



****RATLARDA KARBON TETRAKLORÜR İLE OLUŞTURULAN KRONİK KARACİĞER HASARI ÜZERİNE BİBERİYE EKSTRAKTININ (*ROSMARINUS OFFICINALIS*) ETKİSİ VE HEPATİK APOPTOZİSİN BELİRLENMESİ**
EFFECT OF ROSEMARY EXTRACT ON CHRONIC LIVER DAMAGE INDUCED BY CARBON TETRACHLORIDE IN RATS AND DETERMINATION OF HEPATIC APOPTOSIS

Ayhan ATASEVER^{1*}, Ahmet ALPAY², Görkem EKEBAŞ¹, Duygu YAMAN GRAM¹

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

² Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Kayseri

ÖZ

Amaç: Çalışmada, karbon tetraklorür (CCl₄) ile kronik karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda Biberiye (BE) ekstraktının koruyucu etkisi, hücrel apoptozun kaspaz 3, 8 ve 9 antikorları ile değerlendirilmesi ve serum ALT (alanin amino transferaz) aktivitesi, Trigliserit, Total protein, Albümin, total Kolesterol, karaciğer MDA (malondialdehit) düzeyleri ile Total antioksidan kapasitesi (TAK) belirlendi.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, 40 adet (200-250 gr) Wistar albino erkek rat, 10'arlı 4 gruba ayrıldı. İlk grup kontrol olup % 0,9 NaCl (0,2 mL/kg/canlı ağırlık) uygulandı. İkinci gruba 12 hafta her gün sırası ile 200 mg/kg/canlı ağırlık dozunda biberiye ekstraktı gavajla verildi. Üçüncü gruba 8 hafta boyunca haftada 2 kez 1:1 oranında mısır yağı ile dilüe edilen CCl₄ (IP) 0,2 mL/kg/canlı ağırlık dozunda enjekte edildi. Dördüncü gruba 12 hafta her gün 200 mg/kg/canlı ağırlık dozunda biberiye ekstraktı gavajla verilirken aynı gruba beşinci hafta dahil 8 hafta intraperitoneal (IP) 0,2 mL/kg/canlı ağırlık olarak haftada iki doz CCl₄ uygulandı.

Bulgular: Grup I ve II'de karaciğer dokusu normal yapıda; Grup III'de hepatositlerde yoğun makro-mikroveziküler yağlanma, parankimde çoğunluğu lenfositlerden oluşan mononükleer hücre infiltrasyonları, nekroz, portal hafif fibrozis ile parankimde pseudolobulasyon görüldü. Grup IV'de bulgular da kısmi azalmaya rağmen Grup III'e benzer histoloji dikkati çekti. Grup I ve II'de kaspaz 3, 9 pozitif 8 negatifti. Grup III ve VI'de kaspaz 3, 8 ve 9 pozitifti. Grup IV'de kaspaz-3 gibi kaspaz-9'unda ve kısmen azalmış olması, biberiye ekstraktının sınırlı da olsa karaciğer dokusunu koruyabileceğini düşündürmüştür. Grup III'de artmış serum ALT aktivitesi Grup IV'de normal değerlere yaklaştı. Grup III'de ki serum trigliserit düzeylerindeki artışlar (P=0,001), Grup IV'de sayısal olarak azaldı. Grup III'de MDA seviyesi yüksek (P<0,05), TAK seviyesi düşüken, Grup IV'de MDA seviyesi önemli düzeyde düşüş (P<0,001).

Sonuç: Grup IV'de biyokimyasal veriler karaciğer hasarının iyileştiği gösterirken, histopatolojik lezyonlar üzerine olumlu bir etki gözlenmemiştir. Bu nedenle biberiye ekstresinin farklı sürelerde ve yan etki oluşturmaksızın en iyi sonucu verecek yüksek dozlarda kullanılarak, etkisinin belirlenmesine yönelik yeni araştırmalara ihtiyaç olduğu kanaatine varıldı.

ABSTRACT

Purpose: The present study determined the possible protective effects of rosemary extract on lesions and cellular apoptosis detection by immunohistochemical method (with caspase 3, 8 and 9 antibodies) in liver tissue and some biochemical parameters; serum ALT (alanin aminotransferase) activity, triglyceride, total protein, albumin and cholesterol activity, and liver MDA (malondialdehyde) levels along with total antioxidant capacity on chronic liver injury induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in rats.

Materials and Methods: Fourty Wistar albino rats (200-250 g) were divided into four groups (n:10/group). In the first group of control rats (control group), the rats were administered with %0,9 NaCl (0.2 mL/kg). The second group was administered daily with 200 mg/kg rosemary extract for twelve weeks through gastric gavage, respectively. Third group was also given CCl₄ (which was diluted with corn oil, 1:1) i.p. (0.2 mL/kg) twice for 8 weeks. The rats in the fourth group rats also received 200 mg/kg rosemary extract daily for twelve weeks through gastric gavage and also given CCl₄ (which was diluted with corn oil, 1:1) i.p. (0.2 mL/kg) twice for 8 weeks, starting from the 5th week.

Results: The livers of the rats in group I and II had normal architecture, while an intensive macro and microvesicular steatosis, mononuclear inflammatory cell infiltrations mostly lymphocytes in portal area and paranchyma with necrotic alterations, mild to severe fibrosis with lobulation formation were observed in the group III. In Group IV, histological findings similar to Group III were noted despite partial reduction. In the group I and II, while caspase-3 and caspase-9 were positive, caspase-8 was negative. Caspase 3, caspase 8 and caspase 9 were positive in the group III and IV. There was a limited reduction in caspase 3 activity in group IV. Similar to caspase 3, partial reduction observed in caspase 9 activity suggest that rosemary extract administrations may have a partial protective effect on the liver tissue. Increased serum ALT activity level due to group III administration was close to normal in group IV. Increased serum triglyceride levels in Group III were decreased numerically in Group IV. In Group III, the MDA levels were high and TAC levels were low. Compared to controls, serum triglyceride levels in CCl₄ groups were determined to be higher (P=0.001). Upon the administration of rosemary extract, this value came down to lower numbers. MDA levels in in CCl₄ group were higher than those of the other groups (P<0.05). The administration of rosemary extract to CCl₄ group reduced MDA levels significantly (P<0.001). There was no effect of rosemary extract administration on total antioxidant capacity. In Group IV, MDA level decreased significantly.

Conclusion: Biochemical data have shown that liver damage improved in Group IV and no positive effect on histopathological lesions was observed. Since biochemical parameter values were close to normal values in groups which received rosemary extract compounds may have healing effects and therefore, new research strategies and approaches where both compounds may be tried with different periods in high doses without side effects are needed to evaluate their effects.

Anahtar kelimeler: Biberiye ekstresi, Histopatoloji, İmmunhistokimya, Karbon tetraklorür, Rat

Keywords: Carbon tetrachloride, Histopathology, Immunohistochemistry, Rat, Rosemary extract.

*Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL -2017-7615 kodlu proje ile desteklenmiş ve yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

Makale Geliş Tarihi: 26.04.2019
Makale Kabul Tarihi: 04.08.2019

Corresponding Author: Prof. Dr. Ayhan ATASEVER Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Talas Bulvarı, 38039 Melikgazi, Kayseri.
Telefon: 0352 207 66 66 /29925, E-posta: atasevera@erciyes.edu.tr

GİRİŞ

Karaciğer, anatomik lokalizasyonu ve ortaya koyduğu önemli fonksiyonlar nedeniyle toksik maddelere en fazla maruz kalan ve pek çok etkenle hasara uğrayabilen bir organdır (1). Karbon tetraklorür akut ve kronik hepatotoksisite oluşturabilir, etkisini biyokimyasal ve hücre organelleri düzeyinde gösterir (2,3). Hasar, oksidatif stres ve oluşan serbest radikallerin lipid peroksidasyonunu başlatarak hepatositlerin hücre membranlarının bozulmasıyla oluşur (4-6). Ayrıca hasarının, aktive olmuş Kupffer hücrelerinden salınan proinflamatuvar mediatörlerin (nitrik oksit vb.) etkisiyle diğer hücrelerin (endotelial hücreler, udu 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 etkilerine az rastlanması farklı kimyasal maddeler ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı, antioksidan ve karaciğer koruyucu etkilerinin belirlenmesi amacıyla hayvan modelli deneysel çalışmalar 20. yüzyılda popüler hale gelmiştir (8). BE'nin antioksidan ve serbest radikalleri tutucu ve CCl₄ ile oluşan karaciğer hasarı üzerine koruyucu etkisi olabileceği düşünülmektedir (9-13). Bu çalışmada CCl₄ ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda, BE'nin lezyonlar üzerine olası koruyucu etkisi, hücre apoptozun immunohistokimyasal yöntemle (kaspaz 3, 8 ve 9 antikorları ile) değerlendirilmesi ve serum ALT (alanin amino transferaz) aktivitesi, Trigliserit, Total protein, Albümin, Total Kolesterol, karaciğer MDA (malondialdehit) düzeyleri ile Total antioksidan kapasitesinin belirlenmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)'nden temin edilen 200-250g ağırlığında, 40 adet Wistar albino rat kullanıldı. Her kafese alınan beş rat, pelet yem ile ad libitum olarak beslenerek araştırma merkezinin sahip olduğu uygun şartlar altında [(kontrollü sıcaklık (21±2°C), nem (%50±5), hava değişimi (saatte 12 devir), sıcaklık (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık)] barındırıldı.

Çalışmada, 40 adet rat, her birinde 10 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. İlk grup kontrol olarak belirlendi ve % 0.9 NaCl (0.2 mL/kg/canlı ağırlık) uygulandı. İkinci gruba 12 hafta her gün 200 mg/kg/canlı ağırlık dozunda BE ekstraktı gavajla verildi. Üçüncü gruba 8 hafta haftada 2 kez 1:1 oranında mısır yağı ile dilüe edilen CCl₄ (İP) 0.2 mL/kg/canlı ağırlık dozun da enjekte edildi. Dördüncü gruba ise 12 hafta her gün 200 mg/kg/canlı ağırlık dozunda BE gavajla verilirken, beşinci haftadan itibaren 8 hafta boyunca intraperitoneal (İP) 0,2 mL/kg/canlı ağırlık olarak haftada iki doz CCl₄ uygulandı. Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı tarafından 14.06.2014 tarih ve 17/54 nolu karar ile onaylandı.

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 ve intrakardiyak kan örnekleri alınarak sistemik nekropsileri yapıldı.

Tamponlanmış nötral formaldehit fiksasyonunun ardın-

dan karaciğer dokusu örnekleri akar çeşme suyunda yıkanarak dereceli alkoller ve ksilenden geçirilerek parafine bloklandı. Bloklardan mikrotomla 4-5 µm kalınlığında kesitler lamlara alındı ve Hematoksilen-Eosin (HxE) boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi.

İmmunohistokimyasal incelemede; karaciğer dokusundaki apoptozisi göstermek için Avidin Biotin Peroksidaz Kompleks (ABC) tekniği, ticari kitle (Zymed, Histostain Plus Kit, California, USA) öngörülen standart prosedürle yapıldı. Primer antikor olarak aktif caspase-3 (Novus NB100-56113) (sulandırma oranı 1/2000), caspase-8 (Abcam ab25901) (sulandırma oranı 1/100) ile caspase-9 (Abcam ab25758) (sulandırma oranı 1/100), kullanıldı. Negatif kontrol olarak dokulara PBS (pH 7.4), pozitif kontrol olarak primer antikorların üretici firmalarını önerdiği kontrol dokularına primer antikorlar uygulandı.

Biyokimyasal incelemede; alınan kan örneklerinin plazma ve serumları ayrıldı ve analiz için -20°C'de saklandı. Serum ALT aktivitesi, trigliserit, total protein, albümin ve kolesterol düzeyleri ERÜ Tıp Fakültesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı, Klinik Biyokimya bölümünde Roche Cobas 8000 marka otoanalizatörde Ticari kitler (Roche Cobas Kit-İsviçre) kullanılarak belirlendi. Karaciğer MDA ve TAK (Total antioksidan kapasitesi) analizleri için doku örnekleri ölçüm prosedürüne göre homojenize edildi. Süpernatantları ayrılarak analizler gerçekleştirinceye kadar -80°C'de saklandı. Karaciğer dokusu MDA ve TAK (Total Antioksidan kapasitesi) düzeyleri ticari kit (Cayman, USA ve Rel Assay, Türkiye) kullanılarak ELISA cihazında (µQuant Bio-Tek) belirlendi.

Hematoksilen-Eozin 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 patoloj 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 istatistiksel analizleri ve karaciğer yangı yağlanma nekroz ve fibrozis skor değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında Kruskal Wall's test, farklılığın önemli çıktığı durumlarda Bonferoni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile yapıldı.

BULGULAR

Klinik bulgular

Çalışmada kullanılan ratlardan Grup I ve Grup II'deki ratlarda herhangi bir klinik bulgu görülmezken, Grup III ve IV'deki ratlarda halsizlik, kambur duruş, sendeleyerek yürüme, aşırı tükürük salgısı, pitozis, ataksi ve korneal opasite gibi klinik bulgular gözlemlendi.

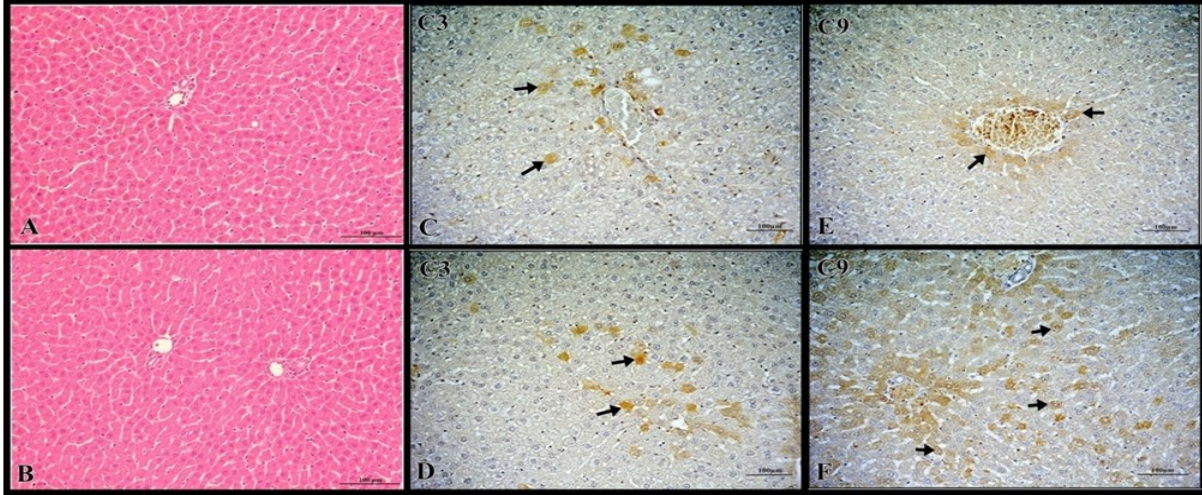
Patolojik Bulgular

Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Bulgular
Sistemik nekropsilerde Grup I (Şekil 1A) ve Grup II'deki (Şekil 1B) rat karaciğerinde makroskopik bir lezyona rastlanmayıp, histolojisinde normal yapıda oldukları görüldü. Grup I ve Grup II'nin histolojik karaciğer hasar

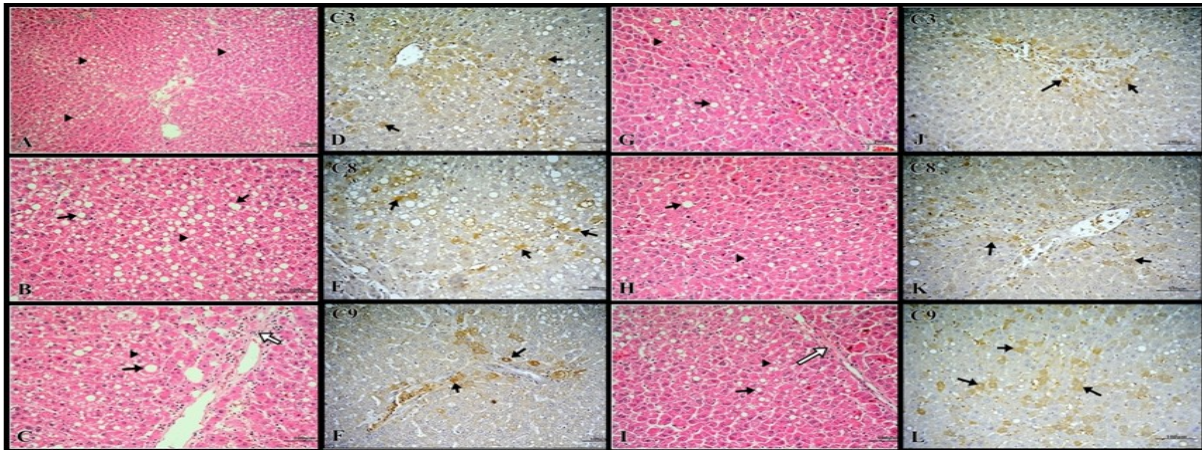
skorlamasında; fibrozis, yağlanma, yangı ve nekroz parametreleri açısından hasar skoru sıfırdı. Grup I (Şekil 1C, E) ve II'nin (Şekil 1D, F) karaciğer doku kesitlerinden yapılan kaspaz 3, 8 ve 9 boyamalarında kaspaz 8'de negatiflik görülürken, normal apoptoza maruz kalan az sayıda hepatositte kaspaz 3 ve kaspaz 9'da pozitiflik tespit edildi. Grup I ve II'de diğer dokuların makroskopik-histolojik değerlendirmesinde herhangi patolojik bir lezyon bulunmayıp normal yapıda oldukla-

tüşmekteydi (Şekil 2G, H, I). Grup III ve IV'deki karaciğer doku kesitlerinden kaspaz 3 (Şekil 2D, 2J), kaspaz 8 (Şekil 2E, 2K) ve kaspaz 9 (Şekil 2F, 2L) boyamalarında sentriasiner ve perivasküler yerleşimli sitoplazmasında yağ vakuolleri bulunan hepatositlerde pozitiflik tespit edildi. Grup III ve IV'deki ratların karaciğer dışındaki diğer dokularının histolojisinde herhangi bir patolojik lezyona rastlanmadı.

Histolojik olarak karaciğer hasar skorlamasında;



Şekil 1. Grup I (A) ve II'deki (B) karaciğer doku örneklerinin normal histolojik görünümü. Karaciğer, Hx E, 100 µm. Grup I (C, E) ve II'de (D, F) apoptoza maruz kalan az sayıda kaspaz 3 (C3) ve kaspaz 9 (C9) pozitif hepatositlerin (ok) görünümü. ABC-P, 100 µm.



Şekil 2. Grup III (A, B, C) ve IV'deki (G, H, I) ratların karaciğer dokusunda yağ vakuolleri, makro (ok) ve mikroveziküler (ok başı) yağ vakuolleri, portal alanda çoğunluğu lenfositlerden oluşan mononükleer hücre infiltrasyonu ve hafif fibrozis (beyaz ok), Karaciğer, Hx E. Grup III (D, E, F) ve IV'deki (J, K, L) ratların karaciğer doku kesitlerinden kaspaz 3 (C3), kaspaz 8 (C8) ve kaspaz 9 (C9) boyamada apoptoza maruz kalan pozitif hepatositlerin (ok) görünümü. ABC-P, 100 µm.

rı görüldü.

Grup III ve IV'deki rat karaciğerlerinin bazılarında koyu kırmızı, bazılarında ise gri-beyaz renk değişimleri dışında diğer organlarda makroskopik bir lezyona rastlanmadı. Grup III'e ait karaciğer dokularının histolojisinde hepatositlerde yoğun makro-mikroveziküler yağ vakuolleri görüldü (Şekil 2A,B). Özellikle portal bölgele-re yakın alanlarda, lenfositten zengin mononükleer hücre infiltrasyon alanları ile tüm parankimde kupffer hücre hiperplazileri (Şekil 2C) dikkati çekti. Ayrıca portal bölgedeki bağ doku artışı parankimde tam olmayan pseudolob yapıları oluşturmuştu. Grup IV'de ise şiddeti kısmen azalsa da lezyonların histolojisi Grup III ile ör-

fibrozis, yağlanma, yangı ve nekroz parametreleri açısından değerlendirme yapıldı. Yağlanma yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli olup ($P < 0,05$), yangı, nekroz ve fibrozis skorlama yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ($P > 0,05$). Yağlanma yönünden CCl_4 grubu, CCl_4 +Biberiye ekstraktı grubuna göre yüksek çıkmıştır (Tablo 1).

Biyokimyasal Bulguları

Tüm gruplardaki serum ALT aktivitesi ile total protein, albümin, total kolesterol ve trigliserid düzeyleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Karaciğer istatistiksel olarak hasar skorlama (P<0,05).

	CCl ₄ Grubu		CCl ₄ +Biberiye Grubu	P değeri
	n	Median (%25-%75)	Median (%25-%75)	
Yangı	n=10	1,5 (0,75-2,25)	0 (0-1,25)	0,114
Yağlanma	n=10	2 (2-3) ^a	1 (0,75-2) ^b	0,010
Nekroz	n=10	0 (0-1)	0,5 (0-1)	0,778
Fibrozis	n=10	0,5 (0-1)	0,5 (0-1)	0,879

Grup III'de artmış serum ALT aktivitesi sadece Grup IV'de normal değerlere yaklaşmıştır. Grup III'de azalmış olan serum total protein düzeyleri Grup IV'de etkilenmemiştir. Grup I'e göre, Grup II hariç diğer gruplarda (III ve IV) total protein değerleri daha düşük bulunmuştur (P=0,001). Diğer yandan serum albümin düzeyleri yönünden deneme grupları arasında istatistiksel anlamda bir fark bulunmamıştır (P>0,05). Grup I'e göre; karaciğer hasarı ile artmış olan serum kolesterol düzeyleri, (P<0,01) Grup IV'de etkilenmemiştir. Grup I'e göre; Grup III'deki ratlarda serum trigliserit düzeyleri artış göstermiştir (P=0,001). Grup IV'de bu artış, sayısal olarak azalmıştır. Deneme grupları arasında karaciğer dokusu MDA düzeyleri bakımından fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Grup IV'ün MDA seviyelerinin diğer gruplardan (I, II ve III) yüksek olduğu görülmüştür (P<0,05). Grup IV'de MDA seviyelerini önemli düzeyde düşmüştür (P<0,001) (Tablo 2). Grup III'ün karaciğer TAK düzeyleri gerek Grup I, gerekse Grup II'ye göre sayısal olarak düşük bulunmuştur. Grup IV'de TAK düzeyleri üzerine herhangi bir etkisi görülmemiştir (Tablo 2).

la hayvan modellerinde farklı kimyasallar ile oluşturulan karaciğer hasarlı deneysel çalışmalar 20. yüzyılda popüler hale gelmiştir (8). Kronik karbon tetraklorür uygulanmasının rat karaciğerlerinde hepatitis, fibrozis ve siroz ile sonuçlanan toksikasyonuna oluşturduğu bildirilmiştir (4, 10, 13, 18-21).

Karbon tetraklorür'ün hepatositler üzerine etkisiyle, granülsüz endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom P450 enzim sistemi aracılığıyla toksik karakterde ara metabolitleri olan triklorometil (CCl₃) ve triklorometil peroksil (CCl₃O₂) serbest radikal metabolitlerine dönüşmektedir. 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 karaciğer hasarı oluşturmak için CCl₄'ün kronik uygulandığı çalışmalar mevcuttur (10, 13, 18-21), bu çalışmalarda; hepatositlerde nekroz, makromikroveziküler yağlanma, yangısal hücre infiltrasyonu, ekstrasellüler matriks moleküllerinin sentezinde artış ve bağ dokusu proteinlerinin birikimiyle kollagenin

Tablo 2. Karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda biberiye ekstraktının serum ALT aktivitesi, total protein, albumin, kolesterol ve trigliserit (µmol/L) düzeylerine ve karaciğer dokusu MDA (µmol/L) ve TAK düzeylerine etkisi

	Kontrol Median (%25-%75) (n=10)	CCl ₄ Grubu Median (%25-%75) (n=10)	Biberiye Grubu Median (%25-%75) (n=10)	CCl ₄ +Biberiye Grubu Median (%25-%75) (n=10)	P değeri
ALT	64,0 (75,0-100,5) ^b	102,0 (82,75-129,5) ^a	70,0 (62,5-83,0) ^b	75,0 (64,75-100,5) ^b	P<0,001
TOTAL PROTEİN	6,6 (6,5-6,8) ^a	5,9 (5,7-6,1) ^b	6,5 (6,0-7,1) ^a	6,2 (5,8-6,4) ^b	P=0,001
ALBÜMİN	4,0 (3,8-4,5)	4,2 (3,8-4,5)	3,9 (3,7-4,1)	4,2 (3,7-4,2)	0,570
KOLESTROL	59,5 (55,7-67,0) ^b	81,0 (71,0-82,0) ^a	58,5 (56,75-62,5) ^b	79,5 (75,7-86,0) ^a	P<0,001
TRİGLİSERİT	72,5 (60,25-86,5) ^b	171,5 (120,0-196,0) ^a	124,5 (67,7-158,5) ^{ab}	114,5 (82,7-139,5) ^{ab}	P=0,001
MDA	20,62 (18,90-21,37) ^a	24,78 (22,64-28,38) ^b	20,22 (19,22-22,26) ^b	22,26 (20,92-22,74) ^b	P<0,001
TAK	3,10 (2,97-3,4) ^{ab}	2,59 (2,38-3,14) ^b	2,73 (2,59-2,78) ^b	2,96 (2,81-3,24) ^{ab}	P<0,001

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkisel kaynaklı birçok ilacın, ucuz ve kolay ulaşılabilir, toksik ve yan etkilerinin az olmasından dolayı antioksidan ve karaciğer koruyucu etkilerini belirlemek amacıyla

yoğunlaşmasını sağlayarak fibrozisten siroza kadar uzanan parankimi bozan kronik hasarlar ortaya çıkarabilmektedir (1, 4, 20-23).

Ratlara sekiz hafta; haftada üç kere (20), on hafta; hafta-

da bir kere (10), on iki hafta; haftada iki kere (21) uygulanan 0,2 mL/100 g CCl₄'ün, karaciğer dokusunda özellikle portal bölgeden gelişen fibrosit, fibroblast ve kollagen demetlerden oluşan fibröz dokunun çevrelediği şiddetli nekroz, hepatositlerde makro-mikroveziküler yağ dejenerasyonu ile yangısal hücre infiltrasyonlarının bulunduğu pseudolob oluşumları bildirilmiştir. Ayrıca Khan et al. (18) 0,2 mL/kg sekiz hafta, Gutiérrez ve ark. (13) 1 g/kg on üç hafta, haftada iki kere, Venukumar ve Latha (19) da 1 mL/kg on iki hafta, haftada bir kere CCl₄ dozunu vererek ratlarda karaciğerde benzer bulguları saptamışlardır Sekiz hafta boyunca 0,2 mL/kg dozunda CCl₄'ün uygulandığı çalışmamızda da karaciğer hasarı oluşturan (10, 13, 18-21) araştırmacıların bulgularıyla örtüşen, rat karaciğer kesitlerinde özellikle makro-mikro yağ vakuollerinin yoğun olduğu karaciğer parankiminde ortadan şiddetliye değişen yangısal hücre infiltrasyonu ile fibrozis ve tam olmayan pseudolob oluşumları saptanmıştır. CCl₄'e bağlı toksikasyonla oluşan histopatolojik değişikliklerin; CCl₄'ün toksik metabolitlerinin (5, 24) lipid peroksidasyonunu başlatarak hücre membran bütünlüğünü bozması (25), artan oksidatif stresin hepatositlerde mitokondriyal hasara yapması, yağ asitlerinin mitokondriyal oksidasyonunun azalması ve buna bağlı olarak yağ asitlerinin esterleşerek hepatositlerde trigliserid şeklinde birikimine sebep olmasından (26) kaynaklanabileceği klasik bilgilere dayanılarak söylenebilir.

Biberiyenin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi içerdiği yüksek fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Özellikle, monoterpenler (eterik yağlar), diterpen fenoller (karnosik asit, karnosol, rosmanol, apirosmanol, isorosmanol, metil karnosat), fenolik asitler (rosmarinik asit), flavanoidler ve triterpen asitler (ursolik asit, oleanolik asit, bütilinik asit) biberiye ekstraktlarının etken maddelerini oluşturmaktadır (27, 28).

Abdel Wahhab ve ark. (29), dört hafta süre ile haftada iki kez 1 g/kg CCl₄ uyguladıkları ratlarda karaciğerde makro ve mikro steatozis, orta derecede fibrozis (septum oluşturmaman) hemoraji ve fokal nekroz alanları gözlemiş, CCl₄ ile birlikte 220 ve 440 mg/kg biberiye ekstraktlarının verilmesiyle lezyonların şiddetinde azalma olduğunu, Fahim ve ark. (30), tez doz CCl₄ (0,5 mL/100 gr) uyguladıkları ratlarda akut olarak dilate ve konjesyone portal damarların periferinde mononükleer hücre infiltrasyonu, bazı hepatositlerin çekirdeklerinde piknoz, karyoreksis ve karyolizis ile karakterize dejeneratif nekroza giden değişiklikler ve bazılarının sitoplazmalarında vakuoler dejenerasyon ile sinuzoidlerde genişleme, Kupffer hücrelerinde hiperplazi ve aktivasyon saptamışlar, üç hafta intragastrik yoldan BE (0,15 g/100gr) uygulamasından sonra tez doz CCl₄ (0,5 mL/100 gr) verilmesi CCl₄ grubunda oluşan bu histopatolojik değişiklikleri normal yapıya döndürdüğünü, Amin ve Hamza (31) ise tek doz 50 mg/kg azatioprin uygulanarak akut karaciğer hasarı oluşturdıkları ratlarda hepatositlerde dejenerasyon, orta derecede sentrilobuler ve midzonal nekroz, sinuzoidlerde dilatasyon, lobüllerde konjesyon, parankimde hemoraji ile karışık yangısal hücre infiltrasyonları görmüşler, beş hafta boyunca 10 mL/kg BE verilmesini takiben tek doz 50 mg/kg azatioprin uygulamasının, tek doz 50 mg/kg azatioprin uygulanan grupta oluşan pa-

tolojik değişiklikler üzerine iyileştirici etkisini, Gutierrez ve ark. (13), deneme gruplarından ilkinde on iki hafta 1 g/kg/haftalık CCl₄ uygulaması ile 200 mg/kg (6,04 mg/kg karnosol) BE'nin eş zamanlı olarak ve ikincisine, 1 g/kg/haftalık CCl₄ uygulaması ile siroz oluştuktan sonra 200 mg/kg (6,04 mg/kg karnosol) BE'nin yine on iki hafta vermekle yalnız CCl₄ grubundaki karaciğerlerde oluşan masif nekroz, şiddetli yangı, hücresel yapının kaybolmasıyla karakterize tüm karaciğer yıkımı ve geniş fibrozis alanlarına karşı biberiye ilavesinin her iki çalışma grubunda da oluşan patolojik lezyonları azalttığını, Sakr ve ark. (33), haftada iki defa, altı hafta süre ile intraperitoneal olarak, 0,1 mL/100 gr vücut ağırlığı dozunda CCl₄ verilen albino sıçanlarda, hepatositlerde bozulma, sitoplazmik vakollerin görülmesi, kan damarlarının daralması, lökosit infiltrasyonları, yağ dejenerasyonu, fibrozis gibi farklı histopatolojik değişiklikler gözlenmişler ve Karbontetraklorür+Biberiye grubunda (300 mg/ml, etanolde çözünmüş özüt, 6 hafta süre ile haftada iki defa) ise CCl₄'e bağlı şekillenen histopatolojik değişikliklerin düzeldiğini rapor etmişlerdir.

Biberiye ekstraktının etkisinin belirlenmesine yönelik histopatolojik bulguların değerlendirildiği sınırlı sayıda çalışmalara rastlanılabilmektedir (13, 23, 29-32, 34). Benzer şekilde CCl₄ veya diğer toksik madde uygulamasıyla karaciğer dokusunda oluşan hasarın Biberiye ekstraktı verilmesiyle azaldığı özellikle yağ dejenerasyonu, nekroz, fibrozis ve yangıyı kısmen ya da tamamen iyileştirdiği, kontrol gruplardakilere yaklaştırdığını bildiren çalışmalar varken (13, 29-32, 34), hiçbir değişiklik oluşturmadiğini bildiren çalışmalarda (23) mevcuttur. Sunulan çalışmada da araştırmacıların bildirdikleriyle bire bir örtüşme de karaciğer dokusunda iyileşme gösteren hepatositlerdeki mikro ve makro veziküler yağlanmanın kısmen azalması, görülen nekrotik değişikliklerin hafiflemesi ve yangı hücrelerinin azalması, bağ dokunun sınırlı artışı biberiye ekstraktı kullanan araştırmacıların (13, 29-32, 34) bulgularıyla benzerlik göstermiştir. Özellikle; Biberiye ekstraktı verilen gruplarda yalnız CCl₄ verilen gruplara göre fibröz doku artışı minimal seviyede olup bazı karaciğer dokularında hiç gözlenmemiştir. Bazı araştırmacılar (13, 29-32, 34) hem biberiye ekstraktının ve hem de aktif bileşenlerinin (karnosol ve karnosik asit) lipid peroksidasyonunu bloke edici etkisinin, muhtemelen toksik ara metabolit oluşumunu bunları sağlayan enzimleri inhibe ederek karaciğer ve plazma membranlarını koruyabilen bir ajan olabileceğini vurgulamışlardır. Çalışmamızdaki karaciğer dokusundaki kısmi iyileşme de muhtemelen biberiyenin antioksidan etkisiyle (27, 28) ilgilidir.

Ratlarda CCl₄ ile oluşturulan kronik karaciğer hasarının biberiye ekstraktı verilerek iyileştirilmesine yönelik biyokimyasal bulguların değerlendirildiği sınırlı sayıda çalışma (13, 29-32, 34) vardır. Bunlardan Abdel Wahhab ve ark. (29), ratlara 220 ve 440 mg/kg biberiye ekstraktlarının verilmesiyle histopatolojik değişikliklerle paralel olarak artan serum AST, ALT ve ALP enzim aktiviteleri ile karaciğer MDA konsantrasyonlarının da düşme, Fahim ve ark. (30), üç hafta süreyle intragastrik yoldan BE (0,15 g/100gr) uygulamasından sonra histopatolojik değişiklikleri normale döndürerek 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, Botsoglou ve ark. (32) da altı hafta 20 g/kg BE uyguladıkları ratlarda artan serum AST, ALT ve ALP enzim aktiviteleri ve karaciğer MDA konsantrasyonları ile azalan kolesterol ve trigliserid düzeylerinin, kontrol grubu değerlerine yaklaştığı, Gutierrez ve ark. (13), CCl₄ uygulamasının karaciğer MDA ve NO konsantrasyonlarında artış meydana getirdiğini BE'nin MDA düzeyinde % 17,5, NO konsantrasyonunda ise % 28 oranında bir azalma olduğunu saptamışlardır. Ayrıca CCl₄ verdikleri ratlarda serum ALT enzim aktivitesinde gözlemlenilen 12 kat artışın BE ile % 60 oranında azaldığını, yine azalan glikojen düzeyleri üzerine de iyileştirici bir etkiye sebep olduğunu, Sakr ve ark., (33) CCl₄ indüklenmiş karaciğer hasarında, serum AST, ALT, ALP, kolesterol ve trigliserid düzeylerinde artış görülürken, biberiye uygulamasının bu değerleri anlamlı bir şekilde azalttığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda da CCl₄ uygulanan grupta azalmış olan serum Total protein düzeyleri biberiye uygulamalarından etkilenmemiştir. Kontrol grubuna göre biberiye grubu hariç diğer gruplarda total protein değerleri daha düşük bulunmuştur (P=0,001). Kontrol grubuna göre; CCl₄ ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda serum trigliserit düzeyleri artış göstermiştir (P<0,01). Karbon tetraklorür verilen hayvanlarda biberiye ekstraktı uygulaması ile bu artış sayısal olarak azaltılmıştır. Kontrol grubuna göre; karaciğer hasarı ile artmış olan serum total kolesterol düzeyleri, CCl₄'lü gruplara biberiye ekstraktı ilavesiyle değişiklik göstermemiştir. Karbon tetraklorür uygulamaları ile artmış serum ALT aktivitesi sadece biberiye uygulaması ile normal değerlere yaklaşmış, serum albumin düzeyleri yönünden deneme grupları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (P>0,570). Deneme grupları arasında karaciğer dokusu MDA düzeyleri bakımından fark istatistiksel olarak önemli bulunmuş olup, en yüksek MDA seviyeleri CCl₄ grubunda saptandı (P<0,05). Karbon tetraklorürlü gruplara biberiye uygulaması MDA seviyelerini önemli düzeyde düşürmüştür (P<0,001). Yukarıda bildirilen araştırmacıların (13, 29-32, 34) bildirdikleri MDA değerleri, çalışmamız MDA değerleriyle genellikle örtüşmüştü. Karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda biberiye uygulamasının TAK'si üzerine etkisine dair herhangi bir araştırmaya ulaşılamamıştır. Sunulan çalışmada biberiye uygulamasının total antioksidan kapasitesi üzerine etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.

Akut karaciğer hasarının oluşmasında ilaç toksikasyonu, alkol, viral enfeksiyonlar, nonalkolik steatoz ve kolestatik gibi çeşitli karaciğer hastalıkları önemli bir faktördür (35-37). Son on yılda yapılan çalışmalara göre, hepatosit apoptozunun, toksik hasarın ilk hücrel cevabı ve karaciğer hastalıklarında hücre ölümünün temelini oluşturduğu düşünülmektedir (37, 38). Apoptozu uyaran mekanizmalar, ekstrinsik ve intrinsik yolla oluşturmaktadır (39, 40). Kaspaz 8 enzimi ekstrinsik veya ölüm reseptör yolunu, kaspaz 9 enzimi ise apoptozun intrinsik veya mitokondriyal yolu ile oluşan inisyatör kaspazlardır. Bu iki yol birleşir ve aktif-kaspaz 3 enzimini ve apoptozisin başlamasına neden olur (41, 42, 43). Sunulan çalışmada da, Domitrović et al. (43), Karakus et al. (44), Liu et al. (45), Aram et al. (46), Chan et al. (47), Leu et al. (48), Lu et al. (49), Xie et al. (50) ve Parajuli et

al. (51) bildirdikleri gibi CCl₄ uygulamasından sonra hepatositlerdeki kaspaz-3 aktivitesinin artışı ile örtüşmektedir.

Liu et al. (45) çalışmasında kaspaz 8 aktivitesinin herhangi bir değişiklik görmediğini, Aram et al. (46), Chan et al. (47), Leu et al. (48), Lu et al. (49), Xie et al. (50) ve Parajuli et al. (51) ise kaspaz 8 aktivitesindeki artışı bildirmişlerdir. Ayrıca Liu et al. (45), Xie et al. (50) ve Parajuli et al. (51) çalışmalarında kaspaz 9 aktivitesinde de artış görüldüğünü ifade etmişlerdir. Bu durumun CCl₄'ün hepatositlerin hem intrinsik hem de ekstrinsik yolu kullanarak apoptozu gittiğini göstermiştir. Biberiye ekstraktının, CCl₄ toksikasyonu ile oluşturulan karaciğer hasarını iyileştirici özelliğinde, kaspaz aktivitesine etkisi yönünde yapılmış çalışmalara rastlanılmamıştır. Bu çalışmada biberiye uygulamasına bağlı kaspaz-3 aktivitesinin sınırlı sayıda azaldığı saptandı. Aynı şekilde kaspaz-8 kontrol gruplarında negatifken, CCl₄+Biberiye verilen grupta pozitiflik saptanmıştır. Kaspaz-9 aktivitesinin de kaspaz-3 gibi kısmen azalmış olması, biberiye uygulamasının sınırlı da olsa karaciğer dokusunu koruyabileceğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak, CCl₄ ile birlikte 200mg/kg biberiye ekstresi verilmesinin karaciğer hasarı üzerine iyileştirici etkisi biyokimyasal parametreler ile belirlenirken, histopatolojik lezyonlar üzerine istenilen düzeyde olumlu etkisi gözlenmemiştir. Bu nedenle biberiye ekstresinin farklı sürelerde ve yan etki oluşturmaksızın en iyi sonucu verecek yüksek dozlarda kullanılarak, etkisinin belirlenmesine yönelik yeni araştırmalara ihtiyaç olduğu kanaatine varıldı.

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: 139-154.
3. Muriel P, Mourelle M. Prevention by silymarin of membrane alterations in acute CCl₄ liver damage. *J Appl Toxicol* 1990; 10: 275-279.
4. Basu S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: Eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology* 2003; 189: 113-127.
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: 81-86.
7. Breikaa RM, Algandaby MM, El Demerdash 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: 131-138.
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: 1534-1544.
 11. Kaur G, Jabbar Z, Athar M, Alam MS. PuniFca granatum (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 984-993.
 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: 4791-4795.
 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: 163-170.
 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: 641-649.
 18. 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: 579-587.
 19. Venukumar MR, Latha MS. Hepatoprotective effect of the methanolic extract *Curculigo orchoides* in CCl₄ treated male rats. *Indian J Pharmacol*, 2002; 34: 269-275.
 20. Lv P, Luo HS, Zhou XP et al. Thalidomide prevents rat liver cirrhosis via inhibition of oxidative stress. *Pathol Res Pract* 2006; 202: 777-788.
 21. 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: 4897-4902.
 22. Brattin WJ, Glende EA, Recknagel RO. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *J Free Radical Bio Med* 1985; 1: 27-38.
 23. Yaman D, Atasever A. Karbon tetraklorür ile oluşturulan akut ve kronik karaciğer hasarı üzerine biberiye ekstraktının (*Rosmarinus officinalis*) etkisi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2016; 13(2): 83-100.
 24. Gnanaprakash K, Madhusudhana CC, Ramkanth S. Aqueous extract of *Flacourtia indica* prevents carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rat. *Int J Biol Sci*, 2010; 6: 51-55.
 25. 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.
 26. 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: 146-155.
 27. Löliger J. Natural antioxidants. In: Allen JC, Hamilton RJ (eds), *Rancidity in foods*. Applied Science Publishers, London, 1983; 89-107.
 28. Rižnar K, Čelan Š, Knez Ž et al. Antioxidant and antimicrobial activity of rosemary extract in chicken frankfurters. *J Food Sci* 2006; 71: 425-429.
 29. 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.
 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: 413-427.
 31. Amin A, Hamza AA. Hepatoprotective effects of hibiscus, rosmarinus and salvia on azathioprine-induced toxicity in rat. *Life Sci* 2005; 77: 266-278.
 32. 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: 1397-1406.
 33. Sakr SA, El-Abd SF, Mohamed Osman M, Kandil AK, Helmeys MS. Effect of rosemary on carbontetrachloride-induced hepatotoxicity in albino rats: Histological and Biochemical Studies. *Egypt. J. Exp. Biol* 2010; 6(1): 135-140.
 34. 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: 145-154.
 35. Higuchi H, Gores GJ. Mechanisms of liver injury: an overview. *Curr Mol Med*. 2003; 3: 483-490.
 36. Wright MC, Issa R, Smart DE, Trim N, Murray GI, Primrose JN, Arthur MJ, Iredale JP, Mann DA. Gliotoxin stimulates the apoptosis of human and rat hepatic stellate cells and enhances the resolution of liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2001;121:685-698.
 37. Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* 2004; 39: 273-278.
 38. Bilodeau M. Liver cell death: update on apoptosis. *Can J Gastroenterol* 2003; 17: 501-506.
 39. Leach AP. Apoptosis molecular mechanism for physiological cell death in health and disease. *Clin Lab Sci* 1998; 11: 346-349.
 40. Shi J, Aisaki K, Ikawa Y, Wake K. Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. *Am J Pathol* 1998; 153: 515-525.
 41. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific

- apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . Nature 2000; 403(6765):98.
42. Tao LL, Cheng YY, Ding D, et al. 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.
 43. Domitrović R, Škoda M, Marchesi VV, et al. Rosmarinic acid ameliorates acute liver damage and fibrogenesis in carbon tetrachloride-intoxicated mice. Food and chemical toxicology 2013; 51:370-378.
 44. Karakus E, Karadeniz A, Simsek N ve ark. Protective effect of *Panax ginseng* against serum biochemical changes and apoptosis in liver of rats treated with carbon tetrachloride (CCl₄). Journal of hazardous materials 2011; 195: 208-213.
 45. Liu H, Wang Z, Nowicki MJ. Caspase-12 mediates carbon tetrachloride-induced hepatocyte apoptosis in mice. World Journal of Gastroenterology: WJG 2014; 20(48): 18189.
 46. Aram G, Potter JJ, Liu X, Torbenson MS, Mezey E. Lack of inducible nitric oxide synthase leads to increased hepatic apoptosis and decreased fibrosis in mice after chronic carbon tetrachloride administration. Hepatology 2008; 47(6): 2051-2058.
 47. Chan CC, Lee KC, Huang YH, et al. Regulation by resveratrol of the cellular factors mediating liver damage and regeneration after acute toxic liver injury. Journal of gastroenterology and hepatology 2014; 29(3): 603-613.
 48. Leu JI, Crissey MAS, Taub R. Massive hepatic apoptosis associated with TGF- β 1 activation after Fas ligand treatment of IGF binding protein-1-deficient mice. The Journal of clinical investigation 2003; 111(1):129-139.
 49. Lu B, Xu Y, Xu L, et al. Mechanism investigation of dioscin against CCl₄-induced acute liver damage in mice. Environmental toxicology and pharmacology 2012; 34(2):127-135.
 50. Xie J, Liu J, Chen TM, et al. Dihydromyricetin alleviates carbon tetrachloride-induced acute liver injury via JNK-dependent mechanism in mice. World Journal of Gastroenterology: WJG 2015; 21(18): 5473.
 51. Parajuli DR, Park EJ, Che XH, et al. PF2401-SF, standardized fraction of *Salvia miltiorrhiza*, induces apoptosis of activated hepatic stellate cells in vitro and in vivo. Molecules 2013; 18(2): 2122-2134.