



Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Akut ve Kronik Karaciğer Hasarı Üzerine Biberiye Ekstraktının (*Rosmarinus officinalis*) Etkisi*

Duygu YAMAN¹, Ayhan ATASEVER¹

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

Özet: Bu çalışmada, karbon tetraklorür (CCl₄) ile akut ve kronik karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda biberiye ekstraktının (BE) histolojik yapı, bazı biyokimyasal parametreler ile lipid peroksidasyonu üzerine koruyucu etkileri belirlendi. Akut ve kronik dönemlerde, 40'ar adet (200-250 gr) Wistar albino ırkı rat, her birinde 10 hayvan olacak şekilde 4'er gruba ayrıldı. Akut çalışmada, birinci gruba (kontrol grubu) %0.9 NaCl (1.0 mL/kg), ikinci gruba 200mg/kg BE, üçüncü gruba CCl₄ (1.0 mL/kg) sadece ilk haftada iki kere, dördüncü gruba, ilk hafta iki kez CCl₄ ile eş zamanlı 200 mg/kg BE dört hafta verildi. Kronik çalışmada, birinci gruba (kontrol grubu) %0.9 NaCl (0,2 mL/kg), ikinci gruba 200 mg/kg BE, üçüncü gruba haftada iki kere 0.2 mL/kg CCl₄, dördüncü gruba, haftada iki kere 0.2 mL/kg CCl₄ ile eş zamanlı 200 mg/kg BE on iki hafta verildi. Akut ve kronik kontrol ve BE gruplarında normal doku yapısı gözlenirken; akut CCl₄ uygulananların hepatositlerinde yoğun makro ve mikroveziküler yağlanma, portal bölgede ve parankimde mononükleer hücre infiltrasyon alanları ile nekrotik değişiklikler görüldü. Kronik CCl₄ grubunda, akut bulgulara ilaveten portal bölgelerde ortadan şiddetliye ulaşan fibrozis ile lobulasyon formasyonları görüldü. Akut ve kronik karaciğer hasarı oluşturulan gruplara BE ilavesi histopatolojik lezyonları etkilemedi. Karbon tetraklorür uygulaması ile tüm biyokimyasal parametreler (AST, ALT, ALP, glikoz, trigliserid, total kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, total protein, albümin) değişti. Biberiye ekstraktı, akut dönemde düşen HDL-kolesterol düzeylerini artırırken, diğer parametrelerle, kronik dönemde de tüm parametreleri etkilemedi. Akut ve kronik uygulanan CCl₄, karaciğer MDA ve NO değerlerini arttırdı. Biberiye ekstraktı MDA ve NO değerlerini değiştirmedi. Sonuç olarak; CCl₄ ile oluşturulan akut ve kronik karaciğer hasarı üzerine 200 mg/kg BE ilavesinin herhangi bir etkisi görülmedi. Biberiye ekstraktının farklı sürelerde ve yan etki oluşturmaksızın en iyi sonucu verecek farklı dozlarda kullanılarak, etkilerinin belirlenmesine yönelik yeni araştırmalara ihtiyaç olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Biberiye ekstraktı, histopatoloji, karbon tetraklorür, rat

The Effects of Rosemary Extract (*Rosmarinus officinalis*) on Carbon Tetrachloride Induced Acute and Chronic Hepatic Damage

Summary: The present study evaluated protective role of rosemary extract (RE) on histological structure, some serum biochemical parameters and lipid peroxidation on chronic liver injury induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in rats. In acute and chronic period 40 Wistar-albino rats (200-250g) were divided into four groups of ten, for per period. In the acute study, the rats in the first group (control group), were administered with %0.9 NaCl (1mL/kg); second group was administered with 200mg/kg RE, third group was administered with CCl₄ (1mL/kg) twice in the first week, fourth group was administered with CCl₄ (1mL/kg) twice in the first week and simultaneously for 4 weeks 200mg/kg RE. In the chronic study, the rats in the first group (control group), were administered with %0.9 NaCl (0.2mL/kg); second group was administered with 200mg/kg RE, third group was administered with CCl₄ (0.2mL/kg) twice for 12 weeks, fourth group was administered with CCl₄ (0.2mL/kg) twice for 12 weeks and simultaneously with 200mg/kg RE. In case of acute and chronic control and RE group livers had normal architecture in the acute CCl₄ treated group, an intensive macro and microvesicular steatosis, mononuclear inflammatory cell infiltrations in portal area and parenchyma and necrotic alterations; in the chronic group additionally to acute findings mild to severe fibrosis with lobulation formation were observed. In acute and chronic groups RE administration did not affect the histopathological

lesions. Administration of CCl_4 , changed all biochemical parameters (AST, ALT, ALP, glucose, triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, total protein, albumin). In the acute and chronic periods of study, RE administration didn't have any effect on biochemical parameters except for HDL-cholesterol where it was elevated significantly in acute period. Carbon tetrachloride treatment increased the hepatic MDA and NO concentration in both acute and chronic groups. Rosemary extract did not alter MDA and NO concentrations induced by CCl_4 .

As a conclusion, 200mg/kg RE have no effect against liver damage induced by CCl_4 in acute and chronic periods. It concluded that further studies on the different durations and different doses without any side effect of RE are in need to point out their possible effects.

Key words: Carbon tetrachloride, histopathology, rosemary extract, rat

Giriş

Karaciğer, anatomik lokalizasyonu ve ortaya koyduğu önemli fonksiyonlar nedeniyle toksik maddelere en fazla maruz kalan ve pek çok etkenle hasara uğrayabilen bir organdır (1). Akut ve kronik hepatotoksisite oluşturmak amacıyla kullanılan CCl_4 'ün toksisitesi biyokimyasal ve hücre organelleri düzeyinde kendini gösterir (2,3). Bu hasarın, oksidatif stres ve bunu takiben ortaya çıkan serbest radikallerle oluştuğu bilinmektedir. Oluşan serbest radikal türevleri, hücre membranındaki doymamış yağ asitlerine etki ederek lipid peroksidasyonunu oluşturup karaciğerde hepatositlerin hücre membranlarını bozmak suretiyle etki göstermektedirler (4-6). Bununla birlikte karaciğer hasarının, aktive olmuş Kupffer hücrelerinden salınan proinflamatuvar mediatörlerin (nitrik oksit vb.) etkisiyle karaciğerdeki diğer hücrelerin (endotelial hücreler, uydu hücreleri ve hepatositler) aktive olmasına da bağlı olabileceği ileri sürülmektedir (7). Oksidatif hasarla ilişkilendirilen oksidatif stres, son yıllarda araştırmaların odağı konumundadır.

Bitkisel kaynaklı birçok ilacın, ucuz ve kolay ulaşılabilir olması, toksik ve yan etkilerinin

az olmasından dolayı farklı kimyasal maddeler ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı, antioksidan ve karaciğer koruyucu etkilerinin belirlenmesi amacıyla hayvan modellerinde yapılan deneysel çalışmalar 20. yüzyılda popüler hale gelmiştir (8). Yapılan çalışmalarda, BE'nin antioksidan ve serbest radikalleri tutucu etkisi olduğu bildirilmekte ve bu modellerin CCl_4 ile oluşan karaciğer hasarı üzerine koruyucu etkileri olabileceği düşünülmektedir (9-13).

Bu araştırmada karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda, çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilinen BE'nin, özellikle karaciğer dokusunda oluşabilecek lezyonlar üzerine ve ayrıca bazı serum biyokimyasal parametreler (aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP), glikoz, trigliserid, total kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, total protein, albümin) ile karaciğer lipid peroksidasyon düzeylerine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)'nden temin edilen 200-250g ağırlığında, 80 adet Wistar albino ırkı rat kullanıldı. Ratlar, her kafeste beş rat olacak şekilde, pelet yem ile *ad libitum* olarak beslenerek araştırma merkezinin sahip olduğu uygun şartlar altında

Geliş Tarihi / Submission Date : 16.06.2015

Kabul Tarihi / Accepted Date : 30.07.2015

*Bu çalışma "Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Akut ve Kronik Karaciğer Hasarı Üzerine Nar Çekirdeği Yağı (*Punica granatum*) ve Biberiye Ekstraktının (*Rosmarinus officinalis*) Etkisi" isimli doktora tezinin bir kısmından özetlenmiş ve ERÜBAP tarafından TSD-3828 no'lu proje ile desteklenmiştir.

[(kontrollü sıcaklık ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$), nem ($\%50\pm 5$), hava değişimi (saatte 12 devir), sıcaklık (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık)] barındırıldı. Akut ve kronik dönemlerde, 40'ar adet (200-250 gr) Wistar albino ırkı rat, her birinde 10 hayvan olacak şekilde 4'er gruba ayrıldı. Akut çalışmada, birinci gruba (kontrol grubu) $\%0.9$ NaCl (1.0mL/kg); ikinci gruba 200 mg/kg BE, üçüncü gruba CCl_4 (1.0 mL/kg) (Merck, Kat. No:102222) sadece ilk haftada iki kere; dördüncü gruba, ilk hafta iki kez CCl_4 ile eş zamanlı 200mg/kg BE dört hafta verildi. Kronik çalışmada, birinci gruba (kontrol grubu) $\%0.9$ NaCl (0.2 mL/kg); ikinci gruba 200 mg/kg BE, üçüncü gruba haftada iki kere 0.2 mL/kg CCl_4 , dördüncü gruba, haftada iki kere 0.2 mL/kg CCl_4 ile eş zamanlı 200 mg/kg BE on iki hafta verildi. Hayvanlara, aktif etken madde yüzdeleri $\%4$ karnosik asit, $\%5$ rozmarinik asit ve $\%6$ karnosol olarak bildirilen ve ticari olarak Biomesi Ar-Ge firmasından temin edilen BE ve $\%0.9$ NaCl çözeltisi gavaj yolu ile, CCl_4 de intraperitoneal (ip) olarak uygulandı. Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı tarafından 18.05.2011 tarih ve 11/59 nolu karar ile onaylandı.

Çalışma gruplarındaki ratlar son uygulamadan 24 saat sonra intramuskuler 80 mg/kg ketamin ve 12mg/kg ksilazin (14) ile ip anestezi sağlandıktan sonra servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Daha sonra ratların göğüs ve karın boşlukları açılıp, intrakardiyak kan örnekleri alınarak sistemik nekropsileri yapıldı. Tamponlu nötral formaldehit ile tespit edilen karaciğer ve diğer organlara (beyin, akciğer, kalp, böbrek, dalak, mide, ince ve kalın bağırsaklar) ait doku örnekleri 48 saat sonunda trimlemeyi takiben çeşme suyunda yıkandıktan sonra doku takibi yapıldı. Tüm organlara ait dokulardan hazırlanan parafin bloklardan mikrotomda 5 μm kalınlığında kesitler lamlara alındı. Hematoksilen-Eosin (HxE) ile boyandı (15). Kesitlerde hepatositlerde yağlanma, yangı, nekroz ve fibrozis semikantitatif olarak

değerlendirilerek karaciğer hasar skorlaması yapıldı ve grup içerisinde ortalama yüzdelik değerleri hesaplandı (16,17). Her bir grupta elde edilen değerler istatistiksel olarak değerlendirildi ve gruplar arasındaki önem kaydedildi.

Alınan kan örneklerinden 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek ayrılan serumlarda biyokimyasal analizler Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı, Klinik Biyokimya bölümünde Abbott-Architect marka otoanalizator ile yapıldı. Karaciğer doku protein düzeyi Lowry'nin metodunu (18) esas alan ve Miller tarafından modifiye edilmiş yöntemle (19), MDA düzeyleri Yoshioka ve arkadaşlarının (20) geliştirdiği yöntemle ve NO düzeyleri de Griess yöntemi esasına göre diazotizasyon yöntemiyle (21) belirlendi.

Kontrol ve deneme grupları arasında biyokimyasal ve lipid peroksidasyon parametrelerinin istatistiksel analizlerinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Karaciğer doku hasarı skor değerleri bakımından deneme ve kontrol grupları arasında farklılığın önem kontrolü Kruskal-Wallis testi ile yapıldı. İstatistiksel analizlerde SPSS 14.01 (Lisans no: 9869264) paket programı kullanıldı.

Bulgular

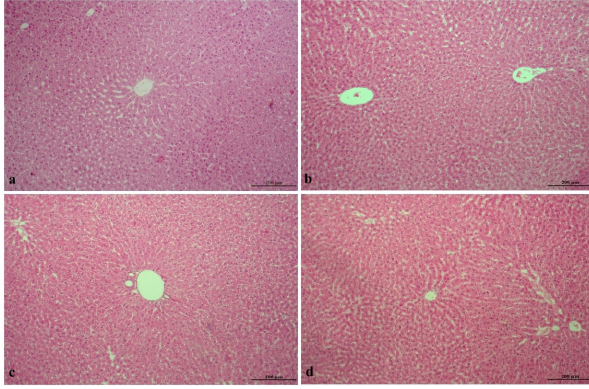
Klinik bulgular

Kontrol ve BE gruplarındaki ratlarda herhangi bir klinik bulgu görülmezken, CCl_4 ve CCl_4 +BE gruplarındakilerde halsizlik, kambur duruş, sendeleyerek yürüme, aşırı tükürük salgısı, pitozis, ataksi ve korneal opasite gibi klinik bulgular gözlemlendi.

Patolojik bulgular

Akut ve kronik kontrol ve BE grupları; Çalışma sonunda yapılan sistemik nekropsilerde ratların karaciğerlerinde makroskopik bir lezyona rastlanmadı. Karaciğer doku

örneklerinin histolojisinde normal yapıda oldukları görüldü (Şekil 1). Gruba ait karaciğer doku kesitlerinden yapılan histolojik hasar skorlamasında; fibrozis, yağlanma, yangı ve nekroz parametreleri açısından hasar skoru sıfırdı (Tablo 1). Alınan diğer dokuların makroskopik-histolojik değerlendirmesinde herhangi patolojik bir lezyon bulunmayıp normal yapıda oldukları görüldü.

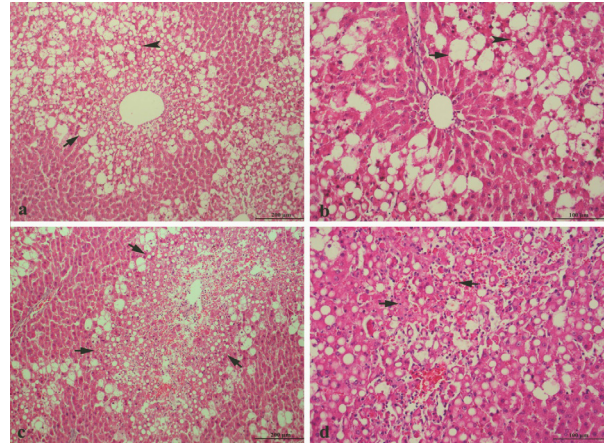


Şekil 1. Kontrol ve BE grubu karaciğer dokusunun histolojik görünümü. HxE.

- Akut kontrol grubu karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü, 200 μ m.
- Akut BE grubu karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü, 200 μ m.
- Kronik kontrol grubu karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü, 200 μ m.
- Kronik BE grubu karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü, HxE, 200 μ m.

Akut CCl_4 Grubu; Çalışma sonunda, yapılan sistemik nekropsilerde karaciğerlerin bazılarında koyu kırmızı, bazılarında ise gri-beyaz renk değişimleri dışında diğer organlarda makroskopik bir lezyona rastlanmadı. Gruba ait karaciğer dokularında hepatositlerde yoğun makro ve mikroveziküler yağ vakuelleri görüldü (Şekil 2a,b). Bu vakuoller parankimdeki hepatositlerin çoğunda saptandı. V. centralis periferinde hepatositlerdeki nekrotik değişiklikler ile alan pembe homojen bir kitleye dönüşmüştü (Şekil 2c). Özellikle

portal bölgelere yakın alanlarda, lenfositten zengin mononükleer hücre infiltrasyon alanları yer alırken, seyrek olarak bu durumun V. centralis çevresindeki nekrotik alanlarda ve tüm parankime yayıldığı dikkati çekti (Şekil 2d). Diğer dokuların histolojisinde patolojik bir lezyona rastlanmadı. Karaciğer doku kesitlerinde CCl_4 ' e bağlı olarak oluşan yağlanma, yangı ve nekroz parametreleri skorlandı. Bu gruba ait hasar skorunun kontrol ve BE gruplarından yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Tablo 1).

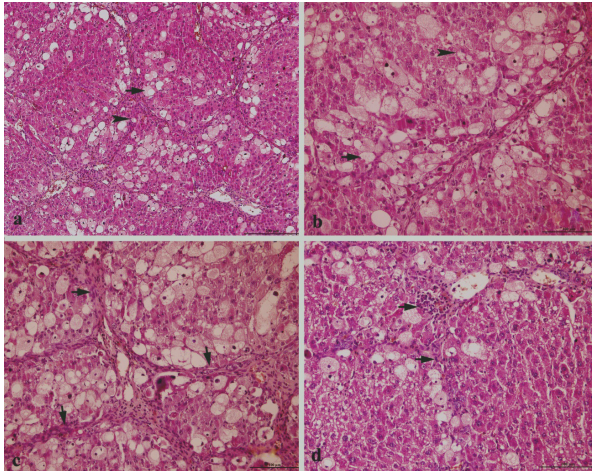


Şekil 2. CCl_4 grubu karaciğer dokusunun histolojik görünümü. HxE.

- Makro (ok) ve mikroveziküler (ok başı) yağ vakuollerinin görünümü, 200 μ m.
- Makro (ok) ve mikroveziküler (ok başı) yağ vakuollerinin görünümü, 100 μ m.
- Yaygın nekroz alanları (oklar), 200 μ m.
- Parankimde çoğunluğu lenfosit olan mononükleer hücre filtrasyon alanları (oklar), 100 μ m.

Kronik CCl_4 grubu; Çalışma sonunda, sistemik nekropsileri yapılan ratların karaciğerlerinin bazılarında koyu kırmızı, bazılarında ise gri-beyaz renk değişimleri dışında diğer organlarda makroskopik bir lezyona rastlanmadı. Histolojisinde özellikle portal bölgelerde ortadan şiddetliye ulaşan fibrozis alanlarının varlığı dikkati çekti.

Kronik parankim yıkımlanması sebebiyle yavaş gelişen fibrozisin portal aralıkları V. centralis'ler ile birleştirerek, klasik lobül yapısını bölerek lobulasyona yol açtığı görüldü (Şekil 3c). Hepatositlerde yoğun makro ve mikroveziküler şeklindeki yağ vakuolleri parankimdeki hepatositlerin çoğunda görüldü (Şekil 3a,b). Yağ vakuollerinin görüldüğü bölgelerde dikkati çeken bir diğer bulgu ise, yer yer yoğunlaşan mononükleer hücre infiltrasyonuydu (Şekil 3d). Özellikle portal bölgeye yakın alanlarda, lenfositten zengin mononükleer hücre infiltrasyon alanları yer alırken, seyrek olarak bu durumun V. centralis çevresindeki yağ vakuolleri arasında ve tüm parankime yayıldığı görüldü. V. centralis'lerin çevresinde kontrol grubuna göre belirgin bir bağ doku artışının olduğu gözlemlendi. Diğer dokuların histolojisinde patolojik bir lezyona rastlanmadı. Karaciğer doku kesitlerinde CCl₄' e bağlı olarak oluşan fibrozis, yağlanma ve yangı parametreleri skorlandı. Bu gruba ait hasar skorunun kontrol ve BE gruplarından yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Tablo 2).



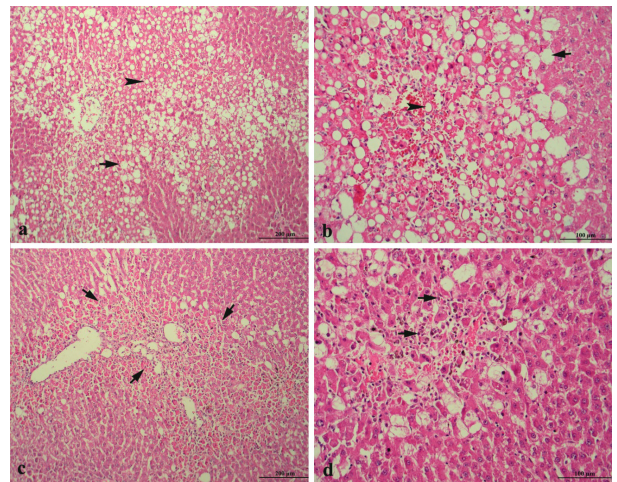
Şekil 3. CCl₄ grubu karaciğer dokusunun histolojik görünümü. HxE.

- a. Makro (ok) ve mikroveziküler (ok başı) yağ vakuollerinin görünümü, 200 µm.
b. Makro (ok) ve mikroveziküler (ok başı) yağ vakuollerinin görünümü, 100 µm.

c. Şekillenen lobulasyon formasyonu (okların sınırladığı alan), 100 µm.

d. Çoğunluğu lenfosit olan mononükleer hücre infiltrasyon alanları (oklar), 100 µm.

Akut CCl₄+BE grubu; Çalışma sonunda, sistemik nekropside sırasında karaciğerlerin bazılarında koyu kırmızı, bazılarında ise gri-beyaz renk değişimleri dışında diğer organlarda makroskopik bir lezyona rastlanmadı. Gruba ait karaciğer dokularının histolojisinde, mikro ve makroveziküler yağ vakuolleri, nekroz ve mononükleer hücre infiltrasyonları görüldü. Tüm parankimde hepatositler içinde irili ufaklı yağ vakuolleri saptandı (Şekil 4a,b). Vena centralis'lerin periferindeki bölgede hepatositlerdeki nekrotik değişiklikler dikkati çekti (Şekil 4c). Özellikle nekroz alanlarında olmak üzere parankimde içerisinde mononükleer hücre infiltrasyonu mevcuttu (Şekil 4d). Diğer dokuların histolojisinde herhangi patolojik bir lezyona rastlanmadı. Yapılan karaciğer doku kesitlerindeki histolojik hasar skorlarının CCl₄ grubu ile benzer olduğu saptandı (Tablo 1).



Şekil 4. CCl₄+BE grubu karaciğer dokusunun histolojik görünümü. HxE.

- a. Keskin kenarlı yağ vakuolleri içeren hücrelerin genel olarak yassılaştırmış ve hücrenin periferine itilmiş çekirdekleri (ok) ile mikroveziküler (ok başı) yağ vakuollerinin

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

Gruplar (n=10)	Histopatolojik bulgular Medyan (%25-%75)		
	CCl ₄	CCl ₄ +BE	İstatistik önem kontrolü (Kruskal-Wallis Test)
Fibrozis	0.5 (0-1)	0.5 (0-1)	P>0.05
Yağlanma	3 (3-3)	3 (2-3)	P>0.05
Yangı	3 (2-3)	3 (2-3)	P>0.05
Nekroz	3 (2-3)	3 (2-3)	P>0.05

Tablo 2. Kronik deneme gruplarına ait doku hasar parametre skorlarının istatistiksel önem kontrolü.

Gruplar (n=10)	Histopatolojik bulgular Medyan (%25-%75)		
	CCl ₄	CCl ₄ +BE	İstatistik önem kontrolü (Kruskal-Wallis Test)
Fibrozis	3 (2-3)	3 (1-2)	P>0.05
Yağlanma	3 (2-3)	3(2-3)	P>0.05
Yangı	2.5 (1,75-3)	2 (1.75-3)	P>0.05
Nekroz	0.5 (0-1)	0 (0-1)	P>0.05

Tablo 3. Akut karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda kontrol ve deneme gruplarının serum biyokimyasal parametreleri ile karaciğer lipid peroksidasyon düzeyleri

Parametreler	Kontrol $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	BE $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	CCl ₄ $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	CCl ₄ +BE $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	İstatistik önem kontrolü
AST (U/L)	166.80±17.10 ^c	166.00±1.91 ^c	320.10±15.70 ^a	318.00±30.34 ^{ab}	P<0.05
ALT (U/L)	62.00±3.72 ^c	52.35±1.73 ^d	145.90±22.84 ^a	102.60±8.25 ^{ab}	P<0.01
ALP (U/L)	370.50±43.98 ^{bc}	368.56±4.18 ^c	612.30±29.80 ^a	603.00±30.51 ^a	P<0.01
Glikoz (mg/dL)	157.50±22.42 ^c	160.67±9.25 ^c	310.80±13.48 ^a	304.90±30.69 ^a	P<0.01
Trigliserid (mg/dL)	135.70±13.44	138.56±13.53	180.30±17.30	142.60±12.18	P>0.05
Total kolesterol (mg/dL)	78.10±5.66 ^b	74.11±3.57 ^{bc}	96.20±1.40 ^a	94.00±1.32 ^a	P<0.05
HDL-kolesterol (mg/dL)	44.60±13.09 ^{bc}	45.67±3.80 ^b	25.00±1.44 ^d	34.80±1.92 ^c	P<0.05
LDL-kolesterol (mg/dL)	20.00±2.87 ^{bc}	21.22±2.29 ^b	30.90±1.80 ^a	29.94±2.31 ^a	P<0.05
Total protein (g/dL)	6.58±0.27 ^a	6.58±0.12 ^a	5.82±0.30 ^b	5.79±0.20 ^b	P<0.001
Albümin (g/dL)	1.27±0.09 ^b	1.27±0.05 ^b	0.24±0.04 ^d	0.26±0.04 ^d	P<0.001
MDA (nmol/mg protein)	1.03±0.07 ^b	0.73±0.08 ^b	1.93±0.20 ^a	1.62±0.08 ^a	P<0.001
NO (µmol/mg protein)	35.68±4.06 ^b	36.87±3.45 ^b	53.50±3.06 ^a	47,50±6.08 ^{ab}	P<0.01

a-d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemlidir.

$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$: Ortalama± Standart hata

Tablo 4. Kronik karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda kontrol ve deneme gruplarının serum biyokimyasal parametreleri ile karaciğer lipid peroksidasyon düzeyler

Parametreler	Kontrol $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	BE $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	CCl ₄ $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	CCl ₄ +BE $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	İstatistik önem kontrolü
AST (U/L)	174.20±16.49 ^b	173.66±6.71 ^b	1670.40±319.69 ^a	1665.14±64.37 ^a	P<0.001
ALT (U/L)	80.00±7.45 ^b	68.61±2.60 ^b	1285.20±405.06 ^a	1100.00±107.10 ^a	P<0.01
ALP (U/L)	359.60±21.38 ^{bc}	349.40±18.58 ^{bc}	544.90±15.01 ^a	539.29±14.05 ^a	P<0.001
Glikoz (mg/dL)	124.20±22.42 ^c	170.50±5.31 ^b	318.70±29.49 ^a	273.71±8.58 ^a	P<0.001
Trigliserid (mg/dL)	148.00±10.60	159.05±12.51	194.50±18.10	159.00±7.02	P>0.05
Total kolesterol (mg/dL)	76.30±3.65 ^b	72.28±1.70 ^{bc}	87.70±2.15 ^a	85.14±1.56 ^a	P<0.001
HDL-kolesterol (mg/dL)	31.50±1.26 ^b	32.75±1.72 ^b	23.10±1.25 ^c	24.57±1.17 ^c	P<0.001
LDL-kolesterol (mg/dL)	15.20±3.33 ^{bc}	13.90±1.49 ^{bc}	23.34±1.38 ^a	21.47±2.80 ^{ab}	P<0.05
Total protein (g/dL)	6.04±0.18 ^a	6.15±0.14 ^a	5.48±0.13 ^b	5.50±0.18 ^b	P<0.01
Albümin (g/dL)	1.33±0.08 ^b	1.38±0.05 ^b	0.72±0.05 ^c	0.77±0.05 ^c	P<0.001
MDA (nmol/mg protein)	0.98±0.12 ^{bc}	0.66±0.07 ^b	2.70±0.45 ^a	2.44±0.29 ^a	P<0.001
NO (µmol/mg protein)	49.98±4.43 ^{bc}	49.74±7.46 ^{bc}	97.61±5.06 ^a	82.61±4.14 ^a	P<0.001

a-d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemlidir. $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$: Ortalama± Standart hata

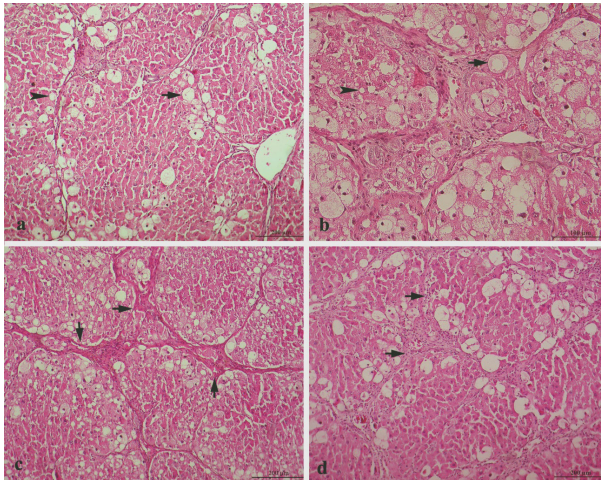
görünümü, 200 µm.

b. Parankime yayılmış makro (ok) ve mikroveziküler (ok başı) yağ vakuollerinin görünümü (ok), 100 µm.

c. Yaygın nekroz alanları (oklar), 200 µm.

d. Tüm parankime yayılan çoğunluğu lenfosit olan mononükleer hücre infiltrasyon alanları (oklar), 100 µm.

Kronik CCl₄+BE grubu; Çalışma sonunda, sistemik nekropside ratların karaciğerlerinin bazılarında koyu kırmızı, bazılarında ise gri-beyaz renk değişimleri dışında diğer organlarda makroskopik bir lezyona rastlanmadı. Bu gruba ait karaciğerlerin histolojisinde parankimde hepatositlerde irili ufaklı yağ vakuol oluşumları dikkati çekti (Şekil 5a,b). Ortadan şiddetliye ulaşan fibrozis alanlarının varlığı ile bağ dokusundaki artışın çoğu kesitlerde karaciğer dokusunda lobulasyon oluşturduğu görüldü (Şekil 5c). Yağ vakuollerinin görüldüğü bölgelerde dikkati çeken bir diğer bulgu ise, yer yer yoğunlaşan mononükleer hücre infiltrasyonuydu (Şekil 5d). Gruba ait karaciğer dokularında CCl₄ uygulamasına bağlı şekillenen histopatolojik değişimlerde bir azalma görülmedi. Diğer dokuların histolojisinde herhangi patolojik bir lezyona rastlanmadı. Karaciğer doku kesitlerinden yapılan histolojik hasar skorlarının CCl₄ grubu ile benzer olduğu saptandı (Tablo 2).



Şekil 5. CCl₄+BE grubu karaciğer dokusunun histolojik görünümü. HxE

a. Makro (ok) ve mikroveziküler (ok başı) yağ vakuollerinin görünümü, 200 µm.

b. Makro (ok) ve mikroveziküler (ok başı) yağ vakuollerinin görünümü, 100 µm.

c. Artmış fibröz doku hücreleri ve şekillenen lobulasyon formasyonu (oklar), 200 µm.

d. Çoğunluğu lenfosit olan mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar), 200 µm.

Deneme gruplarına ait karaciğer hasar parametre skorlaması

Karaciğer kesitlerindeki yağlanma, yangı, nekroz ve fibrozis gibi mikroskobik değişiklikler semikantitatif olarak değerlendirildi, yok ise 0, %33'ünden az ise 1 (hafif), %33-66 arası ise 2 (orta) ve %66'dan fazla ise 3 (şiddetli) olarak kabul edildi. Akut ve kronik deneme gruplarına ait karaciğer hasar parametrelerinin istatistiksel dağılımları Tablo 1 ve Tablo 2'de verildi. Deneme gruplarında, kontrol ve BE gruplarındaki hayvanlara ait karaciğer dokularının histopatolojisinde, karaciğer hasar parametreleri semikantitatif olarak değerlendirilmiş olup hasar skorlamasının sıfır olduğu tespit edildi. Akut ve kronik dönem deneme gruplarında, CCl₄ grubuna göre CCl₄+BE gruplarına ait karaciğer hasar parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin olmadığı tespit edildi (P>0,05) (Tablo 1,2).

Biyokimyasal analiz bulguları ve lipid peroksidasyon göstergeleri

Akut ve kronik çalışma gruplarına ait serum AST, ALT ve ALP enzim aktiviteleri ile glikoz, trigliserid, total kolesterol, HDL ve LDL-kolesterol, total protein, albümin değerleri ile karaciğer MDA ve NO düzeyleri sırasıyla tablo 3 ve 4'de verildi.

Akut çalışmada kontrole göre sadece BE verilen grupta serum AST, ALP enzim

aktiviteleri ile glikoz, HDL ve LDL-kolesterol, total protein ve albumin düzeylerinde önemli bir değişiklik görülmedi. Kronik çalışmada da kontrole göre sadece BE verilen grupta serum AST, ALT, ALP enzim aktiviteleri ile HDL ve LDL-kolesterol, total protein ve albumin düzeylerinde önemli bir değişiklik görülmedi. Ancak BE verilen grupta akut dönemde sadece ALT ($P<0.001$) aktivitesinde önemli bir düşüş, kronik dönemde de glikoz ($P<0.001$) düzeyinde bir artış gözlemlendi (Tablo 3,4). Her iki dönemde CCl_4 grubunda, kontrol grubuna göre serum glikoz, LDL-kolesterol, total kolesterol düzeyleri ve ALT, AST ve ALP enzim aktiviteleri ile karaciğer MDA ve NO düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir artışın, HDL-kolesterol, total protein ve albumin düzeylerinde ise önemli bir azalışın meydana geldiği görüldü ($P<0.05$; 0.01; 0.001). Her ne kadar trigliserid düzeyleri CCl_4 uygulamasıyla sayısal olarak artmış ise de, istatistiksel olarak bu artışlar önemli bulunmadı ($P>0.05$). Diğer yandan BE uygulaması, CCl_4 verilen gruplarda sayısal olarak artan trigliserid düzeylerini kontrol grubu değerlerine yaklaştırdı. Tüm biyokimyasal değerlerde ve lipid peroksidasyon göstergelerinde BE uygulamasının önemli bir farka yol açmadığı dikkati çekti (Tablo 3,4).

Tartışma ve Sonuç

Karbon tetraklorür'ün hepatositler üzerine etkisiyle, granülsüz endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom P450 enzim sistemi aracılığıyla toksik karakterde ara metabolitleri olan triklorometil (CCl_3) ve triklorometil peroksil (CCl_3O_2) serbest radikal metabolitlerine dönüşmesi ile bunların da hücre membranındaki doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu başlatmak veya protein ve yağlara bağlanarak hücre membranlarını bozmak suretiyle karaciğer hasarını oluşturduğu bildirilmektedir (4,5,22).

Ratlarda farklı dozlarda CCl_4 'ün akut olarak uygulandığı çalışmalarda (22-30),

hepatositlerde sitoplazmik vakuolizasyon, sentrilobüler alanda orta derecede nekroz, hidropik değişiklikler ile özellikle sentral bölge sinuzoidlerinde makrofaj ve lenfositten yoğun yangısal hücre infiltrasyonları ve sentral venlerde konjesyon, midzonal ve periportal hepatositlerde hafiften şiddetliye kadar değişen yağlanma gözlemlendiği bildirilmiştir.

Ratlarda karaciğer hasarı oluşturmak amacıyla CCl_4 'ün kronik olarak uygulandığı çalışmalarda da (10,13,31-34), karaciğer dokusunda özellikle portal bölgeden gelişen fibrosit, fibroblast ve kollagen demetlerden oluşan fibröz dokunun çevrelediği şiddetli nekroz, hepatositlerde yağ dejenerasyonu ile yangısal hücre infiltrasyonlarının bulunduğu pseudolob oluşumları ile birlikte mikro-makroveziküler yağlanma, balonumsu veya vakuoler dejenerasyon, lenfosit hücre infiltrasyonları saptanmıştır.

Sunulan çalışmanın akut döneminde CCl_4 'ün iki doz halinde ve 1mL/kg ip uygulanmasında karaciğerlerde sentrilobüler nekroz, çoğunluğu lenfosit olan mononükleer hücre infiltrasyonları ve sentrilobüler bölgedeki hepatositlerde büyüklükleri farklı, keski kenarlı yuvarlak yağ vakuollerinin gözlenmesi, CCl_4 'ün farklı dozları kullanılarak akut karaciğer hasarı oluşturan yukarıdaki araştırmacıların (22-30) bulgularını desteklemektedir. Aynı şekilde kronik dönem karaciğer hasarı oluşturan araştırmacıların (10,13,31-34) bulgularıyla paralel olarak bu çalışmada da CCl_4 'ün on iki hafta boyunca haftada 2 kere, 0.2mL/kg dozunda uygulanmasıyla, ratların karaciğer kesitlerinde özellikle yağ vakuollerinin yoğun olduğu karaciğer parankiminde ortadan şiddetliye değişen yangısal hücre infiltrasyonu ile fibrozis oluşumları saptanmıştır. Sunulan çalışmanın hem akut hem de kronik döneminde CCl_4 'e bağlı oluşan karaciğer toksikasyonunun, dolayısıyla oluşan histopatolojik değişikliklerin, lipid peroksidasyonunun başlamasından sorumlu olan CCl_4 'ün toksik

metabolitlerinden (5,22) ileri gelen lipid peroksidasyonuna bağlı olarak hücre zarından iyonların geçişi, membran enzimlerinin aktivasyonu ve hücre içi sinyal iletimi gibi normal hücre fizyolojisinin devamlılığı için önemli olan membran akışkanlığının azalmasından (29) ve ayrıca artan oksidatif stresin hepatositlerde mitokondriyal hasara neden olmasıyla, yağ asitlerinin mitokondriyal oksidasyonunun azalması ve buna bağlı olarak yağ asitlerinin esterleşerek hepatositlerde trigliserid birikimine sebep olmasından (35) kaynaklanabileceği söylenebilir.

Karbon tetraklorür gibi nekroza sebep olan ajanların karaciğer parankiminde hasara yol açarak plazma AST ve ALT aktivitelerini arttırdığı bildirilmektedir (36). Yapılan akut (9,22,37,38-43) ve kronik (10,13,28,31,44,45) çalışmalarda, CCl_4 ile oluşturulan hasarın derecesine bağlı, serum AST, ALT ve ALP enzim aktivitelerinin yükseldiği gösterilmiştir. Sunulan çalışmanın akut ve kronik döneminde, CCl_4 'ün karaciğer hücrelerindeki hasarına bağlı olarak hücre membran permeabilitesinin bozulmasıyla kan dolaşımına geçişleri artan AST, ALT ve ALP enzimlerinin serum aktivitelerinde anlamlı yükselmeler aynı şekilde dikkati çekmiştir.

Karaciğer fonksiyonunun belirlenmesinde glikoz, albumin ve kolesterolün serum düzeylerinden de yararlanılabilir (46). Ratlarda CCl_4 ile oluşturulan akut çalışmalarda hepatotoksisitenin glikoz düzeylerine etkileri ile ilgili farklı sonuçlara ulaşılmıştır (7,47,48). Ahsan ve ark. (47) ratlarda akut olarak 3mL/kg dozda CCl_4 uygulamasının serum glikoz düzeyinde önemli bir değişikliğe yol açmadığını bildirmelerine karşın, üç doz 1mL/kg CCl_4 uygulamasının serum glikoz düzeyini azalttığını (7) ve 2 mL/kg CCl_4 ile de serum glikoz düzeyinde bir artış olduğunu da bildiren araştırmalar da mevcuttur (48). Her ne kadar sunulan çalışmada insülin ve IGF-I'in serumdaki düzeyleri belirlenmemiş

ise de Martha ve ark. (48)'nın bildirdikleri gibi, bu çalışmanın hem akut hem de kronik döneminde CCl_4 uygulaması ile serum glikoz düzeylerindeki artışların; muhtemelen CCl_4 ile oluşturulan karaciğer hasarına bağlı serum insülin ile IGF-I konsantrasyonlarındaki azalmadan veya CCl_4 'e bağlı gelişen karaciğerde glikojen sentezinin azalmasından (13) kaynaklanabilir.

Ratlarda akut (49-52) ve kronik (32,53) olarak farklı dozlarda uygulanan CCl_4 'ün oluşturduğu karaciğer hasarına bağlı serum kolesterol ve trigliserid düzeylerinde bir artışa neden olduğu bildirilmiştir. Sunulan çalışmada da yukarıdaki araştırmacıların bulgularıyla uyumlu olarak akut ve kronik uygulanan CCl_4 ile oluşan karaciğer hasarına bağlı serum total kolesterol düzeyinde anlamlı bir artış, her ne kadar istatistik önemde olmasa da trigliserid düzeylerinde de sayısal bir artış saptanmıştır. Bu serum lipidlerindeki artışın, CCl_4 uygulamasıyla esterleşen yağ asitlerinin hepatositlerde trigliserid birikimine neden olması (35) ve karaciğer hücre hasarına bağlı aşırı miktarda dolaşıma geçmesi (47,49,50) olabileceği düşünülmektedir.

Ratlarda CCl_4 ile oluşturulan hepatotoksisitede serum LDL ve HDL-kolesterol düzeylerine yönelik sınırlı sayıda çalışmalara ulaşılabilmektedir (31,51). Khan ve ark. (31), dört hafta boyunca haftada iki kere 3 mL/kg, Al-Assaf ve ark. (51) tek doz 1.25 mL/kg CCl_4 'ün LDL-kolesterol düzeyini arttırırken, HDL-kolesterol düzeyini azalttığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da bu araştırmacıların (31,51) bulgularıyla paralel şekilde hem akut hem de kronik dönemde uygulanan CCl_4 'e bağlı şekillenen karaciğer harabiyetinde görülen serum LDL-kolesterol düzeylerinde artmalar Al-Assaf ve ark. (51)'ın bildirdikleri gibi muhtemelen LDL-kolesterol reseptörlerinin üretimi veya fonksiyonlarındaki eksiklik ile bu reseptörlerdeki defektlerden, HDL-kolesterol düzeyindeki azalmalar ise LDL-kolesterol

düzeyindeki artışlardan veya LCAT enzim aktivitesinin azalmasından ileri gelebilir.

Karaciğer hasarının karakteristik bulgularından birisi de serum protein düzeylerindeki azalmadır (54). Total protein düzeylerindeki azalma albumin noksanlığına bağlı olarak şekillendiğinden, hipoalbuminemi olarak da isimlendirilir (55). Çeşitli çalışmalarda CCl_4 ile akut (7,22,27,43,52,54-57) hem de kronik (32,53) olarak karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda belirlenen serum total protein ve albümin düzeylerindeki azalmalara paralel olarak sunulan çalışmada da her iki dönemde CCl_4 'e bağlı olarak serum total protein ve albumin düzeylerinde görülen azalmaların, bu toksik maddenin endoplazmik retikulumdaki poliribozomları bozarak karaciğerde protein sentezini aksatmasından (57) kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Ratlarda CCl_4 'ün akut (27,29,42,58,59) ve kronik (10,13,33,60) uygulanması ile de karaciğer MDA (10,13,27,29,33,42,58-60) ve NO (10,13,58) düzeylerinin arttığını bildiren araştırmacılarla uyumlu olarak bu lipid peroksidasyon göstergelerinin, sunulan çalışmanın hem akut hem de kronik döneminde CCl_4 verilen gruplarda artış göstermesi, CCl_4 'ün karaciğer endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom P450 enzimi aracılığıyla toksik karakterde CCl_3 ve CCl_3O_2 serbest radikallerine dönüşmesiyle oluşan lipid peroksidasyonunun sebep olduğu doku hasarı ve antioksidan savunma mekanizmasının yetersizliğinden (5,22,27) kaynaklandığı düşünülebilir.

Karaciğer koruyucu özelliği ile bilinen BE'nin antioksidan özelliğinin, ana bileşenleri olan karnosol, karnosik asit, rosmanol, rosmadial, epirosmanol, isorosmanol, rosmaridifenol, rosmariquinon, rosmarinik asit ve esansiyel yağ bileşenlerine ileri geldiği bildirilmiştir (61-66).

Akut (9,24,30,49,67) ve kronik (9,13) CCl_4 ile oluşturulan karaciğer hasarı ve biyokimyasal

parametreler ile lipid peroksidasyonu üzerine biberiye bitkisinin etkisinin belirlenmesine yönelik çalışmalar sınırlıdır.

Sotexo-Felix ve ark. (24), ratlarda 4g/kg tek doz CCl_4 uygulamasıyla karaciğerde şiddetli nekroz, ödem, yangısal infiltrasyon, sitoplazmada genişleme ve çekirdekte piknoz oluştuğunu, 200mg/kg biberiyenin, oluşan bu histopatolojik değişiklikleri kısmen önlediğini bildirmişlerdir. Ayrıca bu ekstraktın, CCl_4 uygulamasıyla artan karaciğer MDA konsantrasyonu ve plazma ALT aktivitesi ile azalan karaciğer glikojen düzeyleri üzerine iyileştirici bir etkiye sebep olduğunu saptamışlardır. Bir başka çalışmada (9), ratlarda CCl_4 'ün akut uygulanmasıyla karaciğerde makro ve mikro steatozis, orta derecede fibrozis (septum oluşturmeyen) hemoraji ve fokal nekroz alanları gözlenmiş, ilave edilen 220 ve 440mg/kg biberiye ekstraktlarının vakuloler dejenerasyon, fibrozis ve steatoziste azalmaya neden olduğu ve CCl_4 uygulaması ile oluşan histopatolojik değişikliklerle paralel olarak artan serum AST, ALT ve ALP enzim aktiviteleri ile karaciğer MDA konsantrasyonlarında uygulanan biberiyenin doz ve süresine bağlı olarak bir düşme saptandığı ifade edilmiştir. Fahim ve ark. (30), ratlara üç hafta süreyle intragastrik yoldan BE (0.15g/100gr) uygulamasından sonra tez doz CCl_4 (0.5mL/100 g) verilmesiyle karaciğerde görülen histopatolojik değişikliklerin, BE ile normale döndüğünü, sadece bazı portal damarların ve sinüzoidlerin genişlemiş ve konjesyone olduğunu ve bu etkisi ile uyumlu olarak, artmış serum AST, ALT, ALP enzim aktiviteleri, trigliserid ve glikoz düzeyleri ile azalmış olan albumin, total protein ve glikojen düzeylerini de kontrol grubu değerlerine yaklaştırdığını ileri sürmüşlerdir. Botsoglou ve ark. (49) da altı hafta 20g/kg BE uyguladıkları ratlara 6. haftanın sonunda tek doz 1mL/kg CCl_4 uygulaması ile artan serum AST, ALT ve ALP enzim aktiviteleri ve karaciğer MDA konsantrasyonları ile azalan kolesterol

ve trigliserid düzeylerinin, kontrol grubu değerlerine yaklaştığını bildirmişlerdir.

Gutierrez ve ark. (13), birinci deneme grubunda on iki hafta boyunca 1g/kg/haftalık CCl₄ uygulaması ile 200mg/kg (6.04 mg/kg carnosol) BE'nin eş zamanlı olarak ve ikinci deneme grubunda da, 1g/kg/haftalık CCl₄ uygulaması ile siroz oluşturduktan sonra 200mg/kg (6.04mg/kg carnosol) BE'nin yine on iki hafta verilmesiyle karaciğerde meydana gelen histopatolojik değişikliklere karşı, her iki çalışma grubunda da fibrozisi azalttığını ve rejeneratif nodüllerin görüldüğü nekrotik alanlar üzerine iyileştirici etkisinin olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmacılar CCl₄ uygulamasının karaciğer MDA ve NO konsantrasyonlarında artış meydana getirdiğini, BE'nin serbest radikal süpürücü etkisi ile MDA düzeyinde %17.5, NO konsantrasyonunda ise %28 oranında bir azalma olduğunu saptamışlardır. Ayrıca CCl₄ verdikleri ratlarda serum ALT enzim aktivitesinde 12 kat artış gözlemlendiğini ve bu artışın BE ile %60 oranında azaldığını, CCl₄ uygulamasıyla ile azalan glikojen düzeyleri üzerine de iyileştirici bir etkiye sebep olduğunu rapor etmişlerdir.

Yukarıdaki araştırmacılar (9,13,24,30,49) hem biberiye ekstraktının ve hem de aktif bileşenlerinin (karnosol ve karnosik asit) lipid peroksidasyonunu bloke edici etkisinin, muhtemelen ya CCl₄'ün toksik ara metabolitleri olan Cl₃COO ve OH'ı savurucu ve/veya daha az toksik substanslara dönüştürmesine ya da antioksidan etkinliğine bağlı olabileceğini, ayrıca bu ekstraktın toksik ara metabolitlerin oluşmasına aracılık eden sitokrom CYP2E enzimini inhibe etmesinden ileri gelebileceğini ve bu bitki ile bileşenlerinin antioksidan etkinliğine bağlı olarak karaciğer ve plazma membranlarını koruyucu bir ajan olabileceğini vurgulamışlardır.

Sunulan çalışmada CCl₄ uygulaması ile oluşan akut ve kronik karaciğer hasarına bağlı gelişen histopatolojik değişiklikler, biyokimyasal

parametreler ve lipid peroksidasyonu üzerinde 200mg/kg BE ilavesinin iyileştirici bir etkisinin görülmemesi, araştırmacıların (9,13,24,49) bildirimleri ile örtüşmemektedir. Bu çalışmada Gutierrez ve ark. (13) ve Sotexo-Felix ve ark. (24) ile aynı doz biberiye ekstraktı kullanılması karşın, elde edilen farklı sonuçlar muhtemelen uygulanan biberiyenin farklı tekniklerle elde edilmesinden, bu bitkilerin kullanılan kısımları (kabuk, meyve, çekirdek), elde edilen ürünlerin çeşidi (ekstrakt, yağ, su) ile yetiştikleri toprağın yapısı gibi etkenlere bağlı olarak içeriklerinin ve oranlarının farklılığından ve ayrıca hayvanların bireysel duyarlılıkları gibi birçok faktöre bağlı olarak değişiklik gösterebilmesinden ileri gelebilir.

Sonuç olarak; biberiye ekstraktının farklı sürelerde ve herhangi bir yan etki oluşturmaksızın en iyi sonucu verecek farklı dozlarda kullanılarak dokular üzerine etkilerinin belirlenmesine yönelik yeni araştırmalara ihtiyaç olduğu kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

1. Crawford JM. Karaciğer ve safra yolları. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. eds. In: Robbins Temel Patoloji. 7. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2003; pp. 591-630.
2. Recknagel RO, Glende EA Jr, Dolak JA, Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. Pharmacol Therapeut 1989; 43: 139-54.
3. Muriel P, Mourelle M. Prevention by silymarin of membrane alterations in acute CCl₄ liver damage. J Appl Toxicol 1990; 10: 275-9.
4. Basu S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: Eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. Toxicology 2003; 189: 113-27.

5. Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA. Postulated carbon tetrachloride mode of action: A review. J Environ Sci Heal C 2007; 25: 185-209.
6. Singh RP, Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. J Agric Food Chem 2002; 50: 81-6.
7. Breikaa RM, Algandaby MM, ElDemerdash E, Abdel Naim AB. Biochanin a protects against acute carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. Biosci Biotechnol Biochem 2013; 77: 909-16.
8. Dündar Y. Fitokimyasallar ve sağlıklı yaşam. Kocatepe Tıp Derg 2001; 2: 131-8.
9. Abdel Wahhab El Deen KG, El Shamy KA, El Zizz El Beih NA, Morcy FA, Mannaa FAE. Protective effect of a natural herb (*Rosmarinus officinalis*) against hepatotoxicity in male albino rats. Commun Sci 2011; 2: 9-17.
10. Yehia HM, Al Olayan EM, Elkhadragy MF. Hepatoprotective role of the pomegranate (*Punica granatum*) juice on carbon tetrachloride induced oxidative stress in rats. Life Sci J 2013; 10: 1534-44.
11. Kaur G, Jabbar Z, Athar M, Alam MS. *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. Food Chem Toxicol 2006; 44: 984-93.
12. Chidambara MKN, Jayaprakasha GK, Singh RP. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. J Agric Food Chem 2002; 50: 4791-5.
13. Gutiérrez R, Alvarado JL, Presno M et al. Oxidative stress modulation by *Rosmarinus officinalis* in CCl₄-induced liver cirrhosis. Phytother Res 2010; 24: 595-601.
14. 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.
15. Luna LG, eds. Manual of Histologic Staining Methods; of the Armed Forces Institute of Pathology. New York Blakiston Division, McGraw-Hill, 1968; pp. 34-75.
16. Çiçek B, Oğuz D, Erden E, Şahin T. Nonalkolik steatohepatitte histolojik hasarı öngöründe klinik ve laboratuvarın yeri. Akad Gastroenterol Derg 2002; 1: 1-7.
17. Schwimmer JB, Behling C, Newbury R et al. Histopathology of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2005; 42: 641-9.
18. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-75.
19. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clin Sci 1993; 84: 407.
20. Yoshioka T, Kawada K, Shimada T. Lipid peroxidation in material and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. Am J Obstet Gynecol 1979; 135: 372-6.

21. Tracey WR, Tse J, Carter G. Lipopolysaccharide-induced changes in plasma nitrite and nitrate concentrations in rats and mice: Pharmacological evaluation of nitric oxide synthase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272: 1011-5.
22. Gnanaprakash K, Madhusudhana CC, Ramkanth S et al. Aqueous extract of *Flacourtia indica* prevents carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rat. *Int J Biol Sci* 2010; 6: 51-5.
23. Arosio B, Gagliano N, Fusaro LM et al. Aloe-emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride. *Pharmacol Toxicol* 2000; 87: 229-33.
24. Sotelo-Felix JI, Martinez-Fong D, Muriel P, De La Torre P. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. *J Ethnopharm* 2002; 81: 145-54.
25. Şahin A, Yener Z, Dağoğlu G ve ark. Karbon tetraklorid (CCl₄) ile deneysel olarak karaciğer nekrozu oluşturulan ratlarda vitamin E + selenyum ve *Nigella sativa* (çörekotu)'nın karaciğer yıkımını engelleyici etkileri. *Türk J Vet Anim Sci* 2003; 27: 141-52.
26. Lu KL, Tsai CC, Ho LK, Lin CC, Chang YS. Preventive effect of the Taiwan folk medicine *Ixeris laevigata* var. *oldhami* on -naphthyl-isothiocyanate and carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Phytother Res* 2002; 16: 45-50.
27. 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.
28. Grizzi F, Franceschini B, Gagliano N. Mast cell density, hepatic stellate cell activation and TGF-beta1 transcripts in the aging Sprague-Dawley rat during early acute liver injury. *Toxicol Pathol* 2003; 31: 173-8.
29. Aranda M, Albendea CD, Lostalé F et al. In vivo hepatic oxidative stress because of carbon tetrachloride toxicity: protection by melatonin and pinoline. *J Pineal Res* 2010; 49: 78-85.
30. Fahim FA, Esmat AY, Fadel HM, Hassan KF. Allied studies on the effect of *Rosmarinus officinalis* L. on experimental hepatotoxicity and mutagenesis. *Int J Food Sci Nutr* 1999; 50: 413-27.
31. Feroz Khan Z, Asdaq SMB, Prasanna Kumar SR. Effects of few Indian medicinal herbs on carbon tetrachloride induced hepatic injury in animals. *International J Pharm Tech Res* 2009; 1: 579-87.
32. Venukumar MR, Latha MS. Hepatoprotective effect of the methanolic extract *Curculigo orchoides* in CCl₄ treated male rats. *Indian J Pharmacol* 2002; 34: 269-75.
33. Lv P, Luo HS, Zhou XP et al. Thalidomide prevents rat liver cirrhosis via inhibition of oxidative stress. *Pathol Res Pract* 2006; 202: 777-88.
34. Tasci I, Mas N, Mas MR, Tuncer M, Comert B. Ultrastructural changes in hepatocytes after taurine treatment in CCl₄ induced liver injury. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4897-902.
35. Santra A, Chowdhury A, Ghatak S, Biswas

- A, Dhali GK. Arsenic induces apoptosis in mouse liver is mitochondria dependent and is abrogated by N-acetylcysteine. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 220: 146-55.
36. Plaa GL. Chlorinated methanes and liver injury: highlights of the past 50 years. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000; 40: 42-65.
37. Atasever A, Yaman D. The effects of grape seed and colchicine on carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2014; 66:361-5.
38. Yang YS, Ahn TH, Lee JC et al. Protective effects of pycnogenol on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in Sprague dawley rats. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 380-7.
39. Lida C, Fujii K, Koga E et al. Effect of alpha-tocopherol on carbon tetrachloride intoxication in the rat liver. *Arch Toxicol* 2009; 83: 477-83.
40. Tanrıverdi G. Karbon tetraklorür (CCl₄) ile oluşturulmuş karaciğer hasarında değişik dozlardaki nikotinamidin protektif etkisinin ışık ve elektron mikroskopik olarak incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2005.
41. Arıcı OF, Cetin N. Protective role of ghrelin against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced coagulation disturbances in rats. *Regul Pept* 2011; 166: 139-42.
42. Ahn M, Park JS, Chae S et al. Hepatoprotective effects of *Lycium chinense* Miller fruit and its constituent betaine in CCl₄-induced hepatic damage in rats. *Acta Histochem* 2014; 116: 1104-12.
43. Althnaian T, Albokhadaim I, El-Bahr SM. Biochemical and histopathological study in rats intoxicated with carbon tetrachloride and treated with camel milk. *Springerplus* 2013; 2: 57.
44. Fu Y, Zheng S, Lin J, Ryerse J, Chen A. Curcumin protects the rat liver from CCl₄-caused injury and fibrogenesis by attenuating oxidative stress and suppressing inflammation. *Mol Pharmacol* 2008; 73: 399-409.
45. Srinivasan M, Rukkumani A. Sudheer R et al. Ferulic acid, a natural protector against carbon tetrachloride induced toxicity. *Fundam Clin Pharmacol* 2005; 19: 491-6
46. Karagül H. Klinik biyokimya. *Medisan Yayınevi*, Ankara: 2000; p. 133.
47. Ahsan R, Islam KM, Musaddik A, Haque E. Hepatoprotective activity of methanol extract of some medicinal plants against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in Albino rats. *Global J Pharm* 2009; 3: 116-22.
48. Martha S, Anreddy RNR, Devarakonda KR, Yellu NR, Thungathurthi S. Role of liver in progression of insulin resistance in relation to IGF-I and insulin levels in rats with acute hepatotoxicity. *Lat Am J Pharm* 2009; 28: 914-8.
49. Botsoglou NA, Taitzoglou IA, Botsoglou E. et al. 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.
50. Palaniswamy R, Raghunathan PP. Protective effect of *Bacopa monnieri* leaf

- extract against oxidative stress induced hepatotoxicity in rats. *Int J Pharm Pharmac Sci* 2013; 5: 555-8.
51. Al-Assaf AH. Preventive effect of corosolic acid on lipid profile against carbon tetrachloride induced hepatotoxic rats. *Pak J Nut* 2013; 12: 748-52.
52. Awaad AS, Soliman GA, El-Sayed DF, El-Gindi OD, Alqasoumi SI. Hepatoprotective activity of *Cyperus alternifolius* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Pharm Biol* 2012; 50: 155-61.
53. Rajesh MG, Latha MS. Hepatoprotection by *Elephantopus scaber* L. in CCl₄-induced liver injury. *Indian J Physiol Pharmacol* 2001; 45: 481-6.
54. Achliya GS, Wadodkar SG, Dorle AK. Evaluation of hepatoprotective effect of *Amalkadi ghrita* against carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. *J Ethnopharmacol* 2004; 90: 229-32.
55. Tiftik AM. Klinik Biyokimya, Konya: Mimoza Yayınları, 1996.
56. Murali A, Ashok P, Madhavan V. Protection against CCl₄ induced hepatotoxicity by pretreatment with methanol extract of *Hemidesmus indicus* var. pubescens leaf in Wistar rats. *Int J Appl Res Nat Prod* 2012; 5: 5-13.
57. 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.
58. Cetin E, Kanbur M, Cetin N, Eraslan G, Atasever A. Hepatoprotective effect of ghrelin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Regul Pept* 2011; 171: 1-5.
59. Jeon TI, Hwang SG, Park NG et al. Antioxidative effect of chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *Toxicology* 2003; 187: 67-73.
60. Yılmaz S, Bahçecioğlu İH. Karbon tetraklorür ile siroz oluşturulmuş ratlarda lipid peroksidasyonu, antioksidant enzim ve pirüvat kinaz aktiviteleri. *Turk J Vet Anim Sci* 2000; 24: 25-8.
61. Nakatani N, Inatani R. Structure of rosmanol, a new antioxidant from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agric Biol Chem* 1981; 45: 2385-6.
62. Nakatani N, Inatani R. Two antioxidative diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and a revised structure for rosmanol. *Agric Biol Chem* 1984; 48: 2081-5.
63. Houlihan CM, Ho CT, Chang SS. Elucidation of the chemical structure of a novel antioxidant, rosmaridiphenol, isolated from rosemary. *J Am Oil Chem Soc* 1984; 61: 1036-9.
64. Houlihan CM, Ho CT, Chang SS. The structure of rosmariquinone-a new antioxidant isolated from *Rosmarinus officinalis* L. *J Am Oil Chem Soc* 1985; 62: 96-8.
65. Wijeratne SSK, Cuppett SL. Potential of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) diterpenes in preventing lipid hydroperoxide-mediated oxidative stress in Caco-2 cells. *J Agr Food Chem* 2007; 55: 1193-9.

66. Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils. J Agr Food Chem 2007; 55: 7879-85.
67. Amin A, Hamza AA. Hepatoprotective effects of hibiscus, rosmarinus and salvia on azathioprine-induced toxicity in rat. Life Sci 2005; 77: 266-78.

Yazışma Adresi

Yrd. Doç. Dr. Duygu Yaman
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi,
Patoloji Anabilim Dalı
38039 Melikgazi/Kayseri
Tel: 05054302477
E-posta: dyguyaman@hotmail.com