

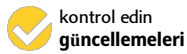


Makale

CCl₄ Tarafından Neden Olunan Kronik Karaciğer Hasarını Önleyici Ajanlar Olarak Zencefil (*Zingiber officinale* Roscoe) ve Limon (*Citrus limon* L.) Suları: Biyokimyasal ve Histolojik Bir Çalışma

Oussama Bekkouch^{1,*}, Mohammed Dalli^{1,*}, Mohamed Harnafi¹, Ilham Touiss¹, Imane Mokhtari¹, Soufiane El Assri², Hicham Harnafi¹, Mohammed Choukri^{2,3}, Seok-Jae Ko⁴, Bonglee Kim^{5,*} ve Souliman Amrani¹

- ¹ Biyokaynaklar, Biyoteknoloji, Etnofarmakoloji ve Sağlık Laboratuvarı, Fen Fakültesi, Mohammed First Üniversitesi, Oujda 60000, Fas; harnafimohamed01@gmail.com (M.H.); touissilham@gmail.com (I.T.); imane.mokhtari15@hotmail.com (I.M.); hhicham02@gmail.com (H.H.); amrani137@yahoo.fr (S.A.)
- ² Biyokimya Laboratuvarı, Mohammed VI Üniversite Hastanesi Merkezi, BP 4806, Oujda 60000, Fas; elassri.bio@gmail.com (S.E.A.); choukrimohammed@hotmail.com (M.C.)
- ³ Tıp ve Eczacılık Fakültesi, Mohammed First Üniversitesi, Oujda 60000, Fas
- ⁴ Gastroenteroloji Bölümü, Kore Tıp Fakültesi, Kyung Hee Üniversitesi, Seul 02447, Kore; kokoko119@khu.ac.kr
- ⁵ Patoloji Bölümü, Kore Tıp Fakültesi, Kyung Hee Üniversitesi, Seul 02447, Kore
- * İletişim: oussamabekkouch@hotmail.fr (O.B.); m.dalli@ump.ac.ma (M.D.); bongleekim@khu.ac.kr (B.K.)

kontrol edin
güncellemeleri

Alıntı: Bekkouch, O.; Dalli, M.; Harnafi, M.; Touiss, I.; Mokhtari, I.; Assri, S.E.; Harnafi, H.; Choukri, M.; Ko, S.-J.; Kim, B.; et al. Zencefil (*Zingiber officinale* Roscoe) ve Limon (*Citrus limon* L.) Suları CCl₄ Tarafından Neden Olunan Kronik Karaciğer Hasarını Önleyici Ajanlar Olarak: Biyokimyasal ve Histolojik Bir Çalışma. *Antioksidanlar* **2022**, *11*, 390. <https://doi.org/10.3390/antiox11020390>

Akademik Editör: Stanley Omaye

Alındığı tarih: 26 Ocak 2022

Kabul Tarihi: 13 Şubat 2022

Yayın tarihi: 15 Şubat 2022

Yayıncının Notu: MDPI, yayınlanan haritalar ve kurumsal bağlantılarla ilgili yargı hakları konusunda tarafsız kalır.



Telif Hakkı: © 2022 yazarlar. Lisans sahibi MDPI, Basel, İsviçre. Bu makale, Creative Commons Attribution (CC BY) lisansının (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) şart ve koşulları altında dağıtılan açık erişimli bir makaledir.

Özet: *Zingiber officinale* Roscoe ve *Citrus limon* L., çok yönlü kullanımları ve birçok hastalığın tedavisinde farmakolojik etkileriyle bilinmektedir. Bu çalışma, zencefil ve limon suyu özlerinin kimyasal bileşimini araştırmayı ve ayrıca, tedavi edilen hayvanlara CCl₄ enjeksiyonu ile indüklenen Wistar sıçanlarının karaciğer hasarına karşı antioksidan özelliklerini ve hepatoprotektif etkilerini değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Elde edilen etkiler, kaydedilen farmakolojik etkilerin daha iyi doğrulanması için histolojik bir çalışma ile tamamlanmıştır. Zencefil suyu özütünün 4-gingerol, 6-gingediol ve 6-gingerol açısından zengin olduğu bulunurken, limon suyu özütünün kimyasal bileşimi eriodyctiol, rutin, hesperidin ve isorhamnetin varlığı ile öne çıkmıştır. Antioksidan aktivite ile ilgili olarak, zencefil, limon suyu özleri ve bunların formülasyonu, TAC (toplam antioksidan kapasite), radikal DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) karşı antiradikal aktivite ve ferrik indirgeme gücü kullanılarak önemli bir antioksidan potansiyel göstermiştir. Son olarak, zencefil, limon ve bunların farklı dozlardaki formülasyonları, CCl₄ kaynaklı karaciğer hasarını önleyebildi. Gerçekten de, bu farklı biyoaktif bileşikler, kronik karaciğer hastalıklarının tedavisi için alternatif ajanlar olarak kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: *Zingiber officinale*; *Citrus limon*; sinerji; antioksidan; hepatoproteksiyon; CCl₄; karaciğer hasarı

1. Giriş

Karaciğer, başta metabolik fonksiyonlar olmak üzere, safra salgısı, ksenobiyotik detoksifikasyon ve atılım gibi birçok fonksiyonu yerine getiren büyük bir bezdir [1]. Ancak, karaciğerin bütünlüğü, genellikle hepatotoksisite terimi altında toplanan siroz, steatoz ve nekroza neden olabilen çeşitli toksik dış etkenler (ilaçlar, endüstriyel ürünler, ağır metaller vb.) tarafından tehdit edilmektedir [2].

Genel olarak, hepatotoksik ajanlara akut veya kronik maruz kalma, serbest radikallerin aşırı üretimi nedeniyle hepatik pro/antioksidan dengesinin bozulmasına neden olur. Bu serbest radikaller, her türlü molekülü veya hücreyi değiştirebilir ve uzun vadede geri dönüşü olmayan çok ciddi hasara neden olabilir, bu hasar yapısal veya işlevsel düzeyde olabilir [3]. Bu nedenle, karaciğer vücudun işleyişinde çok önemli bir metabolik kavşak noktası olduğundan, vücudun homeostazisini korumak için karaciğerin iyi durumda olması çok önemlidir. Bu nedenle,

Sentetik veya doğal kaynaklı belirli tıbbi maddeler kullanarak karaciğeri, onu etkileyebilecek toksik saldırılara ve hepatik patolojilere karşı korumak anlamlıdır [4].

Tıbbi bitkiler, dünya çapında yeni ilaçların değerli kaynaklarıdır [5,6]. Avrupa'da 1300'den fazla tıbbi bitki kullanılmaktadır ve bunların %90'ı yabancı kaynaklardan toplanmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde, en çok reçete edilen 150 ilacın yaklaşık 118'i doğal kaynaklara dayanmaktadır [7]. Ayrıca, gelişmekte olan ülkelerdeki insanların %80'i birincil sağlık hizmetleri için bitkisel ilaçlara bağımlıdır ve gelişmiş ülkelerde reçete edilen ilaçların %25'inden fazlası yabancı bitki türlerinden elde edilmektedir [8].

Afrika'da genel olarak ve özellikle Fas'ta ve birçok gelişmekte olan ülkede olduğu gibi, birçok hasta çeşitli sağlık sorunlarıyla başa çıkmak için geleneksel ilaçları kullanmaktadır [9]. *Zingiber officinale* Roscoe, zencefil olarak da bilinen, Güney Asya'da doğal olarak yetişen aromatik, rizumlu, çok yıllık bir bitkidir [10]. Çin'de, geleneksel bitkisel tedavinin önemli bir parçasıdır [11]. Ayrıca zencefil, genel olarak dünya mutfağında ve özellikle Fas'ta referans baharatlardan biri olarak kabul edilir [12]. Bu bitki, hipolipidemik etki [12-14], antioksidan aktivite [14-17], antidiyabetik etki [18,19] ve antikanser aktivite [15] gibi birçok farmakolojik etki ile karakterizedir.

Bilimsel adı *Citrus limon* L. olan limon, Rutaceae familyasına ait bir meyvedir [20], Güneydoğu Asya'ya özgü bir çalıdır ve Akdeniz kıyılarında ve yarı tropikal iklime sahip dünyanın tüm bölgelerinde yetiştirilir [21]. Limonun, antiinflamatuvar etki [22,23], lipid düşürücü aktivite [24], antioksidan aktivite [25,26], antikanser ve antimikrobiyal etkiler [26] gibi birçok yararlı fizyolojik etkisi olduğu bilinmektedir.

Bu çalışma, limonun antioksidan ve hepatoprotektif etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

Z. officinale, *C. limon* ve bunların formülasyonu. CCl₄ tarafından hepatositlerde üretilen oksidatif stres belirteçleri araştırıldı. Kaydedilen etkileri doğrulamak için karaciğerin histolojik bir çalışması değerlendirildi. Son olarak, elde edilen farmakolojik aktivitelerden sorumlu biyoaktif bileşiklerin daha iyi belirlenmesi için HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) kullanıldı.

2. Malzeme ve Yöntemler

2.1. Bitki Malzemesi

Zencefil (*Zingiber officinale* Roscoe) ve limon meyvelerinin (*Citrus limon* L.) rizomları, Oujda şehrindeki bir şifalı bitki satıcısından satın alındı. Botanik tanımlama, Rabat'taki bilimsel enstitüden nitelikli bir botanikçi olan Profesör Fennane Mohammed tarafından değerlendirildi. Bir numune, Mohamed Premier Üniversitesi (Oujda, Fas) Fen Fakültesi herbaryumuna sırasıyla (HUMPOM-352) ve (HUMPOM-450) referans numaralarıyla teslim edildi.

2.2. *Zingiber officinale* (GJ) ve *Citrus limon* (LJ) Meyve Sularının Hazırlanması

İki bitkiden meyve suyu çıkarmak için, bitki materyali bir karıştırıcıda oda sıcaklığında (25 °C) meyve suyu çıkana kadar ezildi. Ardından, elde edilen karışım süzülerek meyve suyu çıkarıldı. Son olarak, toplanan sıvı fırına koyularak kurutuldu.

2.3. İkincil Metabolitlerin Miktarının Belirlenmesi

2.3.1. Toplam Polifenol İçeriği

Zencefil ve limon sularının toplam polifenol içeriği [27]'ye göre belirlendi; burada 1 mL Folin-Ciocalteu reaktifi (0,2 N) alındı ve her bir konsantrasyondaki zencefil suyu veya limon suyu ile 200 µL karıştırıldı. Karışım yaklaşık 5 dakika inkübe edildikten sonra, tüm tüplere 800 µL sodyum karbonat sulu çözeltisi (7,5% w/v) eklendi ve yaklaşık bir saat inkübasyona bırakıldı. Tüm ölçümler üç kez tekrarlandı.

Absorbans, boş numuneye karşı 760 nm'de ölçüldü. Polifenol toplam miktarının belirlenmesinde daha sonra kullanılmak üzere kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında gallik asit (GA) kullanıldı. Elde edilen değerler mg GA/g bitki özütü olarak ifade edildi.

2.3.2. Zencefil ve Limon Suyunun Toplam Flavonoidleri

Toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi, 430 nm'de maksimum absorpsiyona sahip bir flavonoid alüminyum kompleksinin oluşumuna dayanmaktadır. 500 µg/mL konsantrasyonda 200 µL meyve suyu, 1 mL damıtılmış su ve 50 µL sodyum nitrat (5%, w/v) karıştırıldı ve 6 dakika inkübe edildi. Ardından, reaksiyon karışımına 120 µL alüminyum klorür (10%, w/v) ilave edildi. 5 dakika boyunca ikinci bir inkübasyon gerçekleştirildi ve ardından 400 µL NaOH (1 M) ilave edilerek bazlaştırma yapıldı. Tüm ölçümler üç kez tekrarlandı. Absorbans, boş numuneye karşı 430 nm'de ölçüldü. Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için quercetin (QE) kullanıldı. Toplam flavonoid içeriği, bitki özütünün QE/g cinsinden ifade edildi.

2.4. Zencefil ve Limon Suyunun Kalitatif ve Yarı Kantitatif Analizi

Zencefil ve limon özlerinde bulunan fenolik bileşiklerin kalitatif analizi, bir kütle spektrometresi ile birleştirilmiş yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sistemi (Waters Alliance 2695 sistemi, Milford, MA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırma, ters faz C18 kolonu (250 × 4,6 mm, 5 µm gözenek boyutu) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Mobil faz, çözücü A: su-formik asit (90:10 (v/v)) ve çözücü B: su, metanol, asetonitril (40:50:10 (v/v/v)) içermektedir. Fenolik bileşikler, 20 dakika boyunca %88 A ve %12 B ile elüe edildi, ardından 10 dakika boyunca %100 B ve son olarak 15 dakika boyunca %88 A ve %12 B ile elüe edildi. Elüent akış hızı 1 mL/dk idi ve enjekte edilen hacim 20 µL idi. Tüm analizler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Standart çözeltiler ve zencefil ve limon özleri (GJ ve LJ) saf metanol içinde çözüldü ve millipore membran (0,45 µm) ile süzüldü.

2.5. Antioksidan Aktivite

2.5.1. DPPH'ye Karşı Antiradikal Temizleme Etkinliği

Zencefil ve limon suyunun antiradikal potansiyelinin değerlendirmesi (Manzocco et al., 1998) uyarınca gerçekleştirilmiştir. Her konsantrasyondan 200 µL pipetle alınarak 1,8 mL DPPH (0,5 mM) ile karıştırılmıştır. 30 dakikalık inkübasyondan sonra, reaksiyon karışımının absorbansı 517 nm'de ölçülmüştür. DPPH serbest radikallerinin inhibisyon yüzdesi aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır:

$$\text{İnhibisyon Yüzdesi} = \frac{(\text{Abs kontrol} - \text{Abs numune})}{\text{Kontrol Abs}} \times 100 \quad (1)$$

Abs kontrolü, DPPH'nin absorbansıdır ve Abs numunesi, 517 nm'de test edilen DPPH ve ekstraktların absorbansıdır.

2.5.2. Demir İndirgeme Gücü Testi (FRAP)

FRAP testi, Dehpour ve ark. [28] tarafından açıklanan protokole göre değerlendirilmiştir. Bunun için, her konsantrasyondan 500 µL, 1,25 mL fosfat tamponu (0,2 M; pH 6,6) ve 1,25 mL K₃ Fe(CN)₆ (1%, w/v) ile karıştırılmıştır. Ardından, elde edilen karışım 50 °C'de yaklaşık 20 dakika inkübe edilmiştir. Soğuduktan sonra reaksiyon, aşağıdakilerin eklenmesiyle durdurulmuştur 1,25 mL trikloroasetik asit (ağırlıkça %10). Ardından, karışım 1107 × g'de yaklaşık 10 dakika santrifüjlendi. Daha sonra, her konsantrasyondan 1,25 mL süpernatant alındı ve 1,25 mL damıtılmış su ve 0,25 mL ferrik klorür çözeltisi (FeCl₃) (a/h %0,1) ile karıştırıldı. Karışımın absorbansı, boş numuneye karşı 700 nm'de ölçüldü. Tüm ölçümler üç kez tekrarlandı.

2.5.3. Toplam Antioksidan Kapasite (TAC)

Zencefil ve limon sularının toplam antioksidan kapasitesi fosfomolibdat yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Bu yöntem, iyon molibdat MoO₄²⁻ olarak bulunan molibden (VI)'in, asit pH'da fosfat/Mo(V) ile yeşil renkli bir kompleks oluşturarak molibdat Mo(V) MoO₂⁺ya indirgenmesine dayanır. Her birinden 300 µL hacimde

konsantrasyonu, 3 mL reaktif çözeltisi (0,6 M sülfürik asit, 28 mM sodyum fosfat ve 4 mM amonyum molibdat) ile karıştırıldı. Farklı tüpler daha sonra 95 °C'de yaklaşık 90 dakika inkübe edildi. Soğuduktan sonra, farklı çözeltilerin absorbanansı 695 nm'de boşluğa karşı ölçüldü. Antioksidan toplam kapasitesi, mg eşdeğer askorbik asit/mg kuru ağırlık (mg EAA/g DW) olarak sunuldu. Tüm ölçümler üç kez tekrarlandı.

2.6. Hepatoprotektif Aktivite

Zencefil ve limon suyunun sıçanlarda CCl₄ ile indüklenen akut karaciğer hasarına karşı hepatoprotektif etkisi:

2.6.1. Hayvanlar

Bu deneylerde kullanılan Wistar sıçanları (250–300 g), Oujda Fen Fakültesi hayvan barınağından temin edildi. Sıçanlar, 25 ± 2 °C sıcaklıkta ve 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsünde, çevre kontrollü bir odada tutuldu. Sıçanlara yiyecek ve su serbestçe verilmiştir. 10 günlük adaptasyon döneminden sonra, sıçanlar rastgele on üç gruba ayrılmıştır (*n* = 6, her grupta 3 erkek ve 3 dişi).

2.6.2. Etik Onay

Çalışma, ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri'nin kılavuzlarına göre yürütülmüş ve Oujda'daki Mohammed the First Üniversitesi Fen Fakültesi Bilimsel Araştırma Dekan Yardımcısı tarafından onaylanmıştır. Nitekim, Oujda Mohammed the First Üniversitesi Fen Fakültesi Bilimsel Araştırma Dekan Yardımcısı, imzalı ve mühürlü bir sertifika ile hayvan deneyleri standartlarına tam olarak uyulduğunu onaylamış ve doğrulamıştır. Bu sertifika, mevcut çalışma sırasında gerçekleştirilen tüm hayvan deneylerinin uluslararası kabul görmüş Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzu'na uygun olarak yapıldığını teyit etmektedir.

2.6.3. Deney Tasarımı

Tedavi edilen gruplara, karaciğer hasarını indüklemek için haftada bir kez CCl₄ (1 mL/kg BW) (zeytinyağında çözülmüş %25 CCl₄, v/v) intraperitoneal olarak enjekte edildi. Hayvanların vücut ağırlıkları tedavi öncesinde ve sonrasında ölçüldü. Hayvanlar, her biri 6 Wistar sıçan içeren 9 farklı gruba ayrıldı:

Grup 1: damıtılmış su (10 mL/kg) ile zorla beslenen kontrol grubu; Grup 2: damıtılmış su (10 mL/kg) ile zorla beslenen ve ardından CCl₄ (1 mL/kg) enjekte edilen negatif kontrol grubu; Grup 3: zencefil suyu özütü (200 mg/kg) ile tedavi edilen ve ardından CCl₄ enjekte edilen grup; Grup 4: zencefil suyu özütü (400 mg/kg) ile tedavi edilen ve ardından CCl₄ enjekte edilen grup; Grup 5: limon suyu özütü (200 mg/kg) ile zorla beslenen ve ardından CCl₄ enjekte edilen grup; Grup 6: limon suyu özütü (200 mg/kg) ile zorla beslendi ve ardından CCl₄ enjekte edildi; Grup 7: zencefil suyu özütü ve limon suyu özütü (200 mg/kg) ile zorla beslendi ve ardından CCl₄ enjekte edildi; Grup 8: zencefil suyu özütü ve limon suyu özütü (400 mg/kg) ile zorla beslendi ve ardından CCl₄ enjekte edildi; Grup 9: "Silymarin" (40 mg/kg) ile tedavi edildi ve ardından CCl₄ enjekte edildi.

2.6.4. Histopatolojik Çalışma

Hayvanın kesiminden sonra toplanan organlar tartıldı ve 3 gün boyunca %10 formalin içinde saklandı. Boyuna kesitlerin gerçekleştirilmesi için kullanılan yöntem parafin gömme tekniğiydi. Histopatolojik çalışma şu şekilde gerçekleştirildi: kısaca, organlar 30 dakika boyunca çift damıtılmış su ile temizlendi. Ardından, etanol çözeltisinin yüzdesini artırarak (sırasıyla 30 dakika boyunca %30, 30 dakika boyunca %70, 30 dakika boyunca %95 ve 60 dakika boyunca 2 × %100) dehidre edildi. Toluene gömme aşamasından sonra (2 × 120 dakika), organlar 90 dakika boyunca parafin-toluene karışımı (1 V/1 V) ile gömüldü, ardından parafin (2 × 120 dakika) ile gömüldü, sıçan karaciğerleri 7 µm'de kesilmeden önce parafine gömüldü (Mikrotom Leitz 1512). Son adım, gözlemlenmekten ibaretti.

Hematoksilen-eozin ile boyandıktan sonra fotonik mikroskop (MOTIC, Barselona, İspanya) ile karaciğerin histolojik kesitleri. Fotoğraflar, Olympus (Tokyo, Japonya) ışık mikroskopunun 40× objektif oküler sistemi ile çekildi.

2.7. İstatistiksel Analiz

Tüm deney sonuçları üç kez tekrarlandı ve ortalama \pm SEM olarak ifade edildi. Deney verileri, iki grup arasındaki istatistiksel anlamlılık için eşleştirilmemiş Student t-testi kullanılarak GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad Prism Soft-ware, Inc.: San Diego, CA, ABD) ile değerlendirildi. Ardından, varyans analizi (ANOVA) %95 güven aralığında ($p < 0,05$) Tukey'in ikili karşılaştırma testi ile devam ettirildi.

3. Sonuç

3.1. Zingiber officinale ve Citrus limon'un Ekstraksiyonu ve Kimyasal Bileşimi

Farklı kuru özler, zencefil rizomu ve limon meyvelerini bir karıştırıcıda ezerek elde edildi; elde edilen verim, zencefil suyu ve limon suyu için sırasıyla %2,1 ve %3,08 idi. Zencefil ve limon sularının farklı özlerinin toplam polifenol içeriğinin belirlenmesi, farklı GJ ve LJ özlerinin önemli miktarda polifenol içerdiğini göstermiştir. Böylece, GJ $18,48 \pm 1,14$ mg gallik asit eşdeğeri/g öz içerirken, LJ $25,23 \pm 1,54$ mg gallik asit eşdeğeri/g öz içermektedir.

Flavonoid analizi, önemli miktarda flavonoid içeriği ortaya çıkarmıştır. GJ için kaydedilen değer $7,26 \pm 2,05$ mg eşdeğer quercetin/g ekstrakt iken, LJ için elde edilen değer $12,75 \pm 2,10$ mg eşdeğer quercetin/g ekstrakt (Tablo 1).

Tablo 1. Zingiber officinale ve Citrus limon meyve sularının polifenol ve flavonoid içeriği.

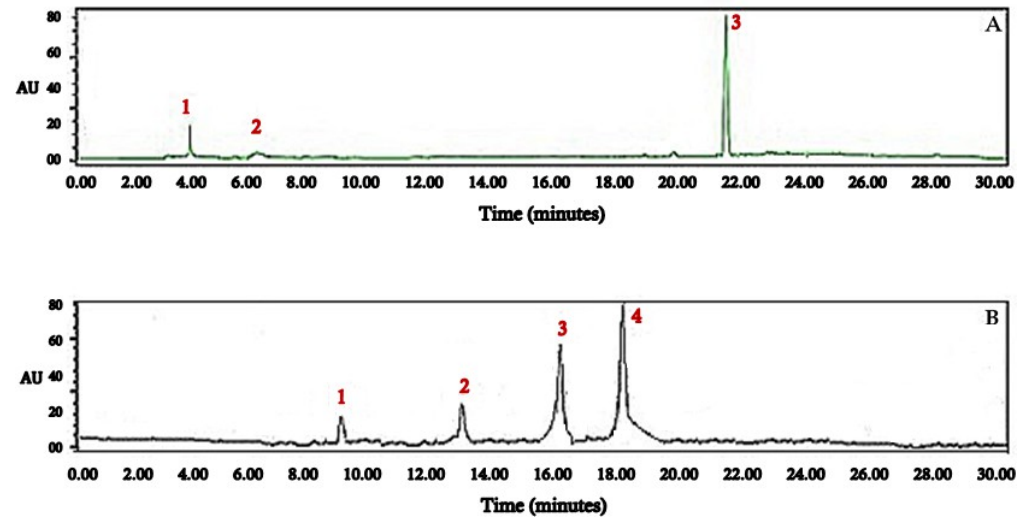
	GJ (mg GAE/g Ekstrakt)	LJ (mg QE/g Ekstrakt)
Toplam polifenol içeriği	$18,48 \pm 1,14$	$25,23 \pm 1,54$
Toplam flavonoid içeriği	$7,26 \pm 2,05$	$12,75 \pm 2,10$

Elde edilen iki ekstraktın (GJ, LJ) HPLC analizi ile ilgili olarak, elde edilen sonuçlar Tablo 2 ve Şekil 1'de gösterilmektedir.

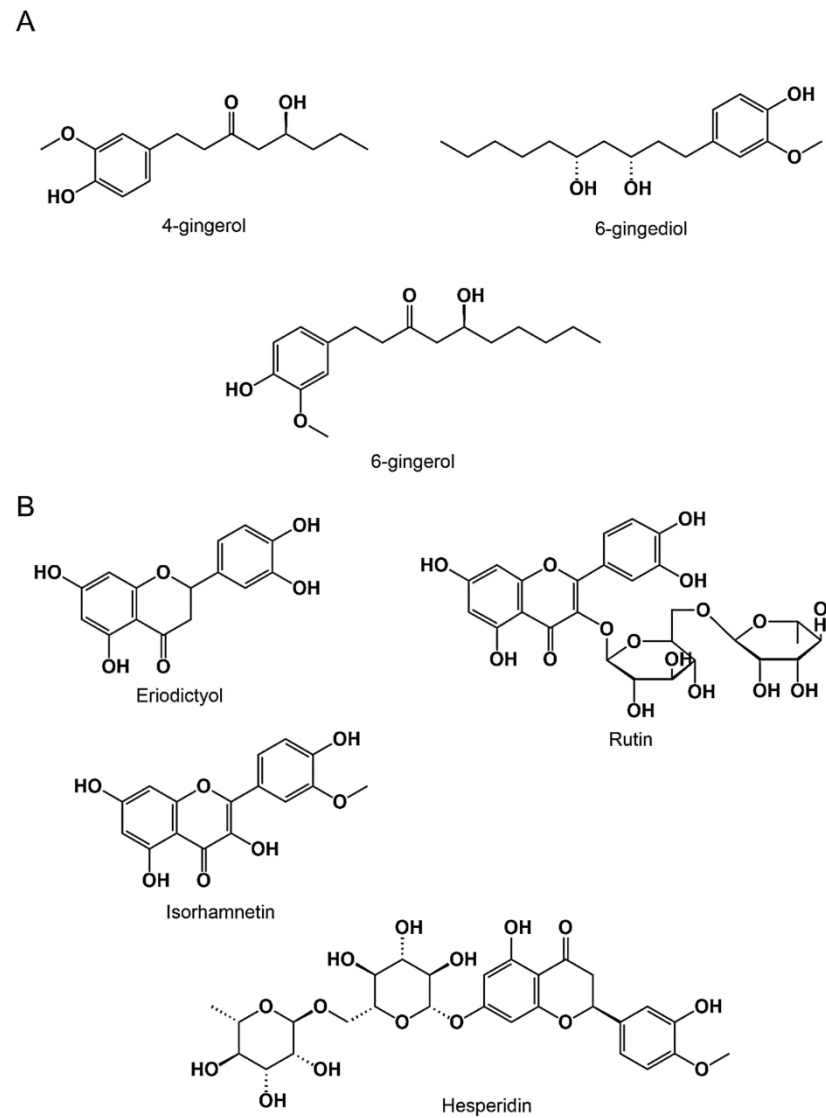
Tablo 2. Zingiber officinale (a) ve Citrus limon (b) meyve sularının kimyasal bileşimi.

(a) Tepe Numarası	Bileşik	Tutma Süresi (dk)	Alan Yüzdesi
1	4-gingerol	3,97	0,81
2	6-gingediol	6,41	0,19
3	6-gingerol	21,60	15,22
(b) En yüksek sayı	Bileşik	Tutulma Süresi (dk)	Alanın %'si
1	eriodictyol	9,17	3,12
2	rutin	13,25	5,69
3	hesperidin	16,31	13,88
4	izorhamnetin	18,23	18,43

Zencefil suyu özütünün 6-gingerol, 4-gingerol ve 6-gingerol açısından zengin olduğu bulunmuştur (Şekil 1A; Tablo 2b; Şekil 2A), limon suyu özütünün kimyasal analizi ise eriodictyol, hesperidin, rutin ve isorhamnetin varlığını ortaya çıkarmıştır (Şekil 1B; Tablo 2a; Şekil 2B).



Şekil 1. *Zingiber officinale* (A) ve *Citrus limon* (B) meyve sularının HPLC-MS kromatogramları.

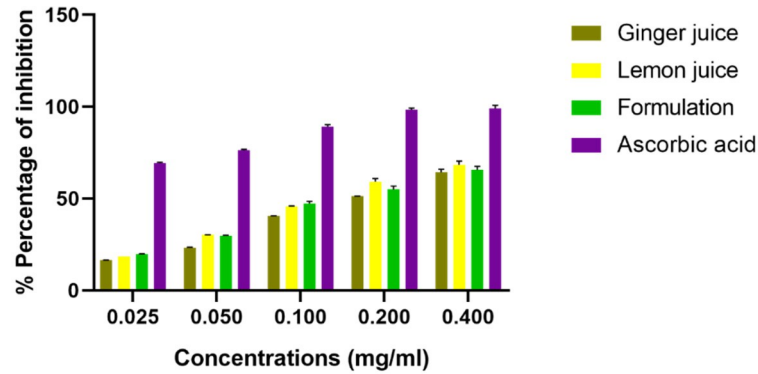


Şekil 2. *Zingiber officinale* (A) ve *Citrus limon* (B) fenolik bileşiklerinin kimyasal yapısı.

3.2. Antioksidan Etkinlik

3.2.1. Radikal Yakalama Aktivitesi

Serbest radikal *DPPH*• kullanılarak yapılan antioksidan aktivite ile ilgili olarak (Şekil 3), elde edilen sonuçlar Şekil 2'de özetlenmiştir. Zencefil ve limonun farklı meyve suyu özlerinin, doza bağlı olarak önemli bir antioksidan aktivite gösterdiği kaydedilmiştir.

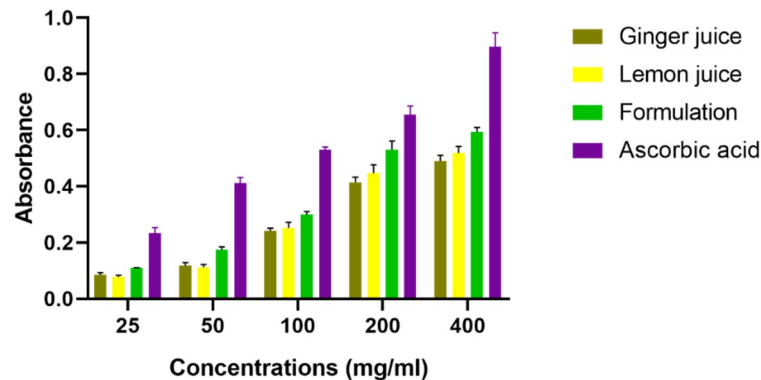


Şekil 3. *Zingiber officinale* ve *Citrus limon* meyve sularının anti-radikal aktiviteleri. Değerler "ortalama ± SEM" olarak ifade edilmiştir; (n = 3).

LJ ekstresi, en yüksek IC_{50} ($16,61 \pm 0,78 \mu\text{g/mL}$) ($p < 0,001$) değerine sahip GJ ekstresine kıyasla en düşük IC_{50} değeri $20,35 \pm 1,51 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$) olan GJ ekstraktına kıyasla en düşük $IC_{(50)}$ değerini verirken, zencefil (50%) ve limon (50%) suyu "F" formülasyonu $18,34 \pm 0,81 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0,01$) IC_{50} değeri ile orta düzeyde bir etki gösterdi. Buna karşılık, askorbik asit $1,83 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$) IC_{50} değeri ile en güçlü antiradikal potansiyeli gösterdi.

3.2.2. Demir İndirgeme Testi

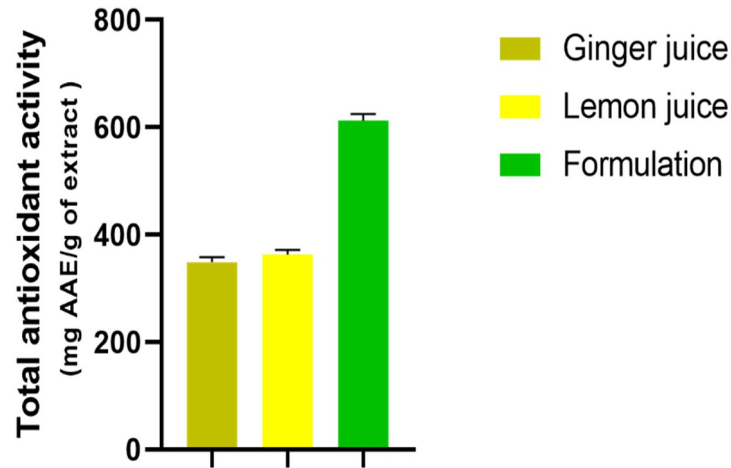
Demir indirgeme gücü testi ile ilgili olarak, elde edilen sonuçlar Şekil 4'te özetlenmiştir. Burada, zencefil, limon ve bunların karışımının, farklı test edilen numunelerde optik yoğunluk seviyesindeki artışla gösterildiği gibi, demir (Fe^{2+}) üzerinde önemli bir indirgeme aktivitesi sergilediği görülmüştür. GJ, düşük absorbans değerleriyle gösterilen en zayıf aktiviteyi vermiştir ve bu, incelenen üç ekstrakt arasında en zayıf aktiviteyi vermiştir. Bunu, orta derecede aktivite veren LJ izlemiştir. İki meyve suyu ekstraktının (50%/50%) formülasyonu ise, Fe^{2+} 'nin yüksek indirgeme kapasitesiyle gösterilen sinerjik bir etki sergilemiştir. Son olarak, kontrol olarak kullanılan askorbik asit, demir(II) iyonunu demir(III) iyonuna indirmek için en iyi indirgeme aktivitesini vermiştir.



Şekil 4. *Zingiber officinale* ve *Citrus limon* özlerinin indirgeme gücü aktivitesi. Değerler "ortalama ± SEM" olarak ifade edilmiştir; (n = 3).

3.2.3. Toplam Antioksidan Aktivite

Toplam antioksidan kapasite (TAC) fosfomolibdat yöntemine göre ölçülmüştür. Zencefil ve limon özlerinin formülasyonları ve toplam antioksidan aktiviteleri ile birlikte sonuçları Şekil 5'te gösterilmektedir. Bu şekilde, farklı özlerin ve formülasyonlarının doz bağımlı ve istatistiksel olarak anlamlı önemli bir antioksidan aktivite sergilediği belirtilmektedir.



Şekil 5. *Zingiber officinale* ve *Citrus limon* özlerinin toplam antioksidan aktivitesi. Değerler "ortalama \pm SEM" olarak ifade edilmiştir; ($n = 3$).

GJ, üç ekstrakt arasında zayıf bir antioksidan etkiye sahip olduğunu gösterdi; değeri 348,70 mg AAE/g ekstrakt idi. Bunu, değeri 363,23 mg AAE/g ekstrakt olan LJ izledi. Formülasyon F ise en iyi sinerjik etkiyi gösterdi; değeri 612,35 mg AAE/g ekstrakt değeri ile en iyi sinerjik etkiyi verdi.

4. Hepatoprotektif Aktivite

Tablo 3, CCl₄ enjeksiyonunun, özler ile tedavi edilmeyen sıçanlarda vücut ağırlığında bir azalmaya neden olduğunu göstermektedir. Ancak, sıçanların zencefil ve limon suyu ile önceden tedavi edilmesi, vücut ağırlığındaki azalmayı önlemiştir. Aynı bulgu, karaciğer ağırlığında ve dolayısıyla hepatik indekste de gözlemlenmiştir.

Tablo 3. *Zingiber officinale* ve *Citrus limon* meyve sularının vücut ağırlığı, karaciğer ağırlığı ve karaciğer indeksi üzerindeki etkisi.

	Sıçanların Ağırlığı (g)	Karaciğer Ağırlığı (g)	Karaciğer İndeksi (%)
Kontrol	253,46	6,85 \pm 0,27	2,7
CCl ₄	194,05 \pm 4,21 ^a	10,24 \pm 0,31 ^a	5,28 ^a
GJ 200	208,91 \pm 3,65 ^c	9,31 \pm 0,22 ^c	4,31 ^c
GJ 400	223,87 \pm 5,72 ^a	8,34 \pm 0,40 ^b	3,73 ^b
LJ 200	210,66 \pm 2,33 ^c	8,89 \pm 0,28 ^b	4,22 ^c
LJ 400	225,90 \pm 4,91 ^a	7,95 \pm 0,71 ^a	3,52 ^b
F 200	219,71 \pm 2,27 ^b	8,10 \pm 0,35 ^a	3,69 ^b
F 400	238,12 \pm 3,98 ^a	7,13 \pm 0,86 ^a	2,99 ^a
Silimarin	225,36 \pm 5,54 ^a	7,77 \pm 0,43 ^a	3,45 ^b

GJ: zencefil suyu; LJ: limon suyu; F: formülasyon; Değerler "ortalama \pm SEM" olarak ifade edilmiştir; CCl₄ grubu kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır; zencefil ve limon suyu ile silimarin tedavisi uygulanan gruplar CCl₄ grubu ile karşılaştırılmıştır; a: $p < 0,001$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,05$; NS: anlamlı değil.

4.1. Biyokimyasal Analizler

Zencefil, limon suyu özleri ve bunların formülasyonu, CCl₄ ile indüklenen karaciğer hasarına karşı hepatoprotektif etkileri açısından değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4'te özetlenmiştir. Karaciğer enzimleri ALP (alkalin fosfataz), Gamma-GT (gama-glutamil transferaz), ALAT (alanin transaminaz), ASAT (aspartat transaminaz), direkt bilirubin ve toplam plazma bilirubin, kontrol grubuna kıyasla CCl₄ ile tedavi edilen tüm hayvanlarda önemli ölçüde ($p < 0,001$) artış göstermiştir. GJ, LJ ve bunların formülasyonları ile zorla beslenen hayvanlarda, karaciğer aktivitesinin ana belirteçleri (ALP, Gamma-GT, ALAT, ASAT, direkt ve toplam bilirubin) (Tablo 3 ve bunların formülasyonları ile zorla beslenen hayvanlarda, negatif kontrol grubu (sadece CCl₄ enjekte edilen sıçanlar) ve Silymarin ilaç grubu ile karşılaştırıldığında, karaciğer aktivitesinin ana belirteçleri (ALP, Gamma-GT, ALAT, ASAT, direkt ve toplam bilirubin) düzeylerindeki artış, önemli ve doza bağlı bir şekilde açıkça önlenmiştir (Tablo 3) ve bu, çok önemli ve istatistiksel olarak anlamlı bir hepatoprotektif etki sağlamıştır.

Tablo 4. *Zingiber officinale* ve *Citrus limon* özlerinin CCl₄ zehirlenmesi olan sıçanlarda karaciğer belirteçleri üzerindeki etkileri.

	ALP (u/L)	G-GT (u/L)	ALAT (u/L)	ASAT (u/L)	D-Bil (mg/L)	T-Bil (mg/L)
Grup 1	183,8 ± 5,37	3,20 ± 0,12	81,34 ± 1,75	90,10 ± 3,51	0,10 ± 0,01	1,00 ± 0,05
Grup 2	527,1 ± 10,4 ^a	11,60 ± 0,85 ^a	1583,9 ± 14,9 ^a	5703,8 ± 11,6 ^a	1,80 ± 0,05 ^a	3,40 ± 0,31 ^a
Grup 3	382,70 ± 6,14 ^a	6,17 ± 0,55 ^a	1469,3 ± 13,8 ^c	1708,03 ± 15,5 ^a	0,47 ± 0,05 ^a	1,60 ± 0,03 ^a
Grup 4	257,21 ± 5,42 ^a	3,60 ± 0,15 ^a	789,1 ± 10,3 ^a	573,3 ± 11,6 ^a	0,20 ± 0,01 ^a	0,90 ± 0,02 ^a
Grup 5	397,00 ± 8,23 ^a	10,58 ± 1,02 ^{NS}	1343,75 ± 12,7 ^c	903,4 ± 12,3 ^a	0,73 ± 0,04 ^a	1,48 ± 0,07 ^a
Grup 6	295,15 ± 4,87 ^a	7,05 ± 0,80 ^b	694,03 ± 9,79 ^a	713,57 ± 9,94 ^a	0,27 ± 0,01 ^a	0,97 ± 0,03 ^a
Grup 7	295,31 ± 7,08 ^a	9,10 ± 0,79 ^c	490,33 ± 9,63 ^a	590,125 ± 10,1 ^a	0,68 ± 0,07 ^a	1,15 ± 0,07 ^a
Grup 8	222,6 ± 6,98 ^a	7,90 ± 0,46 ^b	363,2 ± 3,65 ^a	535,6 ± 7,54 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	0,72 ± 0,03 ^a
Grup 9	194,55 ± 5,72 ^a	37,33 ± 1,81 ^a	188,9 ± 6,54 ^a	205,4 ± 8,12 ^a	4,67 ± 0,73 ^a	3,40 ± 0,25 ^a

Değerler, her partide altı sıçanın "ortalama ± SEM" olarak ifade edilmiştir; Grup 1: damıtılmış su ile zorla beslenen tedavi edilmeyen kontrol grubu; Grup 2: Tedavi edilmeyen grup; CCl₄ + Grup 3: 200 mg/kg dozunda zencefil suyu ekstresi ile tedavi edilen grup; Grup 4: 400 mg/kg dozunda zencefil suyu ekstresi ile tedavi edilen grup; Grup 5: 200 mg/kg dozunda limon suyu özütü ile tedavi edilen grup; Grup 6: 400 mg/kg dozunda limon suyu özütü ile tedavi edilen grup; Grup 7: 200 mg/kg dozunda zencefil suyu ve limon suyu özütü ile tedavi edilen grup; Grup 8: 400 mg/kg dozunda zencefil suyu ve limon suyu özütü ile tedavi edilen grup; Grup 9: 40 mg/kg dozunda silimarin ile tedavi edilen grup. Grup 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 grupları Grup 2 ile karşılaştırılmıştır. a: $p < 0,001$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,05$; NS: anlamlı değil.

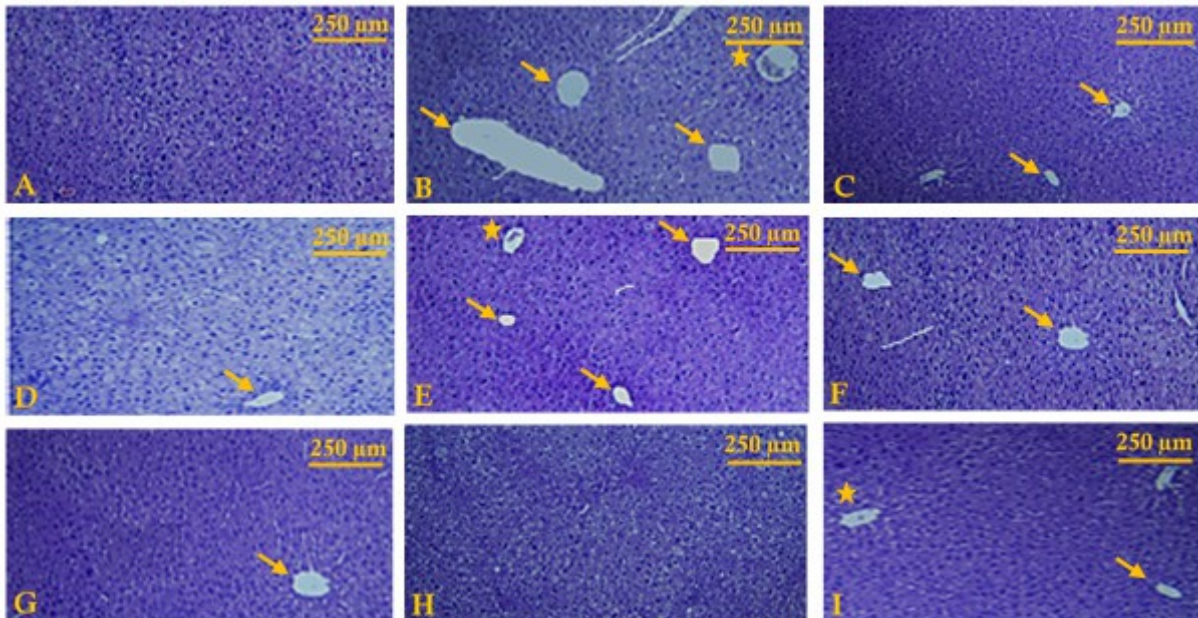
Hem GJ hem de LJ özleri ALP üzerinde önemli etkilere sahipken, formülasyon F, CCl₄ grubu için $527,1 ± 10,4$ u/L ($p < 0,001$) değerinden $295,31 ± 7,08$ u/L ($p < 0,001$) ve 200 ve 400 mg/kg'da sırasıyla $222,6 ± 6,98$ u/L ($p < 0,001$) değerlerine ulaşarak en iyi inhibe edici etkiyi gösterdi. GGT ile ilgili olarak, GJ incelenen ekstraktlar arasında en iyi aktiviteyi gösterdi ve CCl₄ grubunda $11,60 ± 0,85$ u/L ($p < 0,001$) olan GGT artışını 200 ve 400 mg/kg dozlarda sırasıyla $6,17 ± 0,55$ u/L ($p < 0,001$) ve $3,60 ± 0,15$ u/L ($p < 0,001$) seviyesine düşürmüştür. Test edilen tüm ekstraktlar ALAT ve ASAT artışını önleyici etki göstermiştir. Formülasyon kullanılarak tedavi edilen grupta, ALAT'ın CCl₄ grubu için $1583,9 ± 14,9$ u/L ($p < 0,001$) seviyesinden $490,33 ± 9,63$ u/L ($p < 0,001$) seviyesine ve $363,2 ± 3,65$ u/L ($p < 0,001$) değerlerine yükselmesini önlemiştir. ASAT ise CCl₄ grubu için $5703,8 ± 11,6$ u/L ($p < 0,001$) ve 200 ve 400 mg/kg'da sırasıyla $535,6 ± 7,54$ u/L ($p < 0,001$) değerlerine yükselmiştir. Ayrıca, tüm ekstraktlar hem direkt hem de toplam bilirubinlerin (Bil D ve Bil T) artışını önledi; bu etki, F formülasyonu ile tedavi edilen sıçan gruplarında daha belirgindi ve CCl₄ grubu için $1,80 ± 0,05$ mg/L ($p < 0,001$) olan direkt bilirubin seviyesi, $0,68 ± 0,07$ mg/L ($p < 0,001$) ve sırasıyla 200 ve 400 mg/kg'da $0,16 ± 0,01$ mg/L ($p < 0,001$) ve CCl₄ grubunda $3,40 ± 0,31$ mg/L ($p < 0,001$) iken, 200 ve 400 mg/kg'da sırasıyla $1,15 ± 0,07$ mg/L ($p < 0,001$) ve $0,72 ± 0,03$ mg/L ($p < 0,001$) değerlerine düşmüştür. Silimarin ile tedavi edilen kontrol grubu ile ilgili olarak, 25 mg/kg doz ile tedavi edilen grupta önemli bir azalma gösterilmiştir.

CCl₄ ile karşılaştırıldığında - ile tedavi edilen sıçanlara kıyasla ALP düzeylerinde %63,09 ($p < 0,001$), ASAT düzeylerinde %88,07 ($p < 0,001$) ve ALAT düzeylerinde %96,39 ($p < 0,001$) azalma sağlarken, Gamma-GT, direkt ve toplam bilirubin plazma düzeyleri üzerinde herhangi bir inhibe edici etki göstermemiştir (Tablo 2).

Son olarak, zencefil ve limon sularının ve bunların formülasyonunun, doz bağımlı bir şekilde, az ya da çok önemli derecede önemli hepatoprotektif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu da, zencefil ve limon suyu özlerinin karaciğer patolojileri için çok etkili olduğunu söylememizi sağlar.

4.2. Histopatolojik Çalışma

Bu çalışmadan elde edilen biyokimyasal etkiler, farklı sıçanların karaciğerlerinin histolojik incelemesi ile desteklenmiş ve doğrulanmıştır (Şekil 6). Farklı sıçan gruplarının karaciğer dokusunun mikroskopik incelemesi, hepatotoksik ajan (CCl₄) uygulamasının, normal yapıya sahip kontrol grubu ile karşılaştırıldığında karaciğer dokusunun genel morfolojisinde bir değişiklik oluşturduğunu göstermektedir.



Şekil 6. *Zingiber officinale* ve *Citrus limon* özlerinin CCl₄ tarafından indüklenen hepatotoksisiteye etkisi. (A) Kontrol grubu sıçanların karaciğerlerinin normal histolojik yapısını gösteren mikrograf. (B) CCl₄ (1 mg/kg) verilen sıçanlarda, hepatositlerde yağlanma değişikliği ile kendini gösteren ciddi hepatosit hasarı, steatoz (**oklar**) ve kan damarlarında tıkanıklık (**yıldızlar**) ile karaciğer nekrozu alanları görülmüştür. (C–I) CCl₄ + GJ (200 mg/kg) alan sıçanlar, CCl₄ + GJ (400 mg/kg), CCl₄ + LJ (200 mg/kg), CCl₄ + LJ (400 mg/kg), CCl₄ + F (200 mg/kg), CCl₄ + F (400 mg/kg) ve CCl₄ + Silimarin (40 mg/kg) sırasıyla, kontrol grubuyla karşılaştırılabilir bir doku görünümü ve normal histolojik karaciğer yapısı, doz bağımlı bir şekilde steatoz oluşumunda küçük bir etki ve tıkanmış kan damarlarının sayısında bir azalma ile karaciğer dokusunda yarı-rejenerasyon gösterdi.

Bu değişiklikler, damarların basit tıkanmasından nekroz ve hepatoselüler dejenerasyona (yapısal ve işlevsel kayıp) kadar çeşitlilik gösterir. Bununla birlikte, çeşitli dozlarda zencefil ve limon suyu özleri ve bunların formülasyonları ile yapılan tedavi, plazma zarının yenilenmesi ve lobüler yapının onarılmasının ardından karaciğer dokusu neredeyse normal bir karaciğer görünümüne kavuşarak bu değişiklikleri etkili bir şekilde iyileştirebilmiştir.

5. Tartışma

Oksidatif stres, esas olarak oksijen radikalleri ve kimyasal olarak hiper-reaktif radikal olmayan oksijen türevleri olarak tanımlanan reaktif oksijen türlerinin üretimi ile ilgilidir. Oluşan bu radikaller, biyokimyasal süreç sırasında oluşan radikallerin vücuttan atılmasında önemli bir rol oynayan içsel antioksidan sistem tarafından etkisiz hale getirilir [29]. Muazzam içsel antioksidan mekanizmaların varlığına rağmen, oksidatif hasar kaçınılmaz bir sonuç olmaya devam etmektedir. Son zamanlarda, oksidatif stresin çok çeşitli dejeneratif süreçler, hastalıklar ve sendromlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir [30]. Ayrıca, oksidatif stresin kardiyovasküler hastalıklar, solunum bozuklukları, kronik böbrek hastalığı, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi farklı patolojilerle ilişkili olduğu bulunmuştur [31].

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak tanımlanan farklı kimyasal profiller ve antioksidan aktivite ile ilgili olarak, hepatoprotektif etki, fenolik bileşikler ve flavonoidler gibi her bir ekstraktta bulunan farklı biyoaktif bileşiklere atfedilebilir.

LJ ekstresi, sırasıyla $25,23 \pm 1,54$ mg GA/g ekstrakt ve $12,75 \pm 3,08$ mg QE/g ekstrakt eşdeğeri polifenol ve flavonoid içeriği göstermiştir.

Aynı özütün eriodictyol, rutin, hesperidin ve isorham-netin açısından zengin olduğu bulunurken, GJ özütü polifenol ve flavonoid içeriği açısından sırasıyla $18,48 \pm 1,14$ mg GA/g özüt ve $7,26 \pm 2,05$ mg QE/g özüt değerlerine karşılık gelen değerler gösterdi. Kimyasal analiz, 4-gingerol, 6-gingediol ve 6-gingerolün varlığını gösterdi. Sonuçlarımız, zencefil, limon ve bunların formülasyonlarının önemli miktarda fenolik bileşikler ve flavonoidler içerdiğini bildiren Tiencheu ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada elde edilen sonuçlarla oldukça benzerdi [32].

Zencefil ve limon suyunun antioksidan potansiyeli ile ilgili olarak, antioksidan aktivite ilk olarak serbest radikal $DPPH\cdot$, ferrik indirgeme gücü testi ve toplam antioksidan aktivite kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, GJ ve LJ'nin ve farklı konsantrasyonlardaki formülasyonlarının, GJ ve LJ için sırasıyla $20,35 \pm 1,50$ $\mu\text{g/mL}$ ve $16,61 \pm 0,78$ $\mu\text{g/mL}$ IC_{50} değeri ile büyük bir antiradikal temizleme aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir. Bu aktivitenin, test edilen ekstraktların toplam polifenol içeriği ile pozitif korelasyonlu olduğu bulunmuştur. Ayrıca, zencefil ve limon suyu özleri ve bunların formülasyonları, optik yoğunluğun artışı ile gösterilen Fe^{2+} büyük bir indirgeme potansiyeli sergilemiştir ve IC_{50} değeri $403,21 \pm 5,75$ $\mu\text{g/mL}$, $391,17 \pm 3,64$ $\mu\text{g/mL}$ ve GJ, LJ ve formülasyon F'ye atfedilen $188 \pm 2,11$ $\mu\text{g/mL}$. Ayrıca, bir Zencefil ve limonun $IC_{50} = 188 \pm 2,11$ $\mu\text{g/mL}$ ile dönüştürüldüğü F formülasyonu kullanıldığında sinerjik etki gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, zencefil suyunun güçlü antiradikal ve ferrik indirgeme gücü aktivitesine sahip olduğu [33], narenciye suyunun ise önemli bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur [33–35]. Ayrıca, limon suyu ekstresinin antioksidan aktivitesinin Makni ve ark. tarafından sunulan sonuçlara benzer olduğunu belirtmek önemlidir; bu çalışmada limon ekstresinin ferrik indirgeme gücünün 90 $\mu\text{g/mL}$ 'ye eşdeğer olduğu gösterilmiştir [36].

Toplam antioksidan kapasite açısından, GJ, LJ ve bunların formülasyonu, doza bağlı olarak önemli bir antioksidan potansiyel sergilemiştir. Test edilen tüm özler arasında, iki meyve suyunun formülasyonu, ayrı ayrı test edilen her bir özle karşılaştırıldığında etkili bir sinerji göstermiştir.

Nitekim, sulu ekstrakt üzerinde yapılan çalışma, molibden testi kullanılarak test edildiğinde çok etkili bir aktivite gösterirken [37], limon etanol ekstraktlarını inceleyen çalışmalar önemli bir antioksidan potansiyeli ortaya koymuştur [38]. Buna paralel olarak, limon kabuğu ve meyvelerinin yüksek bir toplam antioksidan potansiyeli gösterdiği de ortaya konmuştur [39,40].

Zencefilin başlıca biyoaktif bileşiklerinden biri olan gingeroller, önemli antioksidan özellikler göstermiştir [41,42]. Limon suyu özütünün antioksidan aktiviteleri, HPLC kullanılarak tanımlanan farklı biyoaktif bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Birkaç çalışma, bu farklı molekülleri ayrı ayrı incelemiştir. Örneğin, eriodictyol molekülünün yüksek antioksidan potansiyeli belirtilmişken [43], rutin

2,03 ± 0,01 mmol Trolox'a eşdeğer bir antioksidan aktivite kaydetmiştir [44]. Aynı bağlamda, birkaç çalışma izorhamnetin ve hesperidin antioksidan kapasitesini göstermiştir [45–48].

LJ, GJ ve bunların formülasyonlarının hepatoprotektif aktivitesi, CCl₄ modeli kullanılarak değerlendirilmiştir. Hepatotoksik etki, sitokrom P450 2E1 üzerinde iki reaktif ve oldukça kararsız serbest radikal olan triklorometil radikali (CCl₃ •) ve triklorometil peroksil radikali (Cl₃ COO•) [49]'a indirgenen CCl₄'nin uygulanmasıyla indüklenir. Bu iki kararsız serbest radikalın oluşumu, sitoplazmik ve endoplazmik enzimlerin salınımıyla ilişkili membran lipid peroksidasyonunu indükleyerek hücre hasarının kaynağıdır ve bu da karaciğer yapısı ve işlevinde hasara işaret eder [50]. Karaciğer düzeyinde indüklenen hasar, ASAT, ALAT, ALP ve GGT gibi farklı karaciğer belirteçlerinin yükselmesiyle ortaya çıkar.

Test edilen özlerin hepatoprotektif etkisini daha iyi anlamak için karaciğer enzim belirteçleri ölçüldü. Zencefil, limon ve formülasyonun CCl₄ ile tedavi edilen sıçanlar üzerindeki etkisinin sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir. CCl₄ ile tedavi edilen grupta ($p < 0,001$), damıtılmış su verilen kontrol grubuna kıyasla karaciğer enzim belirteçlerinde önemli bir artış gözlemlenirken, Silymarin (25 mg/kg) ile tedavi sonrası pozitif kontrol grubunda ölçülen farklı belirteçlerde önemli bir azalma gözlemlenmiştir. CCl₄'ün hepatotoksik etkisinin zencefil, limon suyu ve bunların %50/%50 formülasyonunun uygulanmasından sonra hafifletilebileceği bulunmuştur. Sonuçlarımız, zencefil özütünün CCl₄ kaynaklı karaciğer toksitesinin önlenmesinde önemli bir rol oynadığını gösteren Oke ve ark., Hasan ve ark. ve Abdel-Azeem ve ark. tarafından elde edilen sonuçlarla karşılaştırılabilir nitelikteydi [51–53]. Ayrıca, Jaiswal ve ark. ve Bhavsar ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda, limon özütlerinin karaciğeri zararlı etkilerden koruyabildiği gösterilmiştir.

CCl₄'ün etkileri bu da bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlarla uyumludur.

Test edilen ekstrenin karaciğer enzim belirteçlerini normale döndürme kapasitesi, HPLC kullanılarak tanımlanan farklı biyoaktif bileşiklere atfedilebilir. Daha önceki birkaç çalışma, zencefil ve limon ekstraktında bulunan farklı ana bileşiklerin hepatoprotektif etkisini göstermiştir. İzorhamnetin, rutin, eriodictyol ve hesperidin gibi limon biyomoleküllerinin, CCl₄ tarafından indüklenen karaciğer hasarına karşı önleyici bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [54–57]. Öte yandan, zencefilin koruyucu etkisinin biyoaktif bileşiklerinden kaynaklandığı gösterilmiştir [58]. Ayrıca, 6-gingerol ile tedavi, asetaminofenin neden olduğu istenmeyen etkilerden önemli bir hepatoprotektif etkiye sahipti [59].

Son olarak, histopatolojik düzeyde, hepatotoksik bir ajanın, niteliği, dozu veya uygulama yolu ne olursa olsun, örneğin CCl₄ uygulanması, membran geçirgenliğinde değişikliklere ve ardından doku hasarına neden olur: hücre nekrozu, hepatik hücre lizisi, karaciğer hücrelerinin lizisinde hasar, safra kanallarında hasar ve/veya karaciğer dokusu mimarisinin fonksiyonel bütünlüğünün kaybı [60].

Karaciğer hasarının ana sonucu, serum karaciğer enzimlerinin (G-GT, ALP, ALT ve AST) düzeylerinde artıştır [61]. Bu, bu enzimlerin esas olarak hücre içi enzimler olması nedeniyle, hepatik plazma membranında bir yırtılma olduğunu gösterir. Örneğin AST, hepatositlerde biri sitoplazmik, diğeri mitokondriyal olmak üzere iki izoenzim olarak bulunur ve bu nedenle, bu enzimin hücre dışı ortamda bulunması, karaciğer hücresinde hasar olduğunu gösterir [62].

Öte yandan, karaciğer parankim hasarına yol açan hepatotoksik ajanlara maruz kalmak da plazma bilirubin konsantrasyonunun yükselmesine neden olur [63]. Bu durum, safra kanallarının hasar görmesi veya reaktif türlerin eritrosit zarını etkilemesi sonucu hemolize ve nihayetinde bilirubin düzeylerinin yükselmesine yol açmasıyla açıklanabilir [64].

Bu çalışmada, zencefil, limon ve bunların formülasyonu yüksek antioksidan potansiyele sahipken, iki meyve suyu ekstresi ve formülasyonun uygulanması, CCl₄ enjeksiyonunun neden olduğu zararlı etkilere karşı farklı karaciğer enzimlerini normale döndürme konusunda büyük bir kapasite göstermiştir. Elde edilen bu farklı etkiler, HPLC kullanılarak tanımlanan farklı biyoaktif bileşiklere atfedilebilir.

6. Sonuç

Bu çalışmanın bulguları, zencefil ve limon sularının ve bunların formülasyonunun, serbest radikal *DPPH*•, ferrik indirgeme gücü testi (FRAP) ve toplam antioksidan kapasitesi (TAC) kullanılarak değerlendirilen önemli bir antioksidan potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, formülasyon dahil olmak üzere test edilen farklı özütlerin CCl₄ tarafından indüklenen karaciğer hasarına karşı önemli bir önleyici etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Elde edilen bu farklı etkiler, esas olarak HPLC kullanılarak tanımlanan gingerol, gingediol, eriodyctiol, rutin, hesperidin ve isorhamnetin gibi çeşitli biyoaktif bileşiklere atfedilmektedir. Bu bitkilerin karaciğer kronik hastalıklarının önlenmesinde alternatif ajanlar olarak daha fazla kullanılması için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Yazar Katkıları: Kavramsallaştırma, O.B. ve M.D.; metodoloji, O.B., M.D., M.H. ve I.M.; doğrulama, S.A.; resmi analiz, O.B., I.T. ve S.E.A.; kaynaklar, S.-J.K.; veri küresyonu, O.B. ve M.D.; yazma—orijinal taslak hazırlama, O.B. ve M.D.; yazma—inceleme ve düzenleme, O.B. ve S.A.; denetim, S.A., H.H. ve M.C.; fon temini, B.K. Tüm yazarlar makalenin yayınlanan halini okumuş ve onaylamıştır.

Finansman: Bu araştırma, Eğitim Bakanlığı (NRF-2020R111A2066868) tarafından finanse edilen Kore Ulusal Araştırma Vakfı (NRF) aracılığıyla Temel Bilim Araştırma Programı ve Kore hükümeti (MSIT) tarafından finanse edilen Kore Ulusal Araştırma Vakfı (NRF) hibesi (No. 2020R1A5A2019413) tarafından desteklenmiştir.

Kurumsal İnceleme Kurulu Beyanı: Etik komite bulunmaması nedeniyle bu çalışma için etik inceleme yapılmamıştır ve Oujda Bilim Fakültesi bilimsel araştırma dekanı yardımcısı tarafından etik onay sertifikası alınmıştır.

Bilgilendirilmiş Onam Beyanı: Uygulanmaz.

Veri Erişilebilirliği Beyanı: Veriler makale içinde yer almaktadır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Kaynakça

- Bates, B.; Bickley, L.S. *GUIDE de L'examen Clinique-Nouvelle Edition 2014*; Arnette-John Libbey Eurotext: Arcueil, Fransa, 2014.
- Loichot, G. *Introduction à la Pharmacocinétique, Passages Transmembranaires*; Pharmacologie Générale: Strasbourg, Fransa, 2004.
- Liu, J.; Qu, W.; Kadiiska, M.B. Kadmium toksisitesi ve karsinogenizinde oksidatif stresin rolü. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, *238*, 209–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Damintoti, K.; Dicko, M.H.; Simpore, J.; Traore, A.S. Burkina Faso'nun etnomedikal bitkilerinden elde edilen polifenollerin antioksidan ve antibakteriyel aktiviteleri. *Afr. J. Biotechnol.* **2005**, *4*, 823–828.
- Cordell, G.A.; Colvard, M.D. Doğal Ürünler ve Geleneksel Tıp: Bir Paradigmanın Dönüşümü. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 514–525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Compaore, S.; Belemnaba, L.; Hounkpevi, A.; Idohou, R.; Zerbo, I. Burkina Faso'da iklim gradyanı boyunca üç geleneksel şifacı derneği tarafından hipertansiyon tedavisinde kullanılan bitkilerin çeşitliliği. *Adv. Tradit. Med.* **2020**, *21*, 151–162. [[CrossRef](#)]
- Balunas, M.J.; Kinghorn, A.D. Tıbbi bitkilerden ilaç keşfi. *Life Sci.* **2005**, *78*, 431–441. [[CrossRef](#)]
- Hamilton, A.C. Tıbbi bitkiler, koruma ve geçim kaynakları. *Biodivers. Conserv.* **2004**, *13*, 1477–1517. [[CrossRef](#)]
- Hachi, M.; Hachi, T.; Belahbib, N.; Dahmani, J.; Zidane, L. Khenifra (Fas) şehrinde kullanılan şifalı bitkilerin floristik ve etnobotanik çalışmasına katkı. *Int. J. Innov. Appl. Stud.* **2015**, *11*, 754–770.
- Enstitüsü, Zencefilin (Zingiber officinale Roscoe) Yetiştirilmesi ve Bitki Özellikleri. *Food Agriculture Organ.* **2015**, *22*, 1–9.
- Ali, B.H.; Blunden, G.; Tanira, M.O.; Nemmar, A. Zencefilin (Zingiber officinale Roscoe) bazı fitokimyasal, farmakolojik ve toksikolojik özellikleri : Son araştırmaların gözden geçirilmesi. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 409–420. [[CrossRef](#)]
- Alami, Z.; Aynaou, H.; Alami, B.; Hdidou, Y.; Latrech, H. Doğu Fas'ta diyabet hastaları arasında bitkisel ilaç kullanımı. *J. Pharmacogn. Phyther.* **2015**, *7*, 9–17.
- Irannejad, A.; Khatamsaz, S.; Mokhtari, M.J. Zingiber officinale (Zencefil) hidroalkolik ekstraktının pparγ geni ekspresyonu, kan lipid profilleri ve karaciğer enzimleri (ast, alt) üzerindeki etkileri. *Eur. Asian J. Biosci.* **2020**, *14*, 2015–2021.
- Bekkouch, O.; Harnafi, M.; Touiss, I.; Khatib, S.; Harnafi, H.; Alem, C.; Amrani, S. Zingiber officinale Ham Sulu Ekstresi ve Metanolik Fraksiyonunun In Vitro Antioksidan ve In Vivo Lipid Düşürücü Özellikleri: Bir Takip Çalışması. *Kanıt Dayalı Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp.* **2019**, *2019*, 1–13.

15. Danciu, C.; Vlaia, L.; Fetea, F.; Hancianu, M.; Coricovac, D.E.; Ciurlea, S.A.; S, oica, C.M.; Vlaia, V.; Dehelean, C.A.; Trandafirescu, C. Zingiberaceae familyasının iki ana temsilcisinin B164A5 fare melanom hücrelerine karşı fenolik profili, antioksidan ve antikanser potansiyelinin değerlendirilmesi. *Biol. Res.* **2015**, *48*, 1–9. [CrossRef]
16. Taha, N.M.; Mandour, A.A.; Lebda, M.A. Zencefilin etanol özütünün, sıçanlarda triton WR-1339 ile indüklenen hiperlipidemiye antioksidan ve kardiyoprotektif etkileri. *Int. J. Chem. Res.* **2014**, *6*, 153–158.
17. Kim, H.J.; Kim, B.; Mun, E.G.; Jeong, S.Y.; Cha, Y.S. Buharda pişirilmiş zencefilin antioksidan aktivitesi ve C57BL/6J farelerde yüksek yağlı diyetin neden olduğu obeziteye karşı koruyucu etkileri. *Nutr. Res. Pract.* **2018**, *12*, 503–511. [CrossRef]
18. Elkirdasy, A.; Shousha, S.; Alrohaimi, A.H. Deneylerde diyabetik tavşanlarda () yeşil çay ve zencefil özlerinin hematolojik ve immünobiyokimyasal çalışması. *Acta Pol. Pharm.-Drug Res.* **2015**, *72*, 497–506.
19. Iroaganachi, M.; Eleazu, C.O.; Okafor, P.N.; Nwaohu, N. Olgunlaşmamış Muz (*Musa paradisiaca*) ve Zencefilin (*Zingiber officinale*) Streptozotosin ile Diyabetik Hale Getirilmiş Sıçanların Kan Şekeri, Vücut Ağırlığı ve Yem Alımına Etkisi. *Open Biochem. J.* **2015**, *9*, 1–6.
20. Goetz, P. Citrus limon (*L.*) Burm. f.(Rutacées) Citronnier. *Phytothérapie* **2014**, *12*, 116–121. [CrossRef]
21. Debuigne, G.; Couplan, F. *Petit Larousse des Plantes Qui Guérissent*; Larousse: Paris, Fransa, 2008; s. 895.
22. Tag, H.M.; Kelany, O.E.; Tantawy, H.M.; Fahmy, A.A. Limon ve acı biber özlerinin farelerde adjuvanı ile indüklenen artrit üzerinde potansiyel antiinflamatuvar etkisi. *J. Basic Appl. Zool.* **2014**, *67*, 149–157. [CrossRef]
23. Haidari, F.; Mohammadshahi, M.; Zarei, M.; Fathi, M. Sıçanlarda akrilamid kaynaklı oksidatif stresin 'da limonun iltihaplanma ve adipokin düzeyleri üzerindeki koruyucu etkisi. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2019**, *55*, 1–7. [CrossRef]
24. Lee, H.; Woo, M.; Kim, M.; Noh, J.S.; Song, Y.O. 'in hiperkolesterolemiye neden olduğu tavşanlarda limon esansiyel yağının antioksidan ve kolesterol düşürücü etkileri. *Prev. Nutr. Food Sci.* **2018**, *23*, 8–14. [CrossRef]
25. Aazza, S.; Lyoussi, B.; Miguel, M.G. Bazı ticari uçucu yağların ve ana bileşikler 'nin antioksidan ve antiasetilkolinesteraz aktiviteleri. *Moleküller* **2011**, *16*, 7672–7690. [CrossRef]
26. Klimek-Szczykutowicz, M.; Szopa, A.; Ekiert, H. Citrus limon (Limon) fenomeni — kimya, farmakolojik özellikler, modern ilaç, gıda ve kozmetik endüstrilerindeki uygulamalar ve biyoteknolojik çalışmaların gözden geçirilmesi. *Bitkiler* **2020**, *9*, 119. [CrossRef]
27. Ainsworth, E.A.; Gillespie, K.M. Folin–Ciocalteu reaktifi kullanılarak bitki dokularındaki toplam fenolik içerik ve diğer oksidasyon substratlarının tahmini. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 875–877. [CrossRef] [PubMed]
28. Dehpour, A.A.; Ebrahimzadeh, M.A.; Fazel, N.S.; Seyed, N. Mohammad, Ferula assafoetida metanol ekstraktının antioksidan aktivitesi ve uçucu yağ bileşimi. *Grasas Y Aceites* **2009**, *60*, 405–412.
29. Patel, R.; Rinker, L.; Peng, J.; Chilian, W.M. Reaktif Oksijen Türleri: İyi ve Kötü. *React. Oxyg. Species Living Cells* **2018**, *7*.
30. Di Meo, S.; Reed, T.T.; Venditti, P.; Victor, V.M. Fizyolojik ve Patolojik Koşullarda ROS ve RNS Kaynaklarının Rolü. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 1–44. [CrossRef]
31. Liguori, I.; Russo, G.; Curcio, F.; Bulli, G.; Aran, L.; Della-Morte, D.; Gargiulo, G.; Testa, G.; Cacciatore, F.; Bonaduce, D. Oksidatif stres, yaşlanma ve hastalıklar. *Clin. Interv. Aging* **2018**, *13*, 757–772. [CrossRef]
32. Tiencheu, B.; Njabi Nji, D.; Ufuan Achidi, A.; Egbe, A.C.; Tenyang, N.; Tiepma Ngongang, E.F.; Tonfack Djikeng, F.; Tatsinkou Fossi, B. Portakal (*Citrus sinensis*), limon (*Citrus limon*), bal ve zencefil (*Zingiber officinale*) ile formüle edilmiş doğal meyve suyunun Heliyon raf ömrü çalışmaları. *Heliyon* **2021**, *7*, e07177. [CrossRef]
33. Maizura, M.; Aminah, A.; Wan Aida, W.M. Kesum (*Polygonum minus*), zencefil (*Zingiber officinale*) ve zerdeçal (*Curcuma longa*) özütünün toplam fenolik içeriği ve antioksidan aktivitesi. *Int. Food Res. J.* **2011**, *18*, 526–531.
34. Harsha, H.; Aarti, S. Citrus limetta 'yi temel alan geleneksel Hint şifalı bitkilerinden geliştirilen bitkisel meyve suyunun kalite değerlendirmesi. *Nutr. Food Sci.* **2016**, *5*, 1–5.
35. Gironés-Vilaplana, A.; Valentão, P.; Andrade, P.B.; Ferreres, F.; Moreno, D.A.; García-Viguera, C. Kolinesteraz inhibe edici etkisi ve antioksidan potansiyeli olan siyah aronia ve limon suyu karışımının fitokimyasal profili. *Food Chem.* **2012**, *134*, 2090–2096. [CrossRef]
36. Makni, M.; Jemai, R.; Kriaa, W.; Chtourou, Y.; Fetoui, H. Tunus'tan Citrus limon: Fitokimyasal ve Fizikokimyasal Özellikleri ve Biyolojik Aktiviteler. *Biomed Res. Int.* **2018**, *2018*, 1–10. [CrossRef]
37. Sharma, S.; Kumar, R. Zencefil (*Zingiber officinale* L.) rizomunun antioksidan aktivitesi, TLC ve fitokimyasal analizi. *Plant Arch.* **2018**, *18*, 210–214.
38. Al, J.; Baqir, E.; Al, A.; Al, T.; Husain, A.; Alam, S. Umman'ın İki Bölgesinde Yetiştirilen Narenciye aurantifolia L. Yapraklarının Fitokimyasal Taraması, Fenolik İçeriği ve Antioksidan Aktivitesi. *Iran. J. Pharm. Sci.* **2018**, *14*, 27–34.
39. Fejzic', S.; C'avar, A. Bazı Narenciye Türlerinin Fenolik Bileşikleri ve Antioksidan Aktivitesi. *Bull. Chem. Technol. Bosnia Herzeg.* **2014**, *42*, 1–4.
40. Mditshwa, A.; Bower, J.P.; Bertling, I.; Mathaba, N.; Silikon ile İşlenmiş Limon Meyvesinde (*Citrus limon*) Toplam Antioksidan Testlerinin Verimliliğinin İncelenmesi. Afrika Bahçecilik Kongresi; Acta Horticulturae: 2013; s. 93–102. Çevrimiçi olarak erişilebilir: <https://www.ishs.org/publications> (erişim tarihi: 26 Ocak 2022).
41. Mao, Q.-Q.; Xu, X.-Y.; Cao, S.-Y.; Gan, R.-Y.; Corke, H.; Beta, T.; Li, H.-B. Zencefilin (*Zingiber officinale* Roscoe) biyoaktif bileşikleri ve biyoaktiviteleri. *Foods* **2019**, *8*, 185. [CrossRef]
42. Masuda, Y.; Kikuzaki, H.; Hisamoto, M.; Nakatani, N. Zencefilden elde edilen gingerol ile ilgili bileşiklerin antioksidan özellikleri. *BioFactors* **2004**, *21*, 293–296. [CrossRef]

43. Tsimogiannis, D.I.; Oreopoulou, V. DPPH serbest radikal temizleme verimliliğine flavonoid C-halkasının katkısı. 3',4'-hidroksi ikameli üyeler için kinetik bir yaklaşımı. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2006**, *7*, 140–146. [[CrossRef](#)]
44. Zielin'ska, D.; Szawara-Nowak, D.; Zielin'ski, H. Güncellenmiş analitik stratejilerle rutin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi ve çeşitlendirilmiş karabuğday kaynaklı materyalin antioksidan kapasitesine katkısı. *Polish J. Food Nutr. Sci.* **2010**, *60*, 315–321.
45. Ren, X.; Bao, Y.; Zhu, Y.; Liu, S.; Peng, Z.; Zhang, Y.; Zhou, G. Güney Sincan'daki tamarix ramosissima kabuklarında tespit edilen izorhamnetin, hispidulin ve cirsimaritin ile bunların antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri. *Moleküller* **2019**, *24*, 390. [[CrossRef](#)]
46. Martínez-Noguera, F.J.; Marín-Pagán, C.; Carlos-Vivas, J.; Rubio-Arias, J.A.; Alcaraz, P.E. Hesperidin'in amatör bisikletçilerde oksidan/antioksidan durum belirteçleri ve performans üzerindeki akut etkileri Francisco. *Nutrients* **2019**, *11*, 1898. [[CrossRef](#)]
47. Parhiz, H.; Roohbakhsh, A.; Soltani, F.; Rezaee, R.; Iranshahi, M. Narenciye flavonoidleri hesperidin ve hesperetin'in antioksidan ve antienflamatuar özellikleri: Moleküler mekanizmaları ve deneysel modellerinin güncel bir incelemesi. *Phyther. Res.* **2015**, *29*, 323–331. [[CrossRef](#)]
48. Wilmsen, P.K.; Spada, D.S.; Salvador, M. Kimyasal ve biyolojik sistemlerde flavonoid hesperidin'in antioksidan aktivitesi. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4757–4761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Jeong, H.G. Oleanolik asit ile sitokrom P450 2E1 ekspresyonunun inhibisyonu: Karbon tetraklorür- 'nin neden olduğu karaciğer hasarına karşı hepatoprotektif etkiler. *Toxicol. Lett.* **1999**, *105*, 215–222. [[CrossRef](#)]
50. Malhi, H.; Gores, G.J. Karaciğer Hasarının Hücresel ve Moleküler Mekanizmaları. *Gastroenteroloji* **2008**, *134*, 1641–1654. [[CrossRef](#)]
51. Oke, G.O.; Abiodun, A.A.; Imafidon, C.E.; Monsi, B.F. Zingiber officinale (Roscoe), antioksidan, membran stabilize edici ve doku yenileyici potansiyelleri sayesinde CCl₄'ün neden olduğu karaciğer histopatolojisi ve biyokimyasal bozuklukları hafifletir. *Toxicol. Rep.* **2019**, *6*, 416–425. [[CrossRef](#)]
52. Hasan, I.H.; El-Desouky, M.A.; Abd-Elaziz, G.M.; Hozayen, W.G. Zingiber officinale'nin karbon tetraklorürün neden olduğu karaciğer fibrozuna karşı koruyucu etkileri. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2016**, *8*, 377–381.
53. Abdel-Azeem, A.S.; Hegazy, A.M.; Ibrahim, K.S.; Farrag, A.R.H.; El-Sayed, E.M. Asetaminofen ile tedavi edilen sıçanlarda zencefil (zingiber officinale roscoe) ve E vitamininin hepatoprotektif, antioksidan ve iyileştirici etkileri. *J. Diet. Suppl.* **2013**, *10*, 195–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Kim, D.-W.; Cho, H.-I.; Kim, K.-M.; Kim, S.-J.; Choi, J.-S.; Kim, Y.-S.; Lee, S.-M. Isorhamnetin-3-O-galaktosid, farelerde CCl₄'ün neden olduğu karaciğer hasarına karşı koruma sağlar. *Biomol. Ther.* **2012**, *20*, 406–412. [[CrossRef](#)]
55. Abdel-ghaffar, O.; Mahmoud, S.T.; Said, A.A.; Sanad, F.A.Y. Albino Sıçanlarda İzoniazidin Oksidatif Stresine Karşı Rutin'in Hepatoprotektif Etkisi. *Int. J. Pharmacol.* **2017**, *13*, 516–528. [[CrossRef](#)]
56. Aboshahba, A. Dislipideminin Tedavisinde Onaylanan Yeni Eğilimler. *J. Cardiol. Cardiovasc. Ther.* **2019**, *14*, 1–17. [[CrossRef](#)]
57. Islam, A.; Islam, S. Eriodictyolün farmakolojik ve biyolojik rolleri. *Arch. Pharm. Res.* **2020**, *43*, 582–592. [[CrossRef](#)]
58. Huang, Y.S. Zencefilin hepatoprotektif etkisi. *J. Chinese Med. Assoc.* **2019**, *82*, 805–806. [[CrossRef](#)]
59. Sabina, E.P.; Pragasam, S.J.; Kumar, S.; Rasool, M. Zencefilin aktif bileşeni olan 6-gingerol, farelerde asetaminofen kaynaklı hepatotoksisteyi korur. *J. Chinese Integr. Med.* **2009**, *9*, 1264–1269. [[CrossRef](#)]
60. Wang, J.; Yang, Z.; Lin, L.; Zhao, Z. Naringenin'in sıçanlarda kurşun kaynaklı oksidatif strese karşı koruyucu etkisi. *Biol. Trace Element Res.* **2011**, *146*, 354–359. [[CrossRef](#)]
61. Darwish, M.M.; Abd El Azime, A.S. Manal Mohamed, Sıçanlarda radyasyon kaynaklı oksidatif stresi hafifletmede kakule (Elettaria cardamomum) rolü. *Arab J. Nucl. Sci. Appl.* **2013**, *46*, 232–239.
62. Awad, N.E.; Kassem, H.A.; Hamed, M.A.; El-feky, A.M.; El-naggar, M.A.A. Biyotıp ve Farmakoterapi Chaetomium globosum'un sıvı kültür filtratının etil asetat ekstraktından hepatoprotektif değerlendirme ve ana ikincil metabolitlerin izolasyonu. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *97*, 174–180.
63. Darbar, C.S.; Bhattacharya, S.A. Parasetamolün neden olduğu hepatotoksisteye karşı polibotanik bir preparat olan livinanın antihepatoprotektif potansiyeli: Silimarin ile karşılaştırma. *Asian J. Pharm. Clin.* **2011**, *4*, 72–77.
64. Kalaidjieva, V.C.; Iliev, Z.K. Böbrek proksimal tübül bozukluğu sonrası sıçanlarda plazma eritropoietin düzeyi. *Folia Med. (Plovdiv)* **2000**, *42*, 41–45.