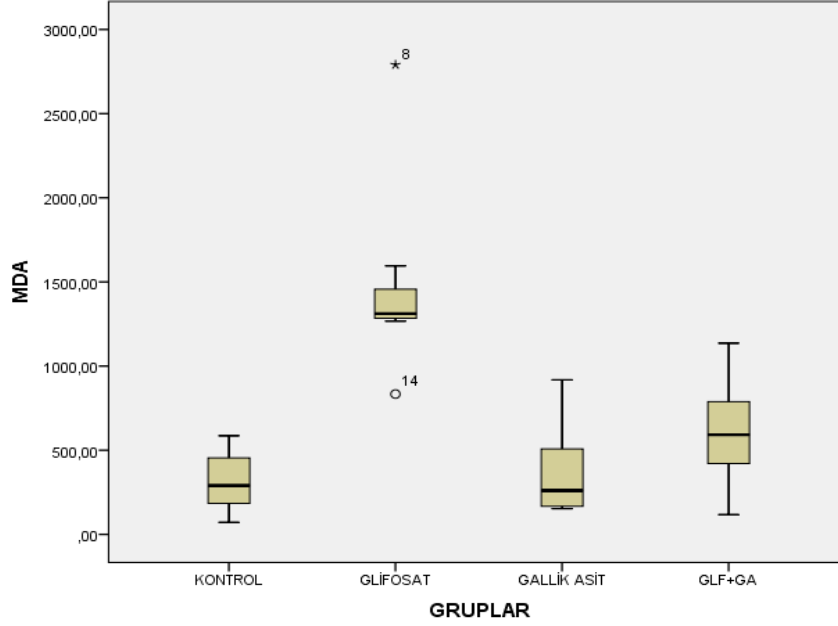
Bütün çalışma gruplarının TOS değerlerine bakıldığında en düşük TOS değerinin GA grubunda olduğu izlendi (Tablo 7). Bununla birlikte en yüksek TOS değeri ise GLP grubunda görüldü. Gruplar arası kıyaslamada ise GLP grubuyla ve diğer çalışma grupları arasında anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0.05$) (Şekil 28). GLP ile GA uygulandığında serum TOS değerini anlamlı şekilde düşürdüğü görüldü.



Şekil 28 Serum TOS değerlerinin istatistiksel analizi sonucu oluşan ortalamalarının grafiği.

4.3.3.Kan Serum Malondialdehit (MDA) Değerlerinin Ölçülmesi

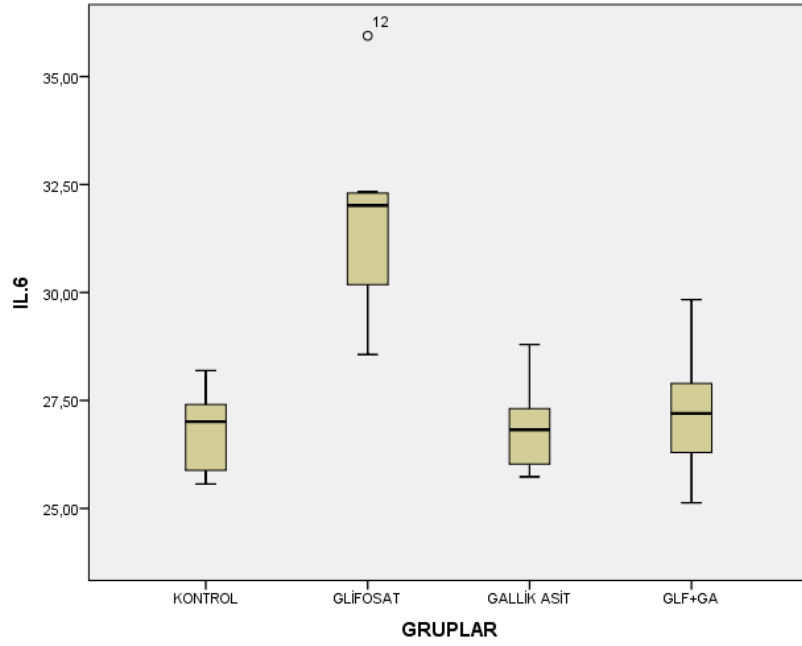
Bir diğer oksidatif stres belirteci olan MDA düzeylerine baktığımızda; Glifosat grubunun serum MDA düzeyi ortalaması en yüksek olarak izlenirken, en düşük ortalamaya ise kontrol grubunun sahip olduğu görüldü (Tablo 7). Gallik asit grubuyla Kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p>0.05$). GLP grubu ile GLP+GA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu izlendi. GLP+GA grubunun serum MDA düzeyinin GLP grubundan daha düşük olduğu izlendi ($p<0.05$) (Şekil 29).



Şekil 29 Serum MDA değerlerinin istatistiksel analizi sonucu oluşan ortalamalarının grafiği.

4.3.4. Kan Serum Interlökin-6 (Il-6) Değerlerinin Ölçülmesi

İnflamasyon belirteçlerinden biri olan Il-6 değerlerine serum düzeyinde de baktığımızda; yine en yüksek inflamasyonun GLP grubunda olduğu izlendi (Tablo 7). Kontrol grubu ile GA grubu arasında da istatistiksel açıdan anlamlı fark izlenmezken, ortalamalarının birbirine oldukça yakın olduğu görüldü ($p>0.05$). GLP grubu ile GLP+GA grubu kıyaslandığında ise serum Il-6 değerlerinde anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0.05$). GLP ile eş zamanlı GA uygulanması Il-6 değerlerine olumlu etki etmiştir (Şekil 30).



Şekil 30 Serum Il-6 değerlerinin istatistiksel analizi sonucu oluşan ortalamalarının grafiği.

Gruplar **MDA** **Il-6** **TAS** **TOS**

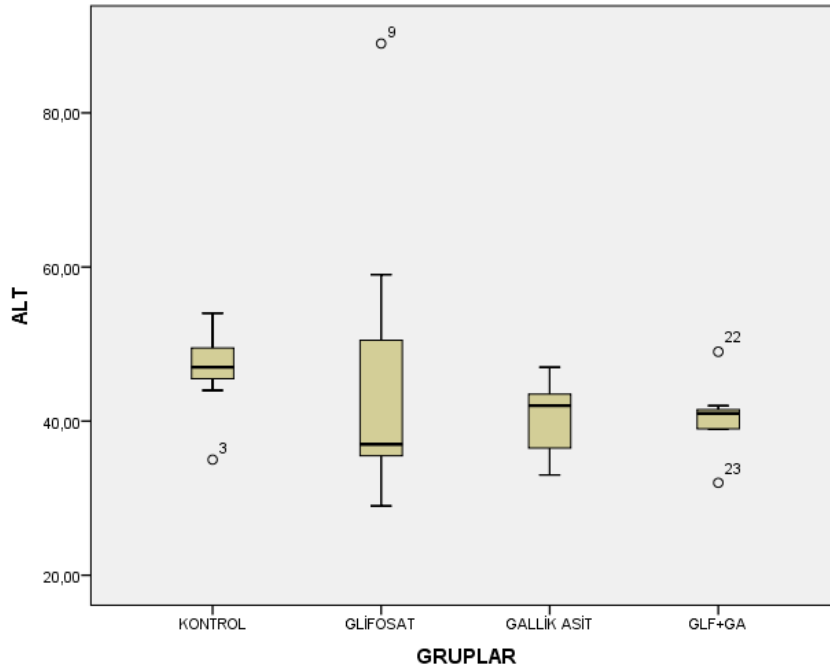
Kontrol	317.93±198.91	26.76±1.0 0	1.80±0.43	1104.17±59.55
GLP	1488.03±616.37	31.64±2.4 4	1.81±0.46	1283.54±50.66
GA	382.90±304.69	26.86±1.0 7	2.05±0.39	1071.60±73.00
GLP+GA	609.09±333.18	27.22±1.5 4	1.92±0.50	1146.40±48.93

Tablo 7 Gruplar arası ortalaması alınan serum MDA, Il-6 (normal değeri: <8 pg/ml), TAS ve TOS değerlerinin Ortalama±Standart sapmaları.

4.3.5.Serum biyokimyasal değerlerin ölçülmesi Testleri

Bütün çalışma gruplarının serum Albümin, Direkt bilirubin, Total bilirubin, İndirek bilirubin, AST ve ALT değerleri değerlendirildi.

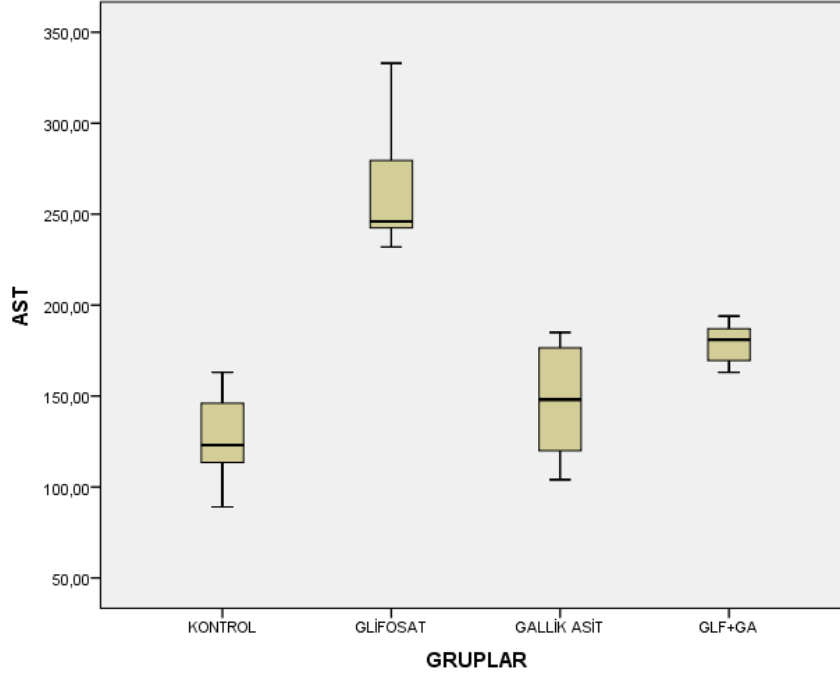
ALT değerlerini incelediğimizde; Gruplar arası yapılan kıyaslamada ALT değerlerde istatistiksel açıdan anlamlı fark olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). Grupların ortalamaları alındığında ise en yüksek değerler GLP grubunda olduğu, fakat diğer gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı bir yükseklik olmadığı görüldü (Tablo 3) (Şekil 31).



Şekil 31 ALT değerlerinin istatistiksel analizi sonucu oluşan ortalamalarının grafiği.

AST değerlerine baktığımızda; en yüksek AST değerinin GLP grubunda olduğu ve GLP+GA grubunun ise AST değerinde düşüş olduğu izlendi (Tablo 8). GLP grubunu diğer çalışma grupları ile kıyasladığımızda gruplar arasında anlamlı fark olduğu izlendi ($p<0.05$). GLP ile GA uygulandığında karaciğer enzimlerinden olan AST değerini olumlu yönde etkilemişti. Buna rağmen kontrol grubu ile GLP+GA grupları arasında anlamlı fark olduğu izlenirken

($p < 0.05$), GA grubu ile GLP+GA grupları arasında anlamlı fark izlenmedi ($p > 0.05$) (Şekil 32).



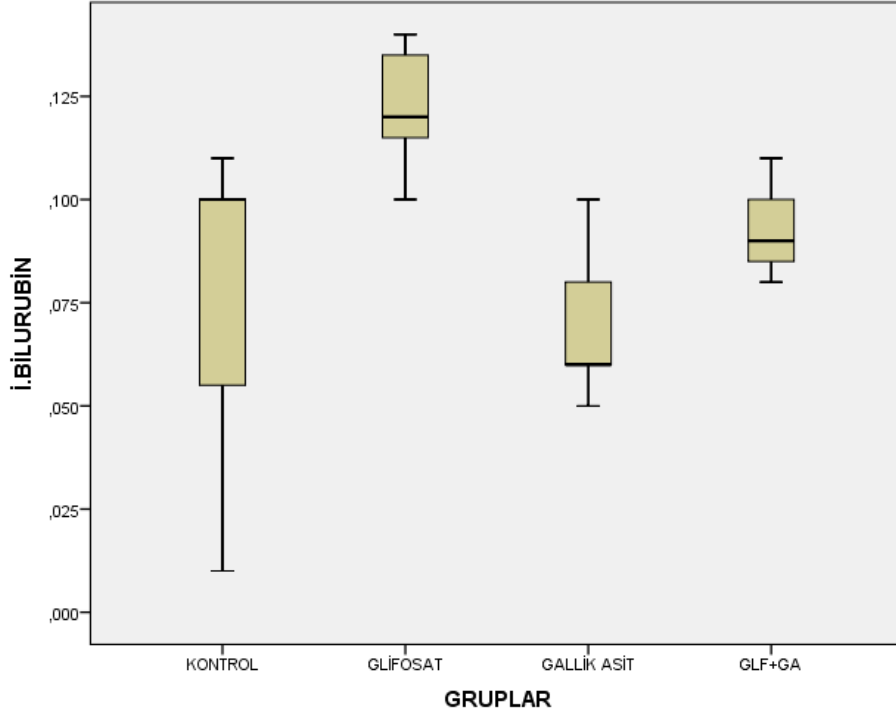
Şekil 32 AST değerlerinin istatistiksel analizi sonucu oluşan ortalamalarının grafiği

Gruplar arası yapılan karşılaştırmada; İndirek bilirubin ortalaması en yüksek GLP grubunda izlendi (Tablo 8). GLP+GA grubunun İ. Bilirubin ortalaması GLP grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düşüklükte izlendi ($p < 0.05$). Kontrol grubu, GA grubu ve GLP+GA gruplarının İ. Bilirubin ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi ($p > 0.05$) (Şekil 33).

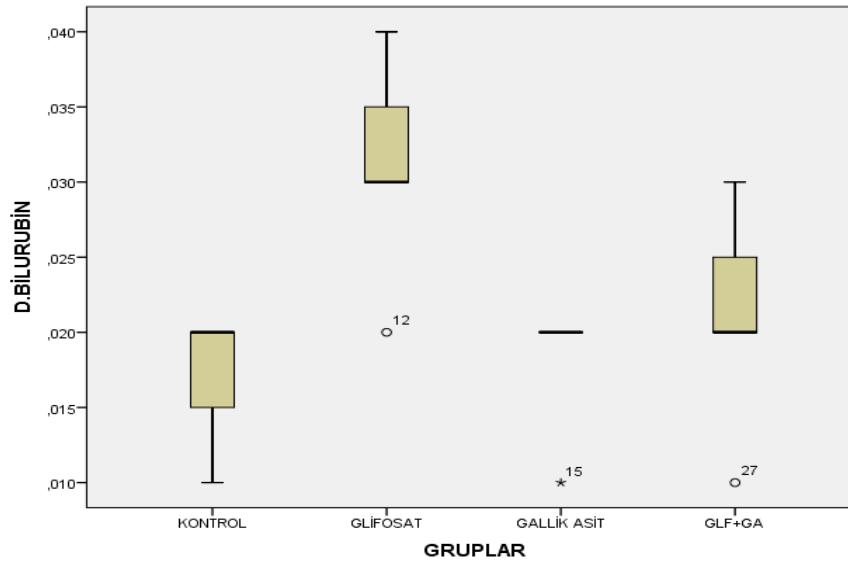
Direk bilirubinler ise benzer şekilde en yüksek GLP grubunda izlenirken, gruplar arası yapılan karşılaştırmada GLP grubu ile GLP+GA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi ($p > 0.05$). Grupların ortalama D. bilirubinleri Tablo 8’te detaylı olarak verildi (Tablo 8) (Şekil 34).

İndirek bilirubin ile Direk bilirubin toplamları sonucu elde edilen Total bilirubin ortalaması verilerle uyumlu olarak en yüksek GLP grubunda izlendi (Tablo 8). Gruplar arası karşılaştırmada ise GLP grubu ile diğer gruplar arasında

anlamli fark olduğu, çalışmamızda uygulanan GLP'nin bütün grupların T. bilirubin miktarlarına olumsuz etki ettiği görüldü ($p < 0.05$).

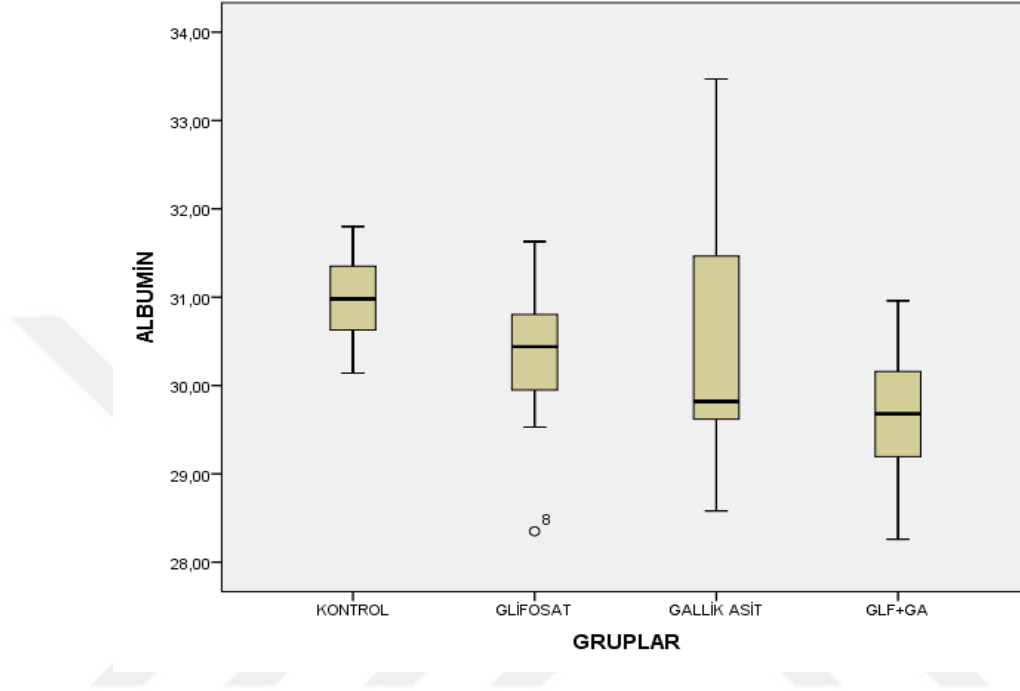


Şekil 33 İndirek bilirubin değerlerinin istatistiksel analizi sonucu oluşan ortalamalarının grafiği



Şekil 34 Direk bilirubin değerlerinin istatistiksel analizi sonucu oluşan ortalamalarının grafiği

Serum Albumin değerlerini incelediğimizde ise; Albumin değerlerinin Kruskal Wallis-H testi anlamlı olmadığından gruplar arası karşılaştırma yapılmadı ($p>0.05$). Bütün grupların Albumin değerlerinin ortalamaları Tablo 8 ve Şekil 35'te detaylı Şekilde açıklandı.



Şekil 35 Albumin değerlerinin istatistiksel analizi sonucu oluşan ortalamalarının grafiği

Gruplar	AST	ALT	<u>İ.Bilirubin</u>	<u>D.Bilirubin</u>	<u>T.Bilirubin</u>	<u>Albumin</u>
Kontrol	127.71±25.66	46.57±5.96	0.07±0.03	0.01±0.00	0.09±0.03	30.98±0.59
GLP	265.00±36.79	46.71±2.91	0.12±0.01	0.03±0.00	0.15±0.01	30.27±1.07
GA	147.14±33.42	40.28±5.15	0.07±0.011	0.01±0.00	0.08±0.01	30.57±1.66
GLP+GA	178.71±11.88	40.42±5.02	0.09±0.01	0.02±0.00	0.11±0.01	29.65±0.88

Tablo 8 Gruplar arası ortalaması bakılan serum AST (U/L), ALT (U/L), İndirek Bilirubin (mg/dl), Direk Bilirubin (mg/dl), Total Bilirubin (mg/dl) ve Albumin (mg/dl) değerlerinin Ortalama±Standart sapmaları.

5. TARTIŞMA

Glifosat (GLP), yabancı ot kontrolü için tarımda kullanılan geniş spektrumlu aktiviteye sahiptir. Geniş kullanımını nedeniyle GLP bitkilerde, toprakta, suda, havada, hayvanlarda ve insanlarda yaygın olarak bulunur (63,64).

GLP, Alman Federal Risk Değerlendirme Enstitüsü tarafından tanımlanan kabul edilebilir günlük alımın altındaki konsantrasyonlarda bile karaciğerde hasara neden olabilir (5,65).

Astiz ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada glifosat gibi pestisitlerin karaciğer ve beyin hücrelerinde toksik olduğu belirtilmiştir. Glifosatın DNA hasarına yol açtığı, apoptoz veya nekroza yol açtığı belirtilmiştir. Aynı zamanda oksidatif stresi artırdığı da belirtilmiştir (66).

Beuret ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada karaciğerde glifosata maruz kalma ve metabolizma, aşırı malonaldehit (MDA) üretimine ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmış üretimi yoluyla oksidatif strese yol açabilir. Aşırı ROS, lipitlerin, proteinlerin veya DNA'nın oksidatif hasarı yoluyla hücresel bütünlüğü tehlikeye atabilir ve gelişim, farklılaşma ve yaşlanma için kritik olan gen fonksiyonlarının düzenlenmesinde değişiklik yapabilir (67).

Hao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HepG2 hücreleri insan karaciğer dokusu toksisitesinin araştırılması için uygun bir in vitro model olarak seçilmiş. Glifosat benzeri herbisit Roundup'un beyan edilen aktif bileşeninin (GLP), HepG2 hücreleri üzerinde önemli bir toksik etkiye sahip olmadığını, ancak ana formüllerinin güçlü toksik etki oluşturduğunu gösterdi. GLP formülasyonunun HepG2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, formülantların eklenmesiyle güçlendirildi; bu da formülantların, beyan edilen aktif içerikten ziyade GLP formülasyonunun sitotoksik etkisine katkıda bulunduğunu ortaya koymuş (68).

Endirlik ve arkadaşlarının yaptığı Glifosat bazlı herbisitinin karaciğer hücresi üzerindeki toksisitesinin antioksidan olan alfa-lipoik asidin ve vitamin-E'nin koruyucu etkinliğinin araştırılması çalışmasında glifosatın Bax/Bcl-2 oranında artışa sebep olduğu görüldü. Vitamin E ve Alfa-lipoik asit toksisiteyi azalttığı görüldü. Bu iki maddenin de anti-apoptotik etkileri büyük olasılıkla antioksidan özelliklerinden ve oksidatif stres temizleme özelliklerinden kaynaklanmaktadır (69).

Sanjay ve arkadaşlarının wistar türü ratlarda yaptığı çalışmada izoniazid ve rifampisinle Gallik asidin kullanılması, tek başına antitüberküloz tedavisine kıyasla karaciğer fonksiyon enzimlerindeki artışı, hepatik nekrozu ve inflamasyonu hafiflettiğini gözlemlediler (70).

Karimi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Fluoksetin verilen ratlarda karaciğer toksisitesinde gallik asidin koruyucu etkinliği incelenmiş. Fluoksetin kullanımı Alt, Ast ve MDA yükselmesine sebep olmakta. Gallik asid kullanımı ile bu değerlerin azaldığı gözlenmiş (71).

Ojeaburu ve Oriakhi'nin wistar türü ratlar üzerinde yaptığı çalışmada karbontetraklor kaynaklı karaciğer hasarında gallik asidin hepatik enzimler üzerindeki hepatoprotektif potansiyeli araştırılmış. Karbontetraklor'un hepatotoksik etkisinde Gallik asidin ALP, GGT, ALT ve AST üzerinde anlamlı olarak azalttığı izlendi. Yine aynı çalışmada artan bilirubin, IL-6, MDA seviyesinin gallik asid ile azaldığı, azalan albumin değerlerinin de arttığı izlenmiştir (72).

Yapmış olduğumuz bu deneysel çalışmanın histopatolojik, immunohistokimyasal, toplam antioksidan ve oksidan düzeyi, Malondialdehit seviyesi, IL-6'nın serum düzeyi, AST, ALT, Albumin, İndirek bilirubin, direk bilirubin, total bilirubin düzeylerine baktığımızda;

Histopatolojik olarak değerlendirdiğimizde Glifosat alımına bağlı karaciğer dokularında hemoraji, sinüzoidal dizilimde bozulma ve karaciğer doku bütünlüğünün ışık mikroskobu altındaki görünümünde dejenerasyonların

geliştiği izlendi. İmmunohistokimyasal değerlendirmede ise Bcl-2 ve Il-6 benzeri inflamatuvar sitokinlerin yine GLP grubunda pozitif ekspresyonlar gösterdiği izlendi. Bu bulgular doğrultusunda GLP+GA uygulanan grubun ise hem histopatolojik hem de immunohistokimyasal değerlendirmesinde inflamasyon yolaklarını baskıladığı izlendi. GLP ile GA uygulanması karaciğer dokusunda histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak daha az hasarın oluşmasına neden olmuştu.

Serum total oksidan ve antioksidan düzeyleriyle oksidatif stres parametrelerini değerlendirdiğimizde ise; en dşuk TAS değerinin GLP grubunda olduğu, GLP grubu ile GLP+GA grubu ile aralarında anlamlı bir düşüklük olduğu izlendi. En yüksek TAS değeri ise GLP+GA grubunda görüldü. TOS değeri arasında ise toplam oksidan düzeyinin en yüksek GLP grubunda olduğu izlendi. Bununla birlikte GLP grubu ile GLP+GA grubu arasında ise anlamlı bir düşüklük olduğu görüldü. GLP ile GA uygulanması serum TOS değerlerini düşürmüştü. Oksidatif stres belirteci olan MDA düzeylerine bakıldığında ise yine GLP grubunun MDA düzeyi en yüksekken, GLP+GA grubunun MDA düzeyi daha düşük olarak görüldü.

Serum IL-6 düzeylerini kıyasladığımızda GLP grubu ile GLP+GA grubu arasında immunohistokimyasal değişikliklere paralel olarak serum IL-6 değerlerinde de olumlu bir düşüş izlendi.

Karaciğer enzimlerinden olan AST ve ALT değerlerinde ise ALT kan düzeyleri arasında gruplar arası anlamlı fark olmadığı izlendi. AST düzeylerine baktığımızda ise GLP ile GA uygulanması AST değerlerini olumlu yönde etkilemişti. Yine en yüksek değerin GLP grubunda olduğu görülürken, GLP+GA grubuyla aralarında anlamlı fark olduğu ve GLP+GA grubunun AST değerinin daha düşük olduğu izlendi.

Çalışmamızda İndirek bilirubin, Direk bilirubin ve Total bilirubin değerlerine baktığımızda; İndirek bilirubinin çalışma ile uyumlu şekilde en yüksek GLP grubunda olduğu ve GLP ile GA uygulandığında bu değeri olumlu şekilde düşürdüğü görüldü. Fakat Direk bilirubin değerleri arasında anlamlı bir

fark izlenmedi. Total bilirubin değerleri ise indirek bilirubin değerlerinden olumlu yönde etkilenmişti.

Son olarak Albümin düzeyleri araştırıldığında ise; uygulamış olduğumuz doz ve srenin gruplar arasında anlamlı olarak bir fark oluşturmadığı görüldü.



6. SONUÇ:

Glifosat nedenli hepatotoksisite üzerine Gallik asidin koruyucu etkinliğini incelediğimiz çalışmamızda numunelerimizi biyokimyasal (AST, ALT, T.BİL., D.BİL., İ.BİL., ALBUMİN), histolojik (H&E, PAS), immünohistokimyasal (IL-6, BCL-2) olarak inceledik. Oksidatif stresi de göstermek amacıyla TAS ve TOS değerlerini çalıştık, ek olarak MDA düzeyinide çalışarak çalışmamızı güçlendirdik.

Sonuç olarak uyguladığımız GLP sıçan karaciğerinde histopatolojik, immünolojik ve biyokimyasal parametreleri olumsuz yönde etkilerken, GLP ile GA uygulandığında bu parametrelerin büyük bir kısmında olumlu yönde iyileşme izlendi.

KAYNAKLAR:

1. Chiesa, L.M.; Nobile, M.; Panseri, S.; Arioli, F. Detection of glyphosate and its metabolites in food of animal origin based on ion-chromatography-high resolution mass spectrometry (IC-HRMS). *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Asses.*
2. John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D (2001) Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J Nutr Biochem* 12(9):500–504.
3. World Health Organization (WHO) (1994) United Nations Environment Programme, the International Labour Organization. *Glyphosate. Environmental Health Criteria*, p 159.
4. Benbrook C.M., 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ. Sci. Eur.* 28, 3.
5. Myers J.P., Antoniou M.N., Blumberg B., Carroll L., Colborn T., Everett L.G., et al., 2016. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ. Health* 15, 19.
6. Nelson K.A., Massey R.E., Burdick B.A., 2011. Harvest aid application timing affects wheat and relay intercropped soybean yield. *Agron. J.* 103, 851–855.
7. Tarazona, J.V.; Court-Marques, D.; Tiramani, M.; Reich, H.; Pfeil, R.; Istace, F.; Crivellente, F. Glyphosate toxicity and carcinogenicity: A review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. *Arch. Toxicol.* 201.
8. Ford B., Bateman L.A., Gutierrez-Palominos L., Park R., Nomura D.K., 2017. Mapping proteome wide targets of glyphosate in mice. *Cell Chem. Biol.* 24, 133–140.

9. Kubsad D., Nilsson E.E., King S.E., Sadler-Riggelman I., Beck D., Skinner M.K., 2019. Assessment of glyphosate induced epigenetic transgenerational inheritance of pathologies and sperm epimutations: generational toxicology. *Sci. Rep.* 9, 6372.
10. Pu Y., Yang J., Chang L., Qu Y., Wang S., Zhang K., et al., 2020. Maternal glyphosate exposure causes autism-like behaviors in offspring through increased expression of soluble epoxide hydrolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 11753–11759.
11. Van Bruggen, A.H.C.; He, M.M.; Shin, K.; Mai, V.; Jeong, K.C.; Finckh, M.R.; Morris, J.G., Jr. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci. Total Environ.* 2018, 616–617, 255–268. [CrossRef] [PubMed].
12. Portier, C.J. A comprehensive analysis of the animal carcinogenicity data for glyphosate from chronic exposure rodent carcinogenicity studies. *Environ. Health* 2020, 19, 18. [CrossRef] [PubMed].
13. Chłopecka, M.; Mendel, M.; Dzieka, N.; Wojciech, K. Glyphosate affects the spontaneous motoric activity of intestine at very low doses—In vitro study. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2014, 113, 25–30. [CrossRef] [PubMed].
14. Nozdrenko D, Abramchuk O, Prylutska S, Vygovska O, Soroca V et al. Analysis of Biomechanical Parameters of Muscle Soleus Contraction and Blood Biochemical Parameters in Rat with Chronic Glyphosate Intoxication and Therapeutic Use of C60 Fullerene. *Int J* .
15. Charavaryamath, C., Janardhan, K.S., Townsend, H.G., Willson, P., Singh, B., 2005. Multiple exposures to swine barn air induce lung inflammation and airway hyper-responsiveness. *Respir. Res.* 6, 50. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-50>.
16. Clapp, W.D., Thorne, P.S., Frees, K.L., Zhang, X., Lux, C.R., Schwartz, D.A., 1993. The effects of inhalation of grain dust extract and

endotoxin on upper and lower airways. *Chest* 104, 825–830.
<https://doi.org/10.1378/chest.104.3.825>.

17. Jagielo, P.J., Thorne, P.S., Watt, J.L., Frees, K.L., Quinn, T.J., Schwartz, D.A., 1996. Grain dust and endotoxin inhalation challenges produce similar inflammatory responses in normal subjects. *Chest* 110, 263–270.
<https://doi.org/10.1378/chest.110.1.263>.

18. Savov, J.D., Brass, D.M., Lawson, B.L., McElvania-Tekippe, E., Walker, J.K.L., Schwartz, D.A., 2005. Toll-like receptor 4 antagonist (E5564) prevents the chronic airway response to inhaled lipopolysaccharide. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 289, .

19. Becker, S., Clapp, W.A., Quay, J., Frees, K.L., Koren, H.S., Schwartz, D.A., 1999. Compartmentalization of the inflammatory response to inhaled grain dust. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 1309–1318.
<https://doi.org/10.1164/ajrccm.160.4.9901062>.

20. Michel, O., Nagy, A.M., Schroeven, M., Duchateau, J., Neve, J., Fondu, P., et al. 1997. Dose-response relationship to inhaled endotoxin in normal subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156, 1157–1164.

21. Sandstrom, T., Bjermer, L., Rylander, R., 1992. Lipopolysaccharide (LPS) inhalation in healthy subjects increases neutrophils, lymphocytes and fibronectin levels in bronchoalveolar lavage fluid. *Eur. Respir. J.* 5, 992–996.

22. Kuş İ, Zararsız İ, Ögetürk M, Yılmaz HR, Sarsılmaz M. Deneysel Formaldehit Toksisitesinde Testis SOD, GSH-Px, MDA Düzeyleri ve ω -3 Yağ Asitlerinin Koruyucu Etkisi. 2008,13; (1): 1-4.

23. Zhang W, Wang J, Song J, Feng Y et al. Effects of low-concentration glyphosate and aminomethyl phosphonic acid on zebrafish embryo development. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Volume 226, 15 December 2021, 112854.

24. Abarikwu, S.O., et al., 2014. Combined administration of curcumin and gallic acid inhibits gallic acid-induced suppression of steroidogenesis, sperm output, antioxidant defenses and inflammatory responsive genes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Mo.*

25. Verma, S., Singh, A., and Mishra, A., 2013. Gallic acid: molecular rival of cancer. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35 (3), 473–485.

26. Abarikwu, S.O., et al., 2016. Curcumin protects against gallic acid-induced oxidative stress, suppression of glutathione antioxidant defenses, hepatic and renal damage in rats. *Renal Failure*, 38 (2), 321–329.

27. Choi, H.J., et al., 2010. Anti-human rhinovirus activity of gallic acid possessing antioxidant capacity. *Phytotherapy Research: PTR*, 24 (9), 1292–1296.

28. Kartkaya, K., et al., 2013. Investigation of the possible protective role of gallic acid on paraoxanase and arylesterase activities in livers of rats with acute alcohol intoxication. *Cell Biochemistry and Function*, 31 (3), 208–213.

29. J.S. Giftson, S. Jayanthi, N. Nalini, Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1, 2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis, *Investig. New Drugs* 28 (3) (2010) 251–259. .

30. C.-L. Tsai, Y.-M. Chiu, T.-Y. Ho, C.-T. Hsieh, D.-C. Shieh, Y.-J. Lee, et al., Gallic acid induces apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells, *Anticancer Res.* 38 (4) (2018) 2057–2067.

31. K.-C. Liu, A.-C. Huang, P.-P. Wu, H.-Y. Lin, F.-S. Chueh, J.-S. Yang, et al., Gallic acid suppresses the migration and invasion of PC-3 human prostate cancer cells via inhibition of matrix metalloproteinase-2 and-9 signaling pathways, *Oncol. Rep.* 26 (1) (.

32. Severn, C. B. (1971). A morphological study of the development of the human liver. I. Development of the hepatic diverticulum. *American Journal of Anatomy*, 131(2), 133-158.

33. Sadler, T. W. (2005, May). Embryology of neural tube development. In *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* (Vol. 135, No. 1, pp. 2-8). Hoboken: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.

34. Gilbert, S. F. (1994). *Developmental biology*. Sinauer, Massachusetts.

35. Lade, A. G., & Monga, S. P. (2011). Beta-catenin signaling in hepatic development and progenitors: Which way does the WNT blow?. *Developmental Dynamics*, 240(3), 486-500..

36. Straznicky, C. (1987). *Anatomy atlas: Anatomy: a regional atlas of the human body*.

37. Sadler, T. W. (2022). *Langman's medical embryology*. Lippincott Williams & Wilkins.

38. Severn, C. B. (1972). A morphological study of the development of the human liver. II. Establishment of liver parenchyma, extrahepatic ducts and associated venous channels. *American Journal of Anatomy*, 133(1), 85-107.

39. Yıldız, H. T., & Kalkan, K. T. (2022). Organların embriyolojik gelişimi. *Sağlık & Bilim : Genel Embriyoloji-1*, 137.

40. Moore, K., Persaud, T.V.N.(2002). *Clinically oriented embryology*. Okar İ, Dalcık H, İnsan Embriyolojisi, Nobel Tıp Kitabevleri. 323–33. .

41. Eisendrath, D. N. *A Textbook of Clinical Anatomy. For Students and Practitioners*. By Daniel N. Eisendrath, AB, MD, Clinical Professor of Anatomy in the Medical Department of the University of Illinois (College of Physicians and Surgeons); Attending S.

42. Monkhouse, W. S. (2001). Terminologia Anatomica. International Anatomical Terminology. By the Federative Committee on Anatomical Terminology (FCAT).(Pp. x+ 292. with CD-Rom; EUR 40.39 hardback; ISBN 3 13 115251 6.) Stuttgart: Georg Thieme. 1998. The Jo.

43. Karcaaltincaba, M., Haliloglu, M., Akpınar, E., Akata, D., Özmen, M., Ariyurek, M., et. al. (2007). Multidetector CT and MRI findings in periportal space pathologies. *European journal of radiology*, 61(1), 3-10.

44. Merrillees N. Basic Histology.(1976) *Med J Aust.* 2(17):653–653. .

45. Schraegle, A.E., Millard, N.D., King, B.G. (1951) *Human Anatomy and Physiology. Vol. 51, The American Journal of Nursing.* Pearson Education.. p. 40. Tarihi eser bu.

46. Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current biology : CB*, 27(21), R1147–R1151.

47. Friedman, S. L. (2008). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews*, 88(1), 125-172.

48. Schwartz, S. I., Brunickardi, F. C., Andersen, D. K., Billiar, T. R., Dunn, D. L., Hunter, J. G., et. al. (2015). *Schwartz's principles of surgery.* McGraw-Hill Education,.

49. Townsend, C. M., & Sabiston, D. C. (2004). *Textbook of surgery: the biological basis of modern surgical practice* (pp. 110-113). Philadelphia, PA: Elsevier Saunders.

50. Karcaaltincaba, M., Haliloglu, M., Akpınar, E., Akata, D., Özmen, M., Ariyurek, M., et. al. (2007). Multidetector CT and MRI findings in periportal.

51. *Gray's Surgical Anatomy.*(2020) Gupta A DE. Liver. In: A BP, editor. first edition. p. 453-7.

52. Hiatt, J. R., Gabbay, J., & Busuttil, R. W. (1994). Surgical anatomy of the hepatic arteries in 1000 cases. *Annals of surgery*, 220(1), 50.
53. Merrillees N. Basic Histology.(1976) *Med J Aust.* 2(17):653–653. .
54. Robbins basic pathology.(2018) V K. Liver and Gallbladder. In: V K, editor. Tenth ed. Philadelphia: Elsevier. p. 637-77. .
55. Shi, H., Yang, G., Zheng, T., Wang, J., Li, L., Liang, Y., Liu, L. (2015). A preliminary study of ALPPS procedure in a rat model. *Scientific reports*, 5(1), 17567.
56. Nejla Soudani, Mariem Chaâbane, Imen Ghorbel, Awatef Elweji, Tahia Boudawara and Najiba Zeghal. Glyphosate disrupts redox status and up-regulates metallothionein I and II genes expression in the liver of adult rats. Alleviation by quercetin. *Gen. Physiol.* .
57. Olorunsogo OO, Bababunmi EA (1980): Interference of herbicides with mitochondrial oxidative phosphorylation: the N⁺ (phosphonomethyl) glycine model. *Toxicol. Lett.* 5, 148).
58. T. Alibakhshi, M.J. Khodayar, L. Khorsandi, M. Rashno, L. Zeidooni, Protective effects of zingerone on oxidative stress and inflammation in cisplatin-induced rat nephrotoxicity, *Biomed. Pharmacother.* 105 (2018) 225–232. .
59. V.V. Padma, P. Sowmya, T.A. Felix, R. Baskaran, P. Poornima, Protective effect of gallic acid against lindane induced toxicity in experimental rats, *Food Chem. Toxicol.* 49 (4) (2011) 991–998.
60. Camargo Jr, C. A., Madden, J. F., Gao, W., Selvan, R. S., & Clavien, P. (1997). Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology*, 26(6), 1513-1520.

61. Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 38(12), 1103-1111.
62. Erel, O. (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical biochemistry*, 37(2), 112-119.
63. Benbrook CM. Amerika Birleşik Devletleri'nde ve küresel olarak glifosat herbisit kullanımındaki eğilimler. *Çevre Bilimi Eur.* 2016; 28 (1):3.
64. Dük SO. Glifosatın tarihçesi ve güncel durumu. *Zararlı Yönetimi Sci.* 2018; 74 (5):1027–1034.
65. Mesnage R, Defarge N, Spiroux de Vendômois J, Séralini GE. Glifosatın ve ticari formülasyonlarının yasal sınırların altındaki potansiyel toksik etkileri. *Gıda Kimyası Toksikol.* 2015; 84 :133–153.
66. M. Astiz, M.J. de Alaniz, C.A. Marra Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72 (2009), pp. 2025-2032.
67. C.J. Beuret, F. Zirulnik, M.S. Gimenez. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses *Reprod. Toxicol.*, 19 (2005), pp. 501-504.
68. Hao Y, Zhang Y, Ni H, Gao J, Yang Y, Xu W, et. al. *Environ Sci Health B.* 2019;54(9):737 744. doi: 10.1080/03601234.2019.1633215. Epub 2019 Jun 24.PMID: 31232652.
69. Ünlü Endirlik B, Bakır E, Ökçesiz A, Güler A, Hamurcu Z, Eken A, et. al. *Çevre Toksikol Pharmacol.* 2022 Kasım;96:103999. doi: 10.1016/j.etap.2022.103999. Epub 2022 14 Ekim.PMID: 36252731.
70. Sukumaran Sanjay, Chandrashekar Girish, Pampa Ch Toi, Zachariah Bobby *Eczacılık ve Farmakoloji Dergisi* , Cilt 73, Sayı 4, Nisan 2021, Sayfa 473–486,.

71. Karimi-Khouzani O, Heidarian E, Amini SA. *Pharmacol Rep.* 2017 Agosto;69(4):830-835. Epub 2017 23 Mart. PMID: 28599245.

72. Ojeaburu SI, Oriakhi K. *Toxicol Rep.* 2021 Jan 8;8:177-185. doi:10.1016/j.toxrep.2021.01.001. eCollection 2021. PMID: 33489777.

