



Ratlarda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Akut Karaciğer Hasarı Üzerine Nar Çekirdeği Yağının Etkisi ve Kaspaz Aktivitesi ile Hepatik Apoptozisin Belirlenmesi*

Görkem EKEBAŞ¹, Ayhan ATASEVER¹, Meryem ŞENTÜRK², Duygu YAMAN GRAM¹, Meryem EREN²

¹Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE
²Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Görkem EKEBAŞ; E-mail: gekebas@erciyes.edu.tr; ORCID: 0000-0001-9094-677X

Atıf Yapmak İçin: Ekebaş G, Atasever A, Şentürk M, Yaman Gram D, Eren M. Ratlarda karbon tetraklorür ile oluşturulan akut karaciğer hasarı üzerine nar çekirdeği yağının etkisi ve kaspaz aktivitesi ile hepatic apoptozisin belirlenmesi. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(2):156-163.

Özet: Bu çalışmada, karbon tetraklorür (CCl₄) ile akut karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda nar çekirdeği yağının (NÇY) karaciğer dokusunda oluşabilecek lezyonlar üzerine koruyucu etkisi, hücresel apoptozda kaspaz aktivasyonları, serum Alanin Amino Transferaz (ALT) aktivitesi, trigliserit, total protein, albümin, total kolesterol düzeyleri ve karaciğer malondialdehit (MDA) düzeyi değerlendirildi. Çalışmada 32 adet rat, her grupta 8 adet olmak üzere 4 gruba ayrıldı. İlk grup kontrol olarak belirlendi. İkinci gruba 4 hafta her gün 2 ml/kg/canlı-ağırlık dozunda NÇY gavaj ile verildi. Üçüncü gruba 1:1 oranında mısır yağı ile dilüe edilen 1.0 ml/kg/canlı-ağırlık iki doz CCl₄ ilk hafta 3 gün ara ile intraperitoneal olarak enjekte edildi. Dördüncü gruba 2 ml/kg/canlı-ağırlık dozunda NÇY 4 hafta her gün, gavaj ile verilirken ilk hafta 3 gün ara ile 2 doz intraperitoneal 1 ml/kg/canlı-ağırlık, dilüe edilmiş CCl₄ uygulandı. Kontrol gruplarında normal karaciğer doku yapısı gözlenirken; CCl₄ grubunda hepatositlerinde yoğun makro ve mikroveziküler yağlanma, portal bölgede ve parankimde çoğunluğu lenfositlerden oluşan mononükleer hücre infiltrasyon alanları ile nekrotik değişiklikler görüldü. NÇY uygulamalarında histopatolojik değişiklikler CCl₄ grubuna göre kısmen azalırken, kaspaz 3 ve 9 aktivitesi de sınırlı sayıda azaldı. CCl₄ ile artış gösteren ALT aktivitesi NÇY uygulaması ile önemli düzeyde düşüş (P<0.05), serum total protein değerlerinde artış (P<0.001) gözlemlendi. CCl₄ uygulanması karaciğer MDA düzeyini önemli düzeyde artırırken (P<0.001), NÇY'nin uygulamaları istatistiksel olarak önemli etkilemedi. Sonuç olarak; CCl₄ ile birlikte NÇY verilen deney gruplarında karaciğer hasarına karşı histopatolojik değişiklikler üzerinde olumlu etkisi gözlenmemesine karşın, bazı biyokimyasal değerleri kontrol grubu değerlerine yaklaştırdığından, kısmen iyileştirici bir etkisinin olabileceği, ancak bu iyileşmenin karaciğer dokusundaki hasara yansımadağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Histopatoloji, immunhistokimya, karbon tetraklorür, nar çekirdeği yağı, rat

The Effects of Pomegranate Seed Oil on Acute Liver Damage Induced Carbon Tetrachloride in Rats and Determination of Hepatic Apoptosis and Caspase Activity

Summary: In this study, the protective effect of pomegranate seed oil (PSO) on liver tissue lesions in rats induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in acute liver injury, caspase activations in cellular apoptosis, serum Alanine Amino Transferase (ALT) activity, triglyceride, total protein, albumin, total cholesterol levels, and liver malondialdehyde (MDA) levels were evaluated. Thirty-two rats were divided into four groups as 8 rats in each group. The first group was determined as control. The second group was given 2 ml/kg/body-weight PSO gavage daily for 4 weeks. In the third group, 1.0 ml/kg/body-weight of two doses of CCl₄ diluted 1:1 with corn oil was injected intraperitoneally at 3 days intervals in the first week. The fourth group received 2 ml/kg/body-weight PSO every day for 4 weeks by gavage and 2 doses intraperitoneally 1 ml/kg/body-weight, diluted CCl₄ at 3 days intervals in the first week. While normal liver tissue structure was observed in the control groups; In the CCl₄ group, intense macro and microvesicular steatosis of hepatocytes, mononuclear cell infiltration areas mostly composed of lymphocytes in the portal region and parenchyma and necrotic changes were observed. Histopathological changes in PSO applications were partially decreased compared to the CCl₄ group, while caspase 3 and 9 activity decreased to a limited number. ALT activity increased with CCl₄ and decreased with PSO application (P<0.05) and increased serum total protein values (P<0.001). While the administration of CCl₄ significantly increased liver MDA levels (P<0.001), it was not significantly affected by the application of PSO. As a result; although there was no positive effect on histopathological changes against liver damage in experimental groups given PSO with CCl₄ since it brings the biochemical values closer to the control group values, it is thought that it may have a partially curative effect, but this improvement does not reflect the damage in liver tissue.

Key words: Carbon tetrachloride, histopathology, immunohistochemistry, pomegranate seed oil, rat

Geliş Tarihi/Submission Date : 07.01.2020
Kabul Tarihi/Accepted Date : 09.06.2020

*Bu çalışma "Ratlarda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Akut ve Kronik Karaciğer Hasarı Üzerine Keten Tohumu ve Nar Çekirdeği Yağının Etkisi ve Kaspaz Aktivitesi ile Hepatik Apoptozisin Belirlenmesi" isimli doktora tezinin bir kısmından özetlenmiş ve Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2016-6790 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Giriş

Akut ve kronik hepatotoksisite oluşturmak amacıyla kullanılan CCl₄'ün toksisitesi, oksidatif stres ve bunu takiben ortaya çıkan serbest radikallerle oluştuğu

bilinmektedir (Recknagel ve ark., 1989). Oluşan serbest radikal türevleri, hücre membranındaki doymamış yağ asitlerine etki ederek lipid peroksidasyonu oluşturarak etki göstermektedirler (Basu, 2003; Recknagel ve ark., 1989).

Doğal antioksidantların en önemli gruplarını oluşturan fenolik maddeler; flavonoidler, sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve fenolik asitlerdir (Moure ve ark., 2001; Naczek ve Shahidi, 2004). Lipid oksidasyonun geciktirilmesi bakımından biberiye, adaçayı, kekik, keten tohumu yağı, sarımsak, zeytin yaprağı, nar çekirdeği ve çay ekstraktları bileşimlerdeki fenolik bileşiklerden dolayı doğal antioksidan olarak kullanılmaktadırlar (Namiki, 1990). Günümüzde halk hekimliğinde hastalıklardan korunmak için, nar (*Punica granatum*) orta doğudaki birçok kültürde kullanılmaktadır (Gurib-Fakim, 2006). Nar suyunun, kabuğunun ve yağının, değişik mekanizmalarla çok sayıda terapötik yarar sağlaması ile birlikte birçok araştırmacı hücre siklusunu, invazyon ve anjiyogenezi engelleyerek antikarsinojen, antioksidan ve anti-inflamatuvar özelliklere odaklanmıştır (Lansky ve Newman, 2007). Nar suyundaki temel antioksidanlardan fenolik yapıdaki hidrolize edilebilir antosiyaninler, polifenoller, kateşinler, gallik ve ellagik asitler olup, bu antioksidanlar nitrik oksidin oksidatif yıkımını önleyerek etki ederken, anti-inflamatuvar etkilerinin de olduğu görülmüştür (Noda ve ark., 2002).

Bu çalışmada, karbon tetraklorür (CCl_4) ile akut karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda, Nar Çekirdeği Yağı (*Punica granatum Oleum*)'nın (NÇY) karaciğer dokusunda oluşabilecek lezyonlar üzerine koruyucu etkisi, hücresel apoptozun immunohistokimyasal yöntemle [anti kaspaz 3 (aktif), 8 ve 9 antikolları] değerlendirilmesi ve serum Alanin Amino Transferaz (ALT) aktivitesi, trigliserit, total protein, albümin ve kolesterol düzeyleri ile karaciğer Malondialdehit (MDA) düzeylerinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada kullanılan nar çekirdeği yağı (NÇY), ticari olarak BÜKAŞ firmasından temin edilmiştir. Araştırma için Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Komitesinden 13.01.2016 tarihinde 16/008 sayılı onay alındı. Çalışmada Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)'nden temin edilen 200-250g ağırlığında, 32 adet Wistar albino rat kullanıldı. Her grupta 8 hayvan olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Çalışmada kullandığımız karbon tetraklorür dozunu Gram Yaman ve ark., (2018)'nin çalışmasına göre 1.0 ml/kg/canlı ağırlık CCl_4 olarak belirlenirken, NÇY dozları ise Melo ve ark., (2015) ve Sarıca ve Liman (2016)'nin çalışmalarına göre 2 ml/kg/canlı ağırlık dozunda belirlendi. İlk grup kontrol olarak belirlendi ve % 0.9 NaCl (1ml/kg/canlı ağırlık); ikinci gruba 4 hafta her gün sırası ile 2 ml/kg/canlı ağırlık dozunda

NÇY gavaj ile verildi. Üçüncü gruba 1:1 oranında mısır yağı ile dilüe edilen 1.0 ml/kg/canlı ağırlık iki doz CCl_4 ilk hafta 3 gün ara ile intraperitoneal (ip) olarak enjekte edildi. Dördüncü gruba 2 ml/kg/canlı ağırlık dozunda NÇY 4 hafta her gün, gavaj ile verilirken ilk hafta 3 gün ara ile 2 doz intraperitoneal (ip) 1 ml/kg/canlı ağırlık, 1:1 oranında mısır yağı ile dilüe edilen CCl_4 uygulandı. Çalışma gruplarındaki ratların son uygulamadan 24 saat sonra intramuskuler 80 mg/kg ketamin (alfamine, 100 mg/ml, Ata-Fen) ve intraperitoneal 12 mg/kg ksilazin (alfazyne, 20 mg/ml, Ata-Fen) (Green ve ark., 1981) ile anestezisi sağlandıktan sonra göğüs ve karın boşlukları açılıp, intrakardiyak kan örnekleri antikoagülanlı ve antikoagülanlı tüplere alınarak nekropsileri yapıldı. Alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek plazma ve serumları ayrıldı. Alınan tüm doku örnekleri ışık mikroskopik incelemeler için % 10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonuna konuldu (Luna, 1968). Karaciğer dokusunun bir kısmı MDA belirlenmesi amacıyla çalışma gününe kadar $-80^{\circ}C$ 'de saklandı. Ayrılan plazma ve serumlar analiz için $-20^{\circ}C$ 'de saklandı. Serum ALT aktivitesi, trigliserit, total protein, albümin ve kolesterol düzeyleri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı, Klinik Biyokimya bölümünde Roche Cobas 8000 marka otoanalizatörde ticari kitler (Roche Cobas Kit-İsviçre) kullanılarak belirlendi. Karaciğer dokusu MDA düzeyleri ticari kit (Cayman, USA) kullanılarak ELISA cihazında (μ Quant Bio-Tek) belirlendi. Doku takip işlemleri tamamlanan karaciğer ait doku örnekleri parafine gömüldü. Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom yardımıyla 5- μ m kalınlığında kesitler lamlara alındı. Rutin Hematoksilen-Eosin (HxE) ile boyandı (Luna, 1968) Dokulardaki kaspaz aktivitesini göstermek için Streptavidin Biotin Kompleks Peroksidaz (ABC-P) tekniği, ticari kitle (Zymed, Histostain Plus Kit, California, USA) öngörülen standart prosedüre göre yapıldı. Primer antikor olarak anti caspase-3 (aktif) (Novus NB100-56113) (sulandırma oranı 1/2000), anti caspase-8 (Abcam ab25901) (sulandırma oranı 1/100) ile anti caspase-9 (Abcam ab25758) (sulandırma oranı 1/100) kullanıldı. Negatif kontrol olarak dokulara PBS (pH 7.4), pozitif kontrol olarak primer antikolların üretici firmalarının önerdiği kontrol dokularına primer antikollar uygulandı. Pozitiflik DAB kromojen ile tespit edildi. Zemin için Mayer Hematoksilen kullanıldı. Yağ boyası için % 10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonunda saklanan karaciğer dokuları, Osmium tetroksit (OsO_4) solüsyonuna aktarıldı. 8 saat bu solüsyonda bekletilerek yağ dokusunun tespit olması sağlandıktan sonra rutin doku takibi işlemlerinden geçirilerek HxE boyama yapıldı (Luna, 1968). Hematoksilen-Eosin ile boyanan kesitlerde hepatositlerde yağlanma, yangı, nekroz ve fibrozis semikantitatif olarak değerlendirildi. Semikantitatif yöntemde, her karaciğer için her bir kesitte 10 farklı alanda 10'luk ve 20'lik objektifte sayılıp sözü edilen her bir hasar parametresi ikiye patolojik tarafından ortalama değer alınarak

skorlandı ve yüzdelik değerler hesaplandı. Yağlanma eğer karaciğer hücrelerinin %33'ünden az ise 1 (hafif), %33-66 arası ise 2 (orta) ve %66'dan fazla ise 3 (şiddetli) olarak kabul edildi. İnflamasyon, nekroz ve fibrozis 0-3 arasında derecelendirildi (yok=0, hafif=1, orta=2, şiddetli=3). Biyokimyasal verilerin istatistiki analizleri ve karaciğer yangı yağlanma nekroz ve fibrozis skor değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığına Kruskal Wall's test, farklılığın önemli çıktığı durumlarda Bonferoni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile yapıldı.

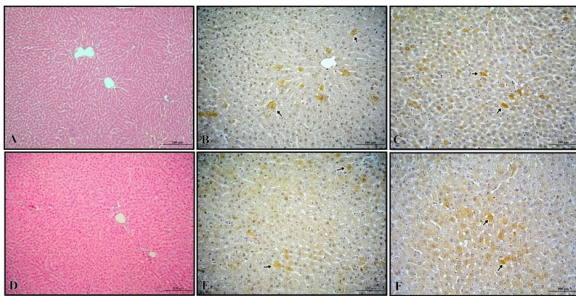
Bulgular

Klinik bulgular

Çalışmada; kontrol ve NÇY gruplarındaki ratlarda herhangi bir klinik bulgu görülmezken, CCl₄ ve CCl₄+NÇY gruplarındaki ratlarda en belirgin olarak halsizlik, iştahsızlık, kilo kaybı, sendeleyerek yürüme ve aşırı tükürük salgısı gibi klinik bulgular gözlemlendi.

Histopatolojik ve immunohistokimyasal bulgular

Kontrol (Grup 1) ve NÇY (Grup 2) grupları; ratların histopatolojik muayenesinde karaciğer doku örneklerinin normal yapıda oldukları görüldü (Şekil 1 A,D). Aynı doku kesitlerine osmium tetroksit ile yapılan boyamada hepatositlerde yağ belirlenemedi. Gruplara ait karaciğer doku kesitlerinden yapılan histolojik hasar skorlamasında; fibrozis, yağlanma, yangı ve nekroz parametreleri açısından hasar skoru sıfırdı (Tablo 1). Karaciğerlerinden hazırlanan doku kesitlerinde Kaspaz 8'de boyanma negatifti. Ancak normal apoptoza maruz kalan az sayıda hepatositte kaspaz 3 ve kaspaz 9'da pozitiflik tespit edildi. Pozitif hücrelerde sitoplazma kahverengi boyanmış olduğu görüldü (Şekil 1 B,C,E,F)



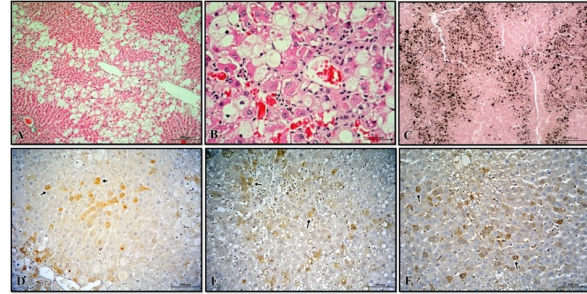
Şekil 1. A. Kontrol grubu, D. Nar çekirdeği yağ grubu, karaciğerlerin normal histolojik görünümü. Karaciğer, Hx E, x100. B. Kontrol grubu, E. Nar çekirdeği yağ grubu, hepatositlerin kaspaz 3 pozitif görünümü (oklar). ABC-P, x200. C. Kontrol grubu, F. Nar çekirdeği yağ grubu, hepatositlerin kaspaz 9 pozitif görünümü (oklar). ABC-P, x200

Karbon tetraklorür grubu (Grup 3); karaciğer doku kesitlerinin histopatolojik incelemesinde hepatositlerde yoğun makro ve mikroveziküler yağ vakuelleri görüldü (Şekil 2A). Bu vakuoller parankimdeki hepa-

tositlerin çoğunda saptandı. Bu alanlarda remark kordonları yapısı bozulmuştu. Özellikle portal bölgelere yakın alanlarda, lenfosit zengin mononükleer hücre infiltrasyonları ile kupffer hücrelerinde sayıca artış ve fokal kanama alanları görülürken (Şekil 2B), seyrek olarak benzer hücre infiltrasyonlarına yağlanma alanlarının periferinde ve aynı zamanda homojen bir görünüm göstermediği için tam olarak sınıflandırmayan geniş nekrotik alanlarda da dikkati çekmiştir. Nekrotik alanların tüm parankime yayıldığı ve pembe homojen bir kitleye dönüştüğü görülmüştür. Bu alanlarda hepatositlerin stoplazmalarında mikroveziküler yağ vakuelleri belirgin olarak dikkati çekmekteydi. Bu gruba ait hasar skorunun kontrol ve NÇY gruplarından şiddetli ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Tablo 1).

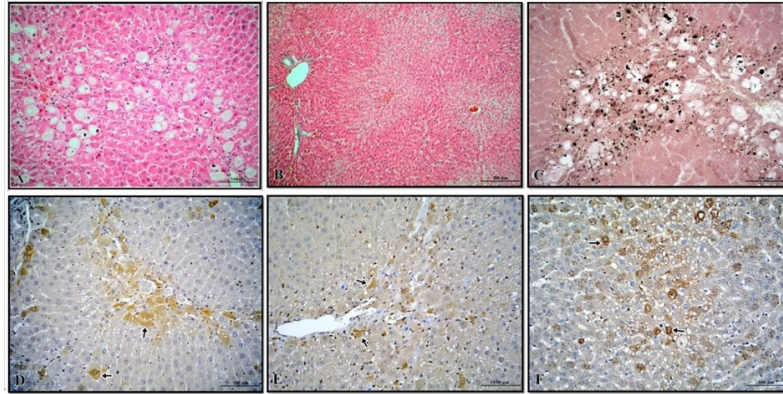
Karaciğer doku kesitlerine yağ boyası (Osmium tetroksit method for fat) ile hepatosit sitoplazmalarında makro-mikro yağ vakuellerinin siyah renkte boyandığı dikkati çekti (Şekil 2C).

Karaciğer doku kesitlerinin immunhistokimyasal değerlendirilmesinde; yağ vakuelleri bulunan hepatositlerin periferinde kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 immunpozitif hepatositler tespit edildi. Pozitif hücrelerde hepatosit sitoplazmalarının kahverengi boyandığı gözlemlendi (Şekil 2 D,E,F).



Şekil 2. A-B. Karbon tetraklorür grubu ratların hepatositlerinde yoğun makro ve mikro veziküler yağ vakuelleri, nekrotik alanlarda lenfosit zengin mononükleer hücre infiltrasyonu ile kupffer hücrelerinde sayıca artış ve fokal kanama alanlarının görünümü. Karaciğer, Hx E, x100, x400. C. Hepatosit sitoplazmalarında makro mikro yağ vakuellerinin siyah renkte görünümü. Karaciğer, (OsO₄ fikse edilmiş) Hx E, x100. D. Hepatositlerde kaspaz 3 pozitif, E. Hepatositlerde kaspaz 8 pozitif, F. Hepatositlerde kaspaz 9 pozitif görünümü (oklar). ABC-P, x200

Karbon tetraklorür+nar çekirdeği yağ grubu (Grup 4); karaciğer dokularının histolojik incelemesinde iki farklı lezyon dikkati çekti. İki CCl₄ ile birbir örtüşen görüntü idi. Bu grupta yine hepatositlerde yoğun makro ve mikroveziküler yağ vakuelleri görüldü. Bu vakuoller parankimdeki hepatositlerin çoğunda saptandı (Şekil 3A). Özellikle yağlanma bölgelerinde daha yoğun olmak üzere tüm parankim dokuda lenfosit zengin mononükleer hücre infiltrasyon alanları görüldü. Bu alanlarda damarlar hiperemikti. İkinci görüntü-



Şekil 3. A. Karbon tetraklorür+NÇY grubu ratlarda, karaciğerde yağlanmanın görünümü. B. Hepatositlerde daha küçük yağ vakuelleri ve parankimde geniş nekroz alanlarının görünümü. Karaciğer, Hx E, x200, x100. C. Hepatosit sitoplazmalarında makro mikro yağ vakuellerinin siyah renkte görünümü. Karaciğer, (OsO₄ fikse edilmiş) Hx E, x200. D. Hepatositlerde kaspaz 3 pozitif, E. Hepatositlerde kaspaz 8 pozitif, F. Hepatositlerde kaspaz 9 pozitif görünümü (oklar). ABC-P, x200

de ise lezyon şiddetinde herhangi bir azalma olmaksızın yağ vakuelleri daha küçük olup, parankimde net olarak sınırları belli olmayan geniş nekroz alanları içerisinde yer almaktaydı (Şekil 3B). Nekroz alanları içerisinde lenfosit zengin mononükleer hücre infiltrasyon alanları dikkati çekti. Bu alanlarda damarlarda hiperemi daha belirgindi. Bu gruba ait hasar skorunun kontrol ve NÇY gruplarından şiddetli ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu, CCl₄ grubu ile benzer olduğu görüldü (Tablo 1).

Karaciğer kesitlerine yağ boyası ile makro-mikro yağ vakuellerinin olduğu alanlarda yağın siyah renkte boyandığı dikkati çekti (Şekil 3C).

Karaciğer dokularının immunhistokimyasal incelemesinde; yağ vakuelleri bulunan hepatositler ve sentriasiner venlerin periferindeki hepatositlerde ve bu bölgedeki damar çevrelerinde kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 immunpozitiflik tespit edildi. Pozitif hücrelerde sitoplazmanın kahverengi boyandığı dikkati çekti (Şekil 3D,E,F).

Biyokimyasal bulguları

Çalışmada gruplara ait serumdan ALT aktivitesi, trigliserit, total protein, albümin ve kolesterol ile karaciğer dokusundan MDA aktiviteleri düzeyleri Tablo 2'de verildi.

Kontrol ve NÇY grupları arasında serum ALT aktivitesi yönünden istatistiki anlamda bir fark belirlenmedi. Karbon tetraklorür uygulanan grupta karaciğer hasarına bağlı olarak önemli düzeyde artan serum ALT aktivitesi, NÇY'nın uygulaması ile önemli düzeyde düşüş (P<0.05) göstermiş olup, normal değerlere döndü (Tablo 2). Karaciğer hasarı oluşturulan hayvanlarda NÇY uygulaması serum total protein değerlerinde azalmaya neden oldu (P<0.001). Gruplar arasında serum albümin değerleri yönünden istatistiki önemde bir fark saptanmadı (P>0.05). Karbon tetraklorür uygulaması ile oluşan karaciğer hasarına bağlı olarak önemli düzeyde artış gösteren serum total kolesterol düzeyleri (P<0.01) NÇY uygulamasından etkilenmedi. Karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda serum trigliserit düzeyleri önemli düzeyde (P<0.01)

Tablo 1. Akut deneme gruplarına ait doku hasar parametre skorlarının istatistiksel önem kontrolü

Gruplar	CCl ₄ (N=8)	Medyan(%25; %75 Yüzdalık)			İstatistik Önem Kontrolü (Kruskal Wallis Test)
		KONTROL (N=8)	NÇY (N=8)	NÇY+CCl ₄ (N=8)	
Yangı	2.0 ^b (1.0-3.0)	0 ^a (0-0)	0 ^a (0-0)	2.0 ^b (1.75-3.0)	P<0.001
Yağlanma	3.5 ^b (3.0-4.0)	0 ^a (0-0)	0 ^a (0-0)	3.5 ^b (3.0-4.0)	P<0.001
Nekroz	3.0 ^b (2.75-3.00)	0 ^a (0-0)	0 ^a (0-0)	2.0 ^b (1.75-2.25)	P<0.001
Fibrozis	2.0 ^b (2.0-2.25)	0 ^a (0-0)	0 ^a (0-0)	1.0 ^b (1.0-1.25)	P<0.001

^{a-b}: Her satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir.

Tablo 2. Akut karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda kontrol ve deneme gruplarının serum biyokimyasal parametreleri

Gruplar	Medyan (%25; %75 Yüzdellik)				İstatistik Önem Kont- rolü (Kruskal Wallis Testi)
	KONTROL (N=8)	CCl ₄ (N=8)	NÇY (N=8)	NÇY+CCl ₄ (N=8)	
ALT(U/L)	68.0 ^a (65.0;81.5)	103.0 ^b (69.5;190.5)	64.0 ^a (59.0;68.0)	65.0 ^a (59.0;126.0)	P<0.05
Total Protein(g/dL)	6.4 ^b (6.1;6.5)	5.7 ^a (5.6;5.9)	6.6 ^b (6.4;6.8)	6.4 ^b (6.0;6.5)	P<0.001
Albümin(g/dL)	4.0 (3.9;4.1)	4.1 (3.9;4.2)	4.1 (4.0-4.3)	3.9 (3.7-4.0)	P>0.05
Total kolesterol (mg/dL)	66.0 ^a 58.5;71.0	73.0 ^b 72.5; 77.2	69.5 ^a 64.0;76.0	72.0 ^b 68.25;80.50	P<0.01
Trigliserit (mg/dL)	95.5 ^a (72.7; 107.5)	220.0 ^b (107.5; 239.0)	97.0 ^a (67.5;130.5)	128.5 ^b (95.0; 151.0)	P<0.01
MDA (µmol/mg protein)	21.6 ^a (20.1-23.4)	35.4 ^b (24.3-38.3)	22.2 ^a (19.5-24.3)	25.8 ^b (25.3-28.3)	P<0.001

^{a-b}: Her satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir.

artış gösterdi. Bu hayvanlara NÇY uygulanması, artmış trigliserit düzeylerini sayısal olarak düşürdü (Tablo 2).

Karaciğer MDA düzeyleri yönünden kontrol ve NÇY grupları arasında istatistiki anlamda bir fark saptanmadı. Karbon tetraklorür uygulanması karaciğer MDA düzeylerini kontrol gruplarına göre önemli düzeyde artırdı (P<0.001), ancak bu artışlar NÇY'nin akut uygulamalarından istatistiki önemde etkilenmedi (Tablo 2).

Tartışma ve Sonuç

Antioksidan içerikli bitkisel kaynaklı bileşiklerin toksik ve yan etkilerinin az olmasından dolayı, farklı kimyasal maddeler ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı karaciğeri koruyucu etkilerinin belirlenmesi amacıyla, hayvan modellerinde yapılan deneysel çalışmalar popüler hale gelmiştir (Parajuli ve ark., 2013; Schinella ve ark., 2010).

Ratlarda karaciğer hasarı oluşturmak amacıyla CCl₄'ün akut uygulandığı çalışmalarda (Ali ve ark., 2010; Ravikumar ve Gnanadesigan, 2011) karaciğer kesitlerinde hepatosit sitoplazmalarında yağ vakuol oluşumları, remark kordonlarının bozulmasına bağlı interstisyel ödem, V. centralis'lerde ve sinüzoidal alanlarda konjesyon, fokal nekroz, yangı hücre infiltrasyonu şekillendiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da CCl₄'ün ilk hafta iki doz halinde 3 gün ara ile 1 ml/kg intraperitoneal yolla uygulanması sonucunda karaciğerde sentrilobüler ve parankimde net olarak sınıflandırılmayan geniş nekroz alanları, çoğunluğu lenfosit olan mononükleer hücre infiltrasyonları ve özellikle

sentrilobüler bölgede daha yoğun olmak kaydıyla tüm parankimde hepatositlerde büyüklükleri farklı, keskin kenarlı yuvarlak yağ vakuollerinin gözlenmesi, CCl₄'ün farklı dozları kullanılarak akut karaciğer hasarı oluşturan yukarıdaki araştırmacıların (Ali ve ark., 2010; Ravikumar ve Gnanadesigan, 2011) bulguları ile birebir örtüşmüştür. Akut karaciğer hasarı oluşturulan ve oluşan hasarın nar çekirdeği yağı (Gram ve ark., 2018; Melo ve ark., 2015) nar çekirdeği ekstresi (Yang ve ark., 2011) nar kabuğu ekstresi (Osman ve ark., 2011) ve nar suyunun (Shaban ve ark., 2014) iyileştirici etkisini araştırmış çalışmalarda vardır. Melo ve ark. (2015) ve Gram ve ark. (2018) karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturup, iyileştirmek amacıyla nar çekirdeği yağı verdiği grupta hafif ve orta derecede mikro ve makro vakuoller gözlenirken, ortalarında nötrofil infiltrasyonu ve kanama odakları bulunan nekrozları bildirmişlerdir. Karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda, iyileştirmek amacıyla Yang ve ark. (2011) nar çekirdeği ekstraktı vermiş, yağ vakuollerinin ve yangı hücrelerinin sayısının azaldığını bildirmişlerdir. Nar kabuğu ekstresi veren araştırmacılar Osman ve ark. (2011) da sentriasiner hepatositlerde oluşan vakuoller dejenerasyon, steatozis ve nekroz ile bu alanlardaki fokal mononükleer yangısal hücre infiltrasyonlarının şiddetinin azaldığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise CCl₄+NÇY grubunda karaciğer lezyonlarından makro-mikro veziküler yağ vakuol oluşumları çoğunluğu lenfosit olan mononükleer hücre infiltrasyonları ve nekroz alanları ile remark kordonlarının yapısının bozulması, damarlarda hiperemi gibi bozukluklar CCl₄ grubundakine benzerlik göstermiştir. Benzer şekilde bazı çalışmalarda (Gram ve ark., 2018; Melo ve ark.,

2015) nar çekirdeği yağının iyileştirici etki gösterip göstermediği tam olarak ortaya konulamamıştır. Ancak sunulan çalışmada karaciğer hasarının nar çekirdeği yağının verilmesi ile tam olarak düzelmediği görülmüştür.

Karbon tetraklorür karaciğer de nekrozu tetiklese de, çoğunlukla hepatositlerdeki mitokondriyal fosfolipid tabakasını yok edip kaspaz 3'e bağlı apoptozu tetiklemektedir (Domitrović ve ark., 2013; Tao ve ark., 2012). Ratlarda karaciğer hasarı oluşturmak amacıyla CCl₄'ün uygulanan in vitro ve in vivo çalışmalarda, karaciğer hücrelerinde apoptozu belirlemek için yapılan kaspaz aktivitesini içeren immunohistokimyasal bulgular mevcuttur (Chan ve ark., 2014; Domitrović ve ark., 2013; Liu ve ark., 2014; Tao ve ark., 2012; Xie ve ark., 2015). Bu çalışmalardan; Domitrović ve ark. (2013), Liu ve ark. (2014), Chan ve ark. (2014) ve Xie ve ark. (2015) kaspaz 3 aktivitesinin arttığını, Liu ve ark. (2014) çalışmasında kaspaz 8 aktivitesinin herhangi bir değişiklik görmediğini, Chan ve ark. (2014) ve Xie ve ark. (2015) ise kaspaz 8 aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca Liu ve ark. (2014) ve Xie ve ark. (2015) çalışmalarında kaspaz 9 aktivitesinde de artış görüldüğünü ifade etmişlerdir. Araştırmacıların sonuçlarında CCl₄'ün neden olduğu aşırı reaktif oksijen türevleri oluşumu; endojen antioksidan enzimlerini tüketmekte ve kaspaz 3, 8 ve 9 gibi enzimlerin aktif olarak hepatosit apoptozisini tetiklediğini, bu durumun CCl₄ toksikasyonunda hem instrinsik hem de ekstrinsik yolu kullanarak hepatositlere apoptoza götürdüğü ve yıkımı gerçekleştirdiği bizim çalışmamızda da elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Karaciğer hasarı oluşturma da CCl₄'ün ve farklı toksik maddelerin uygulandığı, nar çekirdeği ekstraktı (İbrahim ve ark., 2016) ve nar suyunun (Shaban ve ark., 2014) iyileştirme ve apoptozun tetiklenmesindeki engelleme etkisini araştıran çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda İbrahim ve ark. (2016), CCl₄ uyguladığı gruplarda kaspaz 3 pozitif hepatositlerin kontrol grubuna göre sayısı yoğun şekilde artarken, CCl₄ ile birlikte nar çekirdeği ekstresi verilen gruptaki pozitif hepatosit sayısı yoğunluğu CCl₄ grubuna göre hafif bir azalma gösterdiğini, Shaban ve ark. (2014) diethylnitrosamine ve phenobarbital ile karaciğer hasarı oluşturup, iyileştirmek amacıyla nar suyu uyguladığı gruplardaki kaspaz 3 aktivitesini, kontrol grubu seviyelerine indirdiğini, bildirmişlerdir. Ancak her iki yazar da apoptoza giden hepatositlerde kaspaz 8 ve 9 ile ilgili herhangi bir veri bildirmemişlerdir. Sunulan çalışmada da CCl₄ toksikasyonu ile ilgili akut karaciğer yıkım aşamasında hepatositlerde gözlenen apoptoz kaspaz 3, 8, 9 da immun-pozitif tespit edilirken, nar çekirdeği yağı uygulamasıyla kaspaz 3, 8, 9'daki apoptoza giden immun-pozitif hepatosit yoğunluğunun kısmen azaldığı görülmüştür.

Karbon tetraklorür ile oluşturulan akut (Kumar ve ark., 2009; Sumalatha ve ark., 2016) çalışmalarda oluşan

karaciğer hepatosit hasarına bağlı hücre membran permeabilitesinin bozulmasıyla kan dolaşımına geçişleri artan ALT enziminin, serum aktivitelerinde anlamlı yükselmeler dikkati çekmektedir. Karaciğer hasarının karakteristik bulgusu olan protein düzeylerindeki azalmaları çalışmalarında bildiren araştırmacılar da vardır (Zeashan ve ark., 2008). Sunulan çalışmada araştırmacıların (Ali ve ark., 2010; Kumar ve ark., 2009) bulgularıyla uyumlu olarak CCl₄'e bağlı olarak görülen serum total protein ve albümin düzeylerindeki azalmaların, bu toksik maddenin endoplazmik retikulumdaki poliribozomları bozarak karaciğerde protein sentezini aksatmasından (Ali ve ark., 2010; Zeashan ve ark., 2008) kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir.

Hasarlı karaciğerin belirlenmesinde serum kolesterol düzeylerindeki artıştan da yararlanılabileceği bildirilmektedir. Karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturulan çalışmalarda (Botsoglou ve ark., 2009; Ravikumar ve Gnanadesigan, 2011) karaciğer hücre hasarı sonrasında kolesterolün dolaşıma geçmesi sebebiyle serumdaki düzeylerinin yükseldiği saptanmıştır. Sunulan çalışmada da yukarıdaki araştırmacıların (Botsoglou ve ark., 2009; Ravikumar ve Gnanadesigan, 2011) çalışmalarıyla uyumlu olarak akut CCl₄ ile oluşan karaciğer hasarında serum total kolesterol ve trigliserit düzeylerinde artış belirlenmiştir.

Malondialdehit lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak membran denatürasyonu ve peroksidasyona yol açan hidrojen peroksit ve reaktif oksijen türlerinin ortaya çıkmasına yol açar (Niki ve ark., 2005). Akut (Shenoy ve ark., 2001, Yehia ve ark., 2013) CCl₄ uygulamasıyla oluşturulan karaciğer hasarında araştırmacılar karaciğer MDA düzeylerinin arttığını bildirmişlerdir. Aynı şekilde sunulan çalışmada da akut olarak CCl₄ verilen ratlarda belirlenen karaciğer MDA düzeylerindeki artışlar, CCl₄'ün karaciğer endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom P450 enzimi aracılığıyla toksik karakterde CCl₃ ve CCl₃O₂ serbest radikallerine dönüşmesiyle oluşan lipid peroksidasyonunun sonucu şekillenen doku hasarı ve antioksidan savunma mekanizmasının yetersizliğinden (Shenoy ve ark., 2001) ileri gelebilir.

Karbon tetraklorür ile ratlarda oluşturulan akut karaciğer hasarının iyileştirilmesi amacıyla nar çekirdeği yağı verilerek yapılan çalışmalarda (Gram ve ark., 2018; Melo ve ark., 2015) toksisiteye bağlı olarak artan serum ALT aktivitesi ile MDA düzeylerinin anlamlı bir şekilde azaldığı (Gram ve ark., 2018; Melo ve ark., 2015), azalan serum total protein düzeylerinin de arttığı (Gram ve ark., 2018) bildirilmiştir. Diğer yandan Yehia ve ark. (2013) da CCl₄ ile oluşturduğu toksikasyonda nar suyunun, artan ALT aktivitesi ile MDA düzeylerini azalttığını tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada, CCl₄ (Gram ve ark., 2018; Melo ve ark., 2015; Yehia ve ark., 2013) ile karaciğer hasarı oluşturulan çeşitli araştırmacıların bulguları ile uyumlu olarak,

CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarına bağlı artış gösteren ALT enzim aktivitesi NÇY uygulanması ile önemli düzeyde düşmüştür (P<0,01), azalan serum total protein düzeyleri de Gram ve ark. (2018)'nin bulgularına benzer şekilde artmıştır. Ancak karaciğer MDA düzeyleri ile serum albümin, total kolesterol ve trigliserit düzeyleri NÇY uygulamasından etkilenmemiştir.

Sunulan çalışmada nar çekirdeği yağının akut CCl₄ toksikasyonu ile ilgili karaciğer hasarına iyileştirici yönde sınırlı etkisi gözlenmiştir. Karbon tetraklorür ve haricindeki diğer toksik materyaller ile yapılan toksikasyonlara karşı, nar kullanılan çalışmalarda (Shaban ve ark., 2014; Yang ve ark., 2011; Yehia ve ark., 2013) narın iyileştirme özelliği ile ilgili sonuçları bu konuda klasik bilgiler veren (Lansky ve Newman, 2007; Noda ve ark., 2002) çalışmalarla örtüşmektedir. Nar çekirdeği yağının içeriğindeki flavonoid ve fenolik bileşenlerinden ileri gelen antioksidan aktivitesine punisik asit başta olmak üzere, linoleik ve linolenik asit gibi doymamış yağ asitlerine bağlı olarak (Saha ve ark., 2012) NÇY uygulaması ile akut dönemde CCl₄'ün neden olduğu karaciğer hasarı sonucu artan serum ALT enzim aktivitesinin, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalması ile karaciğer hasarı sonucu azalan serum total protein düzeylerinin artmasının yanında, karaciğer MDA, serum albümin, total kolesterol ve trigliserit düzeylerinin etkilenmemesi karaciğer dokusundaki hasarın düzelmeye başladığını gösterdiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak: sunulan çalışmada kullanılan 2 ml/kg nar çekirdeği yağının, CCl₄ ile karaciğerde oluşturulan histopatolojik değişiklikler kısmen azaltırken, genel olarak incelenen biyokimyasal değerleri kontrol grubu değerlerine yaklaştırdığından, sınırlı bir iyileştirici etkisinin olabileceği, ancak bu iyileşmenin karaciğer dokusundaki hasara tam olarak yansımadağı düşünülmektedir. Nar çekirdeği yağının elde edilmesinde kullanılan bu bitkilerin kısımları (kabuk, meyve, çekirdek), elde edilen ürünlerin çeşidi (ekstrakt, yağ, su) ile yetiştikleri toprağın yapısı gibi etkenlere bağlı olarak içeriklerinin farklılığına, farklı işleme teknikleri ile hayvanların bireysel duyarlılıkları gibi birçok faktöre bağlı olarak değişebileceği düşünülmektedir. Nar çekirdeği yağı yağının farklı sürelerde ve herhangi bir yan etki oluşturmaksızın en iyi sonucu verecek farklı dozlarının kullanılarak dokular üzerine etkilerinin belirlenmesine yönelik yeni çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

Ali SA, Rizk MZ, Ibrahim NA, Abdallah MS, Sharara HM, Moustafa MM. Protective role of Juniperus phoenicea and Cupressus sempervirens against CCl₄. World J Gastrointest Pharmacol Ther 2010; 1 (6): 123-31.

Basu S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: Eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. Toxicology 2003; 189: 113-27.

Botsoglou NA, Taitzoglou IA, Botsoglou E, Zervos I, Kokoli A, Christaki E, Nikolaidis E. Effect of long-term dietary administration of oregano and rosemary on the antioxidant status of rat serum, liver, kidney and heart after carbon tetrachloride-induced oxidative stress. J Sci Food Agric 2009; 89: 1397-406.

Chan CC, Lee KC, Huang YH, Chou CK, Lin HC, Lee FY. Regulation by resveratrol of the cellular factors mediating liver damage and regeneration after acute toxic liver injury. J Gastroenterol Hepatol 2014; 29(3), 603-13.

Domitrović R, Škoda M, Marchesi VV, Cvijanović O, Pugel EP, Štefan MB. Rosmarinic acid ameliorates acute liver damage and fibrogenesis in carbon tetrachloride-intoxicated mice. Food Chem Toxicol 2013; 51: 370-8.

Gram DY, Atasever A, Eren M. Effect of pomegranate (Punica granatum) seed oil on carbon tetrachloride-induced acute and chronic hepatotoxicity in rats. J Pharmacogn Phytochem 2018; 10(2): 124-9.

Green Cj, Kneight J, Precious S, Simpkin S. Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: A 10 year experience. Lab Anim 1981; 15: 163-70.

Gurib-Fakim, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Mol Aspects Med 2006; 27(1): 1-93.

Ibrahim MAR, Okail HAM, Emam NMM. Ameliorative effects of pomegranate peel extract on hepatotoxicity Induced by carbon tetrachloride in mice. I J Res Stud Biosci 2016; 4(10): 23-31.

Kumar R, Kumar S, Patra A, Jayalakshmi S. Hepatoprotective activity of aerial parts of *Plumbago zeylanica* linn against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. Int J Pharmacy Pharmaceut Sci 2009; 1: 171-5.

Lansky EP, Newman RA. Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J Ethnopharmacol 2007; 109(2): 177-206.

Liu H, Wang Z, Nowicki MJ. Caspase-12 mediates carbon tetrachloride-induced hepatocyte apoptosis in mice. World J Gastroenterol 2014; 20(48): 18189-98.

Luna LG. Manual of Histologic Staining Methods; of the Armed Forces Institute of Pathology, New York

- Blakiston Division, McGraw-Hill, 1968; 34-75.
- Melo ILP, Silva AMO, Carvalho EBT, Yoshime LT, Mancini DAP, Mancini-Filho J. Effect of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed Oil on Markers of Oxidative Stress Induced by Carbon Tetra-chloride in Wistar Rats. *Int J Food Sci Nutr Diet* 2015; 5: 1-8.
- Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H, Parajó JC. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem* 2001; 72(2): 145-71.
- Naczek M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A* 2004; 1054(1): 95-111.
- Namiki M. Antioxidants/antimutagens in food. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1990; 29(4): 273-300.
- Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 668-76.
- Noda Y, Kaneyuki T, Mori A, Packer L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J Agric Food Chem* 2002; 50(1): 166-71.
- Osman M, Ahmed M, Mahfouz S, Elaby S. Biochemical studies on the hepatoprotective effects of pomegranate and guava ethanol extracts. *N Y Sci J* 2011; 4: 27-41.
- Parajuli DR, Park EJ, Che XH, Jiang WY, Kim YC, Sohn D, Lee S. PF2401-SF, standardized fraction of *Salvia miltiorrhiza*, induces apoptosis of activated hepatic stellate cells in vitro and in vivo. *Molecules* 2013; 18(2): 2122-34.
- Ravikumar S, Gnanadesigan M. Hepatoprotective and antioxidant activity of a mangrove plant *Lumnitzera racemosa*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2011; 1(5): 348-52.
- Recknagel RO, Glende EA JR, Dolak JA, Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Therapeut* 1989; 43: 139-54.
- Saha SS, Chakraborty A, Ghosh S, Ghosh M. Comparative study of hypocholesterolemic and hypolipidemic effects of conjugated linolenic acid isomers against induced biochemical perturbations and aberration in erythrocyte membrane fluidity. *Eur J Nutr* 2012; 51: 483-95.
- Sarıca ZS, Liman BC. Ratlarda Pentaklorofenol Zehirlenmesinde Nar Çekirdeği Yağının Lipid Peroksidasyonu ve Biyokimyasal Parametrelere Etkileri. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2016; 13(2): 109-119.
- Schinella G, Mosca S, Cienfuegos-Jovellanos E. Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. *Food Res Int* 2010; 43(6): 1614-23.
- Shaban NZ, El-Kersh MA, Bader-Eldin MM, Kato SA, Hamoda AF. Effect of *Punica granatum* (pomegranate) juice extract on healthy liver and hepatotoxicity induced by diethylnitrosamine and phenobarbital in male rats. *J Med Food* 2014; 17: 339-49.
- Shenoy KA, Somayaji SN, Bairy KL. Hepatoprotective effects of Ginkgo biloba against CCl₄-induced hepatic injury in rats. *Indian J Pharmacol* 2001; 33: 260-6.
- Sumalatha S, Padma D, Pai KSR, Kotian SR, Kumar N, Bhat KM. Hepatoprotective activity of aqueous extract of caesalpinia bonduc against CCl₄ induced chronic hepatotoxicity. *Int J Pharm Pharm Sci* 2016; 8(4): 207-11.
- Tao LL, Cheng YY, Ding D, Mei S, Xu JW, Yu J, Xu ZD. C/EBP- α ameliorates CCl₄-induced liver fibrosis in mice through promoting apoptosis of hepatic stellate cells with little apoptotic effect on hepatocytes in vitro and in vivo. *Apoptosis* 2012; 17(5): 492-502.
- Xie J, Liu J, Chen TM, Lan Q, Zhang QY, Liu B, Zhu RZ. Dihydromyricetin alleviates carbon tetrachloride-induced acute liver injury via JNK-dependent mechanism in mice. *World J Gastroenterol* 2015; 21(18): 5473-81.
- Yang LN, Fu ZX, Li MZ, Hu MY, Zhu MY, Zhou GY, Lin Q. Protective effect of pomegranate seed extracts on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *J Jilin Univ Med Ed* 2011; 5: 21.
- Yehia HM, Al Olayan EM, Elkhadragey MF. Hepatoprotective role of the pomegranate (*Punica granatum*) juice on carbon tetrachloride induced oxidative stress in rats. *Life Sci J* 2013; 10: 1534-44.
- Zeashan H, Amresh G, Singh S, Rao CV. Hepatoprotective activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. *Food Chem Toxicol* 2008; 46(11): 3417-21.