



Sıçanlarda Karbon Tetraklorürün (CCl₄) Neden Olduğu Koagülasyon Bozukluklarında Etil Pirüvatın Etkisi*

Ebru ÇETİN¹✉

1. Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
17.06.2016	10.01.2017	30.10.2017

Öz: Çalışmada, sıçanlarda karbon tetraklorürün (CCl₄) neden olduğu koagülasyon bozukluklarında etil pirüvatın (EP) etkisi araştırıldı. Kırk erkek Sprague Dawley ırkı sıçan dört eşit gruba ayrıldı. Kontrol grubuna 1 ml Ringer laktat solüsyonu 0., 1,5. ve 6. saatlerde periton içi verildi. Karbon tetraklorür grubuna 1.6 g/kg CCl₄ periton içi yolla tek doz verilmesini takiben 1.5 ve 6 saat sonra 1 ml Ringer laktat uygulandı. Etil pirüvat grubuna 40 mg/kg dozda etil pirüvat 0, 1,5 ve 6. saatlerde periton içi enjekte edildi. Etil pirüvat+CCl₄ grubuna ise tek doz 1.6 g/kg CCl₄ uygulamasından 30 dak. önce ve 1 ve 6 saat sonra 40 mg/kg dozda etil pirüvat periton içi uygulandı. Karbon tetraklorür, protrombin zamanı (PTZ) ve aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) değerlerinde uzama (P<0.05), fibrinojen düzeyinde azalma (P<0.05) ve alanin aminotransferaz (ALT) aktivitesinde artma (P<0.05) oluşturdu. Öte yandan, CCl₄ grubuyla karşılaştırıldığında, CCl₄ uygulamasından 30 dak. önce ve 1 ve 6 saat sonra 40 mg/kg dozda verilen etil pirüvat fibrinojen düzeyini artırırken (P<0.05) PTZ ve aPTT sürelerinde ve ALT aktivitesinde azalmaya (P<0.05) neden oldu. Sonuç olarak, etil pirüvatın sıçanlarda CCl₄'ün neden olduğu pıhtılaşma bozuklukları üzerine koruyucu bir etki gösterebileceği tespit edildi. Etil pirüvatın bu etkisi, karaciğer hastalıklarıyla ilişkili pıhtılaşma bozukluklarının önlenmesinde yararlı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Etil pirüvat, Karbon tetraklorür, Pıhtılaşma bozuklukları.

Effect of Ethyl Pyruvate on Carbon Tetrachloride (CCl₄)-Induced Coagulation Disturbances in Rats

Abstract: The effect of ethyl pyruvate (EP) on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced haemostatic disturbances in rats was investigated in this study. Forty male Sprague-Dawley rats were divided into four equal groups. The control group was given intraperitoneally 1 ml of Ringer's lactate solution at 0 h, 1,5 h and 6 hours. The CCl₄ group was treated intraperitoneally with a single dose of 1.6 g/kg CCl₄ followed by the administration of 1 ml Ringer's lactate solution at at 1,5 and 6 hours. The ethyl pyruvate group was injected intraperitoneally with ethyl pyruvate at a dose of 40 mg/kg at 0, 1,5 and 6 hours. The ethyl pyruvate +CCl₄ group were administered intraperitoneally with ethyl pyruvate at a dose of 40 mg/kg at 30 min before and at 1 and 6 h after a single dose of 1.6 g/kg CCl₄ injection. Treatment of CCl₄ prolonged prothrombin time (PT) and activated thromboplastin time (aPTT), decreased fibrinogen level and increased alanine aminotransferase (ALT) activity. On the other hand, the administration of EP intraperitoneally at 30 minutes before, and at 1.5 and 6 h after CCl₄ significantly (P<0.05) decreased PT, aPTT and ALT values and increased (P<0.05) fibrinogen level when compared with CCl₄-treated only group. The results of our study suggest that ethyl pyruvate treatment plays a protective role on CCl₄-induced coagulation disturbances in rats. This effect of ethyl pyruvate may be useful for preventing haemostatic disturbances associated with liver diseases.

Keywords: Carbon tetrachloride, Coagulation disorders, Ethyl pyruvate.

✉ Ebru ÇETİN

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, TÜRKİYE.
e-posta: ecetin@erciyes.edu.tr

*Bu çalışma Uluslararası "Joint Meeting of the FEPS and the Baltic Physiological Societies, FEPS 2015, 26-29 August, Kaunas, Lithuania" Kongresinde poster olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Pirüvik asitin etil esteri olan etil pirüvat kararlı, dayanıklı, çözülebilir bir bileşiktir. Fizyolojik ortamda pirüvik asit, çoğunlukla anyon formu pirüvat olarak hücre içi ve hücreler arası sıvıda yerini alır (1). Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi tarafından güvenilir olarak sınıflandırılmıştır (2). Etil pirüvatın akut böbrek yetmezliği (3), miyokardiyal (4), intestinal (5) ve hepatik iskemi-resperfüzyon hasarı (6), hemorajik (7) ve septik şok (8), akut pankreatit (9) radyasyon hasarı (10) ve akut kronik karaciğer yetmezliği (11) gibi deneysel hayvan modellerinde organ hasarlarına karşı koruyucu rol oynadığı gösterilmiştir.

Karbon tetraklorür (CCl₄) bazı organlar üzerine çeşitli zararlı etkiler yapmakla birlikte en belirgin toksik etkisi karaciğer üzerinedir. Mitokondriyal ve ribozomal değişiklikler ile yağ infiltrasyonu gibi histopatolojik bozukluklardan başka hasarlı hepatositlerde lipit peroksidasyonu, lipit metabolizması bozuklukları ve protein sentezi bozukluklarına neden olur (12). Karaciğer hastalıklarında karaciğerin sentez fonksiyonu bozulduğu için hematolojik sistemde belirgin değişiklikler gözlenir. Bu değişikliklerin en önemlisi prognoz ile de yakından ilişkili olan hemostaz bozukluklarıdır. Faktör VIII dışında tüm pıhtılaşma faktörlerinin karaciğerde sentezlendiği göz önüne alınırsa, protein sentezindeki bozuklukların fibrinojen gibi diğer pıhtılaşma faktörlerinin sentezini de olumsuz yönde etkilemesi kaçınılmazdır. Karaciğer hastalıklarında birçok faktörün pıhtılaşma sistemi üzerine dolaylı ya da dolaysız olarak etkisi vardır. Yapılan çalışmalarda CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarında parankim dejenerasyonu sonucu ekstrinsik ve intrinsik pıhtılaşma faktörlerinin yeterince sentezlenemediği, platelet sayı ve fonksiyonlarında azalma görüldüğü ve dolayısıyla pıhtılaşma mekanizmasının bozulduğu bildirilmiştir (13,14,15,16). Farelerde D-galaktozamin ile oluşturulan akut karaciğer hasarında bazı pıhtılaşma parametrelerinde bozukluklar görüldüğü ve yoğurt uygulamasının bu koagülasyon parametreleri üzerine iyileştirici rol oynadığı tespit edilmiştir (17).

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada ise CCl₄ ile oluşturulan koagülasyon bozukluklarına karşı grelin hormonunun koruyucu rol oynadığı bildirilmiştir (18).

Bu çalışma, sıçanlarda CCl₄ ile deneysel olarak oluşturulan akut karaciğer hasarı sonucu ortaya çıkan pıhtılaşma bozukluklarında etil pirüvat uygulamasının bazı pıhtılaşma parametreleri üzerine etkisi incelenerek, karaciğer hastalıklarında etil pirüvat uygulanmasının ekstrinsik ve intrinsik pıhtılaşma mekanizmaları üzerine olası koruyucu etkisini değerlendirmek amacıyla planlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Araştırmada Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezinden temin edilen 280-320 g ağırlığında 40 adet erkek Sprague Dawley ırkı sıçan kullanıldı. Sıçanlar her grupta 10 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrılarak polietilen kafeslere yerleştirildi. Kontrol grubuna 1 ml Ringer laktat solüsyonu 0., 1,5. ve 6. saatlerde periton içi uygulandı. Karbon tetraklorür grubuna 1.6 g/kg CCl₄ periton içi yolla tek doz verildikten sonra (19) 1.5 ve 6 saat sonra 1 ml Ringer laktat, etil pirüvat grubuna 40 mg/kg dozda etil pirüvat 0, 1.5 ve 6. saatlerde periton içi, etil pirüvat+CCl₄ grubuna ise tek doz 1.6 g/kg CCl₄ uygulamasından 30 dak. önce ve 1 ve 6 saat sonra 40 mg/kg dozda etil pirüvat periton içi yolla verildi (11,20).

Son enjeksiyonun yapılmasından 24 saat sonra bütün hayvanlardan sodyum sitratlı tüplere kan alındı. Alınan kan örneklerinde aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT), protrombin zamanı (PTZ), fibrinojen düzeyi koagulometre (coatron) cihazında, trombosit sayısı ise otomatik kan sayım cihazında (Cymex SE900) belirlendi. Alanin aminotransferaz (ALT) aktivitesi ticari kit (Chema, Italy) kullanılarak spektrofotometrik yöntemle ölçüldü.

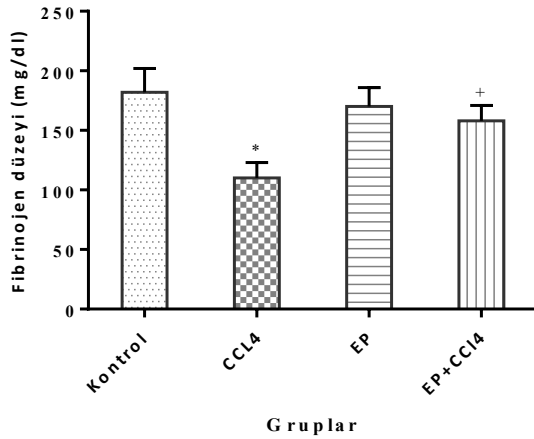
Deney süresince hayvanlar 20-25 °C'de ve 12 saat aydınlık/karanlık periyodunda tutuldu. Yem ve su *ad libitum* olarak verildi. Çalışma, Yerel Etik Kurul onayı çerçevesinde yapıldı (Karar No:2011/48).

İstatistiksel Analiz

İstatistikler, Windows uyumlu SPSS 20.0 istatistik paket programı ile yapıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu One-sample Kolmogorov-Smirnov testi kontrol edildikten sonra gruplar arasında farklılığı tespit etmek için One-Way ANOVA testi ve gruplar arası önemlilik düzeyini belirlemek için de Post-Hoc testlerden Tukey's testi kullanıldı. Sonuçlar aritmetik ortalama ve standart hata şeklinde verildi. Önemlilik düzeyi $P<0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

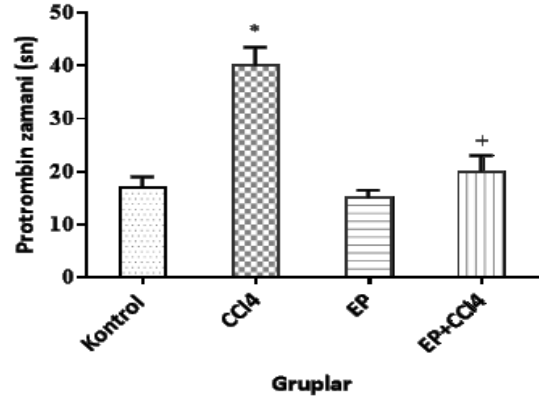
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, CCl_4 grubunda PTZ ve aPTT değerlerinde önemli bir uzama ($P<0.05$) tespit edilirken fibrinojen düzeyinde ise önemli bir azalma ($P<0.05$) kaydedildi (Şekil 1, 2 ve 3). Aynı zamanda, karaciğer hasarının bir göstergesi olan ALT aktivitesinde, kontrol grubuna göre (29.24 ± 2.94) tek doz CCl_4 uygulanan grupta (59.16 ± 3.19) anlamlı bir artma belirlendi ($P<0.05$).



Şekil 1. Kontrol, CCl_4 , EP ve EP + CCl_4 gruplarında ortalama fibrinojen düzeyleri. *: Kontrol grubuna göre farklılık anlamlıdır ($P<0.05$). +: CCl_4 grubuna göre farklılık anlamlıdır ($P<0.05$). EP: Etil piüvat, CCl_4 : Karbon tetraklorür

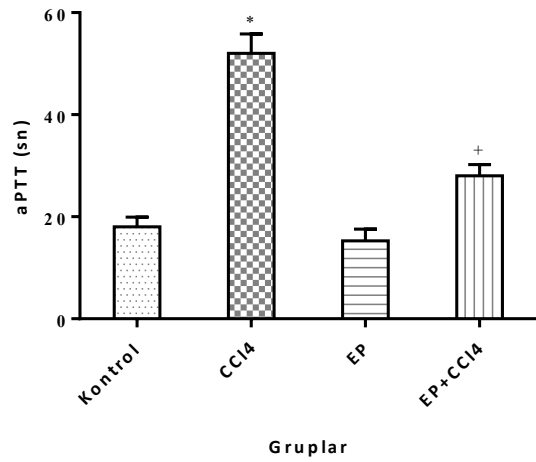
Figure 1. Mean fibrinogen levels in control, CCl_4 , EP and EP+ CCl_4 groups. *: Significantly different from the control group ($P<0.05$). +: Significantly different from the CCl_4 group ($P<0.05$). EP: Ethyl Pyruvate, CCl_4 : Carbon tetrachloride.

Trombosit sayısı açısından gruplar arasında önemli bir fark gözlenmedi ($P>0.05$).



Şekil 2. Kontrol, CCl_4 , EP ve EP + CCl_4 gruplarında ortalama protrombin zamanı. *: Kontrol grubuna göre farklılık anlamlıdır ($P<0.05$). +: CCl_4 grubuna göre farklılık anlamlıdır ($P<0.05$). EP: Etil piüvat, CCl_4 : Karbon tetraklorür

Figure 2. Mean prothrombin time in control, CCl_4 , EP and EP+ CCl_4 groups. *: Significantly different from the control group ($P<0.05$). +: Significantly different from the CCl_4 group ($P<0.05$). EP: Ethyl Pyruvate, CCl_4 : Carbon tetrachloride.



Şekil 3. Kontrol, CCl_4 , EP ve EP + CCl_4 gruplarında ortalama aktive parsiyel tromboplastin zamanı.

*: Kontrol grubuna göre farklılık anlamlıdır ($P<0.05$). +: CCl_4 grubuna göre farklılık anlamlıdır ($P<0.05$).

EP: Etil piüvat, CCl_4 : Karbon tetraklorür, aPTT: Aktive parsiyel tromboplastin zamanı.

Figure 3. Mean activated partial thromboplastin time in control, CCl_4 , EP and EP+ CCl_4 groups. *: Significantly different from the control group

($P<0.05$).⁺ : Significantly different from the CCl₄ group ($P<0.05$). EP: Ethyl Pyruvate, CCl₄: Carbon tetrachloride, aPTT: activated partial tromboplastin time.

Diğer taraftan, CCl₄ grubuyla karşılaştırıldığında, CCl₄ uygulamasından 30 dakika önce ve 1 ile 6 saat sonra 40 mg/kg dozda verilen etil pirüvat'ın fibrinojen düzeyini artırırken PTZ ve aPTT sürelerinde azalmaya neden olduğu tespit edildi (Şekil 1, 2 ve 3). Bulgular ALT aktivitesi açısından incelendiğinde, ALT değerinin CCl₄ grubuna göre, CCl₄ ile beraber etil pirüvat uygulanan grupta (36.12 ± 2.10) önemli düzeyde azaldığı ($P<0.05$) kaydedildi.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Karaciğer, pıhtılaşma süreçlerinde önemli rol oynar. Akut ve kronik karaciğer hastalıklarında, pıhtılaşma ve inhibitör faktörlerin sentezindeki azalma, fibrinolizis, hızlanmış intravasküler koagülasyon ve aktive olmuş faktörlerin klirensinde azalma gibi bir çok faktöre bağlı olarak pıhtılaşma bozuklukları ortaya çıkar (21).

Çalışmamızda, CCl₄ verilen grupta; CCl₄ verilmesinden 24 saat sonra fibrinojen düzeyinde önemli derecede azalma gözlenmesi sıçan ve farelere tek doz CCl₄ verilerek oluşturulan deneysel karaciğer hastalıklarından 24 saat sonra fibrinojen düzeyinde gözlenen azalma bulguları (14,22) ile paralellik göstermektedir. Enzim aktivasyonu sonucu fibrine dönüşerek trombositler ile fibrin ağı oluşturan fibrinojenin plazmadaki düzeyinin azalması pıhtılaşma reaksiyonlarını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle pıhtı oluşumunda görevli bir protein olan fibrinojenin CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarında gözlenen kan seviyesindeki azalma, pıhtılaşma olayının baskılanmasına sebep olmaktadır. Diğer taraftan çalışmamızda, CCl₄ uygulamasından 30 dak. önce ve 1 ve 6 saat sonra 40 mg/kg dozda verilen etil pirüvat'ın fibrinojen düzeyini artırması etil pirüvatın pıhtılaşma sistemi üzerine koruyucu etki yaptığını göstermektedir. Karbon tetraklorür ile oluşturulan karaciğer hasarında parankimal hücrelerin sentez yeteneğinin bozulması

sonucu koagülasyon faktörlerinin azaldığı öne sürülmüştür (13). Bulgularımız, sıçanlarda fibrinojenin yenilenme hızının 23-41 saat olduğu bildirim (23) göz önüne alındığında uygulanan etil pirüvatın parankimal hücrelerin sentezleme yeteneğini artırarak fibrinojenin yenilenmesini hızlandırmak suretiyle CCl₄'ün olumsuz etkisine karşı koagülasyon mekanizmasını koruduğunu düşündürmektedir.

Protrombin zamanı doku tromboplastini varlığında plazmanın pıhtılaşma süresini ölçer ve ekstrinsik ve ortak koagülasyon yolunun etkinliğini yansıtır ve dolayısıyla ekstrinsik ve ortak koagülasyon yollarında bulunan pıhtılaşma faktörlerinin (Faktör I, II, V, VII, X) düzeylerinden etkilenen bir parametredir. Parankimal karaciğer hastalığında protrombin, faktör V, VII, IX, X, XI, XII, XIII, antitrombin III, pre-kallikrein, HMWK, plazminojen konsantrasyonlarında azalma bildirilmiştir (24). Bu azalmalara bağlı olarak PTZ ve aPTT sürelerinde uzama gözlenmektedir. Çalışmamızda CCl₄ verilen grupta kontrol grubuna göre PTZ değerinde önemli bir uzama tespit edilmiştir. Bulgularımıza benzer şekilde, 0.2 ml tek doz CCl₄ uygulanan farelerde 24 saat sonra PTZ'nin uzadığı tespit edilmiştir (14). Sıçanlara günde 10 dk olmak üzere haftada 5 gün 22-40 kez 325 ppm dozunda CCl₄ uygulanmasının protrombin zamanını uzatması (15) bulgularımızla örtüşmektedir. Protrombin zamanındaki uzama ekstrinsik yolda pıhtılaşma reaksiyonlarının baskılandığını göstermektedir. Öte yandan çalışmada CCl₄ verilen gruba etil pirüvat uygulamasının protrombin süresini kontrol grubu değerlerine yaklaştırarak ekstrinsik yol üzerine koruyucu bir etki oluşturduğu saptandı. Lipopolisakkarit ile deneysel olarak oluşturulan endotoksemik rat modelinde, 40 ve 60 mg/kg olmak üzere farklı dozlarda etil pirüvat uygulamasının protrombin süresini kısaltarak ağır sepsis olaylarında koagülasyon bozukluklarını düzeltebileceği ifade edilmiştir (25). Domuzlarda deneysel olarak oluşturulan travmatik hemorajide etil pirüvatın protrombin süresini kısaltarak kan pıhtılaşmasını iyileştirdiği kaydedilmiştir (26). Çalışmada ayrıca,

sadece etil pirüvat uygulamasının PTZ değerinde önemli bir değişiklik oluşturmadığı saptandı.

Çalışmamızda, CCl₄ verilen grubun aPTT değerlerinde PTZ değerlerinde olduğu gibi önemi bir uzama tespit edildi. APTT değerinde uzama intrinsik veya ortak yolda koagülasyon faktörlerinin yetersizliğini göstermektedir (27). Karaciğer hastalıklarında genellikle bu değerde uzamaların görüldüğü bildirilmektedir (24). Sıçanlara tek doz CCl₄ verildikten 12 ve 24 saat sonra aPTT değerinde uzama kaydedilmiş ve CCl₄'ün parankimal hücrelerde hasara neden olarak intrinsik pıhtılaşma faktörlerinde yetmezliğe neden olduğu ileri sürülmüştür (14). Benzer şekilde CCl₄'ün farelerde ve sıçanlarda aPTT değerinde bir uzamaya neden olduğunun tespit edilmesi (15,28) bulgularımızı desteklemektedir. Çalışmada CCl₄ uygulamasından önce ve sonra verilen etil pirüvatın intrinsik pıhtılaşma faktörleri üzerine olumlu etki yaparak aPTT değerini normal değerlere yaklaştırdığı tespit edildi. Literatürde, etil pirüvatın aPTT değeri üzerine etkisine ilişkin herhangi bir veriye rastlanılmadı.

Koagülasyon sürecinde birçok pıhtılaşma faktörlerinin yanı sıra trombositler de önemli rol oynar. Çalışmada, trombosit sayıları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilemedi. Endotoksemik ratlarda yapılan bir çalışmada, etil pirüvatın azalan trombosit sayısını normale yaklaştırdığı rapor edilmiştir (29).

Sonuç olarak, CCl₄ ile akut karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda intrinsik ve ekstrinsik pıhtılaşma mekanizmalarının etkinliğini gösteren PTZ ve aPTT değerlerinde önemli bir uzama gözlemlenirken CCl₄ uygulamasından 30 dak. önce ve 1 ile 6 saat sonra 40 mg/kg dozda verilen etil pirüvatın bu değerleri kontrol grubu değerlerine yaklaştırdığının tespit edilmesi sıçanlarda etil pirüvat uygulamasının muhtemelen karaciğerin sentez aktivitesini artırmak suretiyle koagülasyon sistemi üzerine koruyucu bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Etil pirüvatın bu etkisi, karaciğer hastalıklarıyla ilişkili pıhtılaşma bozukluklarının önlenmesinde yararlı olabilir.

KAYNAKLAR

1. O'Donnell-Tormey J., Nathan CF., Lanks K., DeBoer CJ., de la Harpe J., 1987. Secretion of pyruvate: an antioxidant defense of mammalian cells. *J Exp Med*, 165, 500-514.
2. Uchiyama T., Delude RL., Fink MP., 2003. Dose-dependent effects of ethyl pyruvate in mice subjected to mesenteric ischemia and reperfusion. *Intensive Care Med*, 29, 2050-2058.
3. Salahudeen AK., Clark EC., Nath KA., 1991. Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate in vitro and in vivo. *J Clin Investing*, 88, 1886-1893.
4. Bunger R., Mallet RT., Hartman DA., 1989. Pyruvate-enhanced phosphorylation potential and inotropism in normoxic and postischemic isolated working heart: near complete prevention of reperfusion contractile failure. *Eur J Biochem*, 180, 221-233.
5. Cicalese L., Lee K., Schraut W., Watkins S., Borle A., Stanko R., 1999. Pyruvate prevents ischemia-reperfusion mucosal injury of rat small intestine. *The Am J Surg*, 171, 97-100.
6. Sileri P., Schena S., Morini S., Rastellini C., Pham S., Benedetti E., Cicalese L., 2001. Pyruvate inhibits hepatic ischemi reperfusion injury in rats. *Transplant*, 72, 27-30.
7. Tawadrous ZS., Delude RL., Fink MP., 2002. Resuscitation from hemorrhagic shock with Ringer's ethyl pyruvate solution improves survival and ameliorates intestinal mucosal hyperpermeability in rats. *Shock*, 17, 473-477.
8. Ulloa L., Ochani M., Yang H., Tanovic M., Halperin D., Yang R., Czura CJ., Fink MP., Tracey KJ., 2002. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *PNAS*, 99, 12351-12356.
9. Yang R., Uchiyama T., Alber SM., Han X., Watkins SK., Delude RL., Fink MP., 2004. Ethyl pyruvate ameliorates distant organ injury in a murine model of acute necrotizing pancreatitis. *Crit Care Med*, 32, 1453-1459.
10. Epperly M., Jin S., Nie S., Cao S., Zhang X.,

- Francicola D., Wang H., Fink MP., Greenberger JS., 2007. Ethyl pyruvate, a potentially effective mitigator of damage after total-body irradiation. *Radiat Res*, 168, 552-559.
11. Wang LV., Wang LK., Chen H., Fan C., Li X., He CM., Gong ZJ., 2012. Ethyl pyruvate protects against experimental acute-on-chronic liver failure in rats, *World J Gastroenterol*, 18, 5709-5718.
12. Hatch GE., Santrock J., Slade R., Hayes JM., 1988. Detection of CCL4-induced oxidation of hepatic tissue in vivo by oxygen-18 tracing. *Toxicol Appl Pharmacol*, 93, 81-88.
13. Okazaki M., Zhang LS., Suzuki M., Sakamoto K., 1988. The measurement of platelet aggregation and ATP-release in mice with liver damage induced by carbontetrachloride (CCl4) using a whole blood aggregometer. *Jpn J Pharmacol*, 48, 407-15.
14. Okazaki M., Furuya E., Shin Y., Sakamoto K., 1986. Studies on alterations in blood coagulative and fibrinolytic activities after single and multiple administrations of carbontetrachloride in mice. *Jpn J Pharmacol*, 41, 447-458.
15. Vazquez C., Bujan J., Vallejo D., 1990. Blood coagulation variations induced by carbontetrachloride inhalation in Wistar rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 103, 206-213.
16. Sakamoto K., Otsuka K., Kasahara T., Abe K., 1986. Effect of carbontetrachloride on blood coagulation and fibrinolytic activities in rats. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 88, 255-262.
17. Haro C., Lazarte S., Zelaya H., Alvarez S., Agüero G., 2009. Yogurt: Effect on leukocytes and blood coagulation in an acute liver injury model. *J Med Food*, 12, 796-802.
18. Arıcı OF., Çetin N., 2011. Protective role of ghrelin against carbontetrachloride (CCl4)- induced coagulation disturbances in rats. *Regul Pept*, 166, 139-142.
19. Çetin E., Kanbur M., Çetin N., Eraslan G., Atasever A., 2011. Hepatoprotective effect of ghrelin on carbontetrachloride-induced acuteliver injury in rats. *Regul Pept*, 171, 1-5.
20. Lee L., Kwon W., Jo Y., Suh G., Youn Y., 2008. Protective effects of ethyl pyruvate treatment on paraquat-intoxicated rats. *Hum Exp Toxicol*, 27, 49-54.
21. Amitrano L., Guardascione MA., Brancaccio V., Balzano A., 2002. Coagulation disorders in liver disease. *Semin Liver Dis*, 22, 83-96.
22. Ishii H., Kuboki M., Ohkura M., Hiraishi S., Tsubouchi J., Kazama M., 1985. Effect of intraperitoneal injection of topical thrombin on the coagulation and fibrinolysis of rabbits with experimental liver damages. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 85, 97-110.
23. Nieuwenhuizen W., Emeis JJ., Vermond A., Kurver P., van der Heide D., 1980. Studies on the catabolisms and distribution of fibrinogen in rats. *Biochem Biophys Res Comm*, 97, 49-55.
24. Kelly DA., Tuddenham EG., 1986. Haemostatic problems in liver disease. *Gut*, 27, 339-349.
25. Kung CW., Lee YM., Yen MH., 2011. In vivo anticoagulant effect of ethyl pyruvate in endotoxemic rats. *Thromb Res*, 127, 582-588.
26. Dong W., Cai B., Pena G., Pisarenko V., Vida G., Doucet D., Lee M., Sharpe S., Lu Q., Xu DZ., Ramos L., Deitch EA., Ulloa L., 2010. Ethyl pyruvate prevents inflammatory responses and organ damage during resuscitation in porcine hemorrhage. *Shock*, 34, 205-213.
27. Duncan JR., Prasse KW., Mahaffey EA., 1986. Erythrocytes. 2nd ed., 7-9, *Veterinary laboratory medicine clinical pathology*, Iowa State University Press, Ames, Iowa.
28. Yoshiyuki T., Yoshikazu O., Takemi Y., 2006. Effects of two formulations of combination drug (liver extract and flavin adenine dinucleotide sodium), acelart and adelavin, on carbontetrachloride-induced experimental hepatic dysfunction and weight in riboflavin deficient rats. *Jpn Pharmacol Ther*, 34, 669-674.
29. Wang W., Zhao F., Fang Y., Li X., Shen L., Coa T., Zhu H., 2013. Glycyrrhizin protects against porcine endotoxemia through modulation of systemic inflammatory response. *Crit Care*, 17, R44.