

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ  
SONUÇ RAPORU**

İzole Sıçan Kalbinde Oluşturulan İskemi/  
Reperfüzyon Hasarı Üzerine d-limonen'in Etkileri

Prof. Dr. Arif Tanju ÖZÇELİKAY

Yüksek Lisans Öğrencisi Damla Gizem SABUR

18L0237006

06.12.2018 - 06.06.2020

08.07.2020

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Ankara - 2020

**I. Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve zetleri**

**Türkçe Adı** : İzole Sıçan Kalbinde Oluşturulan İskemi/Reperfüzyon Hasarı Üzerine d-limonen'in Etkileri

**İngilizce Adı** : Effects of d-limonene on ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart

## Özetleri

: ÖZETİzole Sıçan Kalbinde Oluşturulan İskemi-Reperfüzyon Hasarı Üzerinde d-Limonen'in EtkileriOksidatif stres kalpte iskemi-reperfüzyon hasarının en önemli nedenleri arasındadır. Antioksidanlar oksidatif stresi önleyerek ya da azaltarak kalp üzerinde koruyucu etki gösterebilmektedirler. Özellikle son yıllarda monoterpenlerin antioksidan özellikleriyle kalp üzerinde koruyucu etkileri olduğunu gösteren birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada bir monoterpen olan d-limonenin iskemi reperfüzyon hasarı üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Beş gruba ayrılan sıçanlara, serum fizyolojik çözeltisi (kontrol grup), 50, 100, 200 mg/kg d-limonen ve 200 mg/kg NAC tedavisi yedi gün boyunca i.p. olarak uygulanmıştır. Tedavi sürecinden sonra langendorff sisteminde perfüze edilen kalplere 20 dakika stabilizasyon sürecinin ardından 30 dakika iskemi ve 40 dakika reperfüzyon protokolü uygulanmıştır. İskemi öncesi veya reperfüzyon sonunda kalplerin fonksiyonlarında herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Ayrıca iskemi öncesi ve reperfüzyon sonu toplanan perfüzlardan LDH ölçümü yapılmış, reperfüzyon sonu LDH miktarının, iskemi öncesi LDH miktarına göre değişimi kardiyak hasarın bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Buna ek olarak TAS, TOS, TBARS, SOD, GSH, GR ve CAT gibi oksidatif stres parametreleri de kit yardımıyla ölçülmüştür. Biyokimyasal parametrelerde de fonksiyonel verilere benzer olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. Bu sonuçlar, patoloji oluşturmaksızın sağlıklı hayvanlara yapılan 7 gün süreli d-limonen tedavisinin (50, 100, 200 mg/kg/gün), in vitro şartlarda oluşturulan İ/R hasarına karşı koruyucu etkinliğinin olmadığını ve mevcut antioksidan kapasite üzerine ilave bir etki yapmadığını düşündürmektedir. Anahtar sözcükler: D-limonen, İskemi-Reperfüzyon Hasarı, Oksidatif Stres.SUMMARYEffects of d-limonene on ischemia-reperfusion injury in isolated rat heartOxidative stress is one of the most important causes of cardiac ischemia-reperfusion injury. Antioxidants have cardioprotective effects by preventing or reducing oxidative stress. Recently, many studies have shown that monoterpenes have cardioprotective effects with antioxidant properties. The aim of this study was to investigate the effect of d-limonene, a monoterpene, on ischemia reperfusion injury. Male Wistar rats divided into five groups were treated with saline solution (control group), 50, 100, 200 mg / kg d-limonene and 200 mg / kg NAC treatment for seven days. After the treatment period, perfused hearts in the langendorff system were applied for 20 minutes of stabilization followed by 30 minutes of ischemia and 40 minutes of reperfusion protocol. There was no significant difference between the groups on cardiac functions before ischemia or after reperfusion. Furthermore, LDH level was measured from perfusates collected before ischemia and after reperfusion period. The variance of LDH level measured at the end of reperfusion according to the LDH level before ischemia was evaluated as a cardiac damage marker. In addition, oxidative stress parameters such as TAS, TOS, TBARS, SOD, GSH, GR and CAT were measured through the commercial kit. There was no significant difference in biochemical parameters between the groups similarly to functional data. These results suggest that d-limonene treatment (50, 100, 200 mg/kg/day) for seven days to healthy animals without pathology does not have a protective effect against I/R damage in vitro and does not have an additional effect on existing antioxidant capacity.Keywords: D-limonene, Ischemia-reperfusion Injury, Oxidative Stress.

## II. Amaç ve Kapsam

Yapılan araştırmalar, doğal ürünlerin içeriğindeki bazı moleküllerin çeşitli kardiyak bozukluklara karşı yararlı etkiler oluşturduğunu göstermiştir (Shukla ve ark., 2010). Ek olarak, birkaç tıbbi bitkinin esansiyel yağında yaygın olarak bulunan monoterpenlerin de (Mirtenol, Karvakrol, Paeoniflorin gibi) akut miyokard enfarktüsü (Chen Y ve ark., 2017) İ/R hasarı (Britto ve ark., 2018) ve doksorubisin'in kardiyotoksik (Li ve ark. 2016) etkisine karşı belirgin bir kardiyoprotektif etki oluşturduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, antioksidan etkinliği birçok çalışma ile ortaya konmuş olan d-limonen ile ilgili kardiyak İ/R hasarı üzerinde henüz bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda, d-limonenin kardiyak İ/R hasarı üzerinde önleyici bir etkisinin olup olmadığının hem fonksiyonel hem de oksidatif stres parametreleri değerlendirilerek araştırılması amaçlanmıştır.

### III. Materyal ve Yöntem

Malzemeler:-Blood Pressure Transducer (MAY, Commat Ltd., Ankara, TÜRKİYE)-Isıtmalı su sirkulatörü (MAY, Commat Ltd. Ankara, TÜRKİYE)-Veri Kayıt ve Analiz Sistemi (MP100 BiopacSystem Inc, ABD)-%95 Oksijen, %5 karbondioksit karışımı-Teraziler (Scaltec, SBA 31, SBA 61, ALMANYA)-Flow meter (Transonic Systems Inc., New York, USA)-Vortex (Velp Scientifica, İTALYA)-Otomatik pipet – çeşitli hacimlerde (Eppendorf, Hamburg, ALMANYA)-Pipet uçları (Standart)-pH metre (Mettler Toledo MP220; İSVİÇRE)-Plastik ve cam malzemeler (Standart)-Cerrahi malzemeler (makas ve pensler)-3/0 ipek iplik (doğsan)-Polietilen enjektörler (1, 2, 5, 10, 50 ml)-Pompa (Masterflex Model:77200-12, Cole-Parmer, USA)-Langendorff sistemiKimyasal maddeler:-d-limonen ((R)-(+)-Limonene)-N-Asetil-L-sistein-Krebs Çözeltisi için kullanılan kimyasal maddeler (NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Glukoz), NAC ve d-limonen ((R)-(+)-Limonene) Sigma'dan temin edilmiştir (Chemical Co, ABD).-Ketamin (Keta-Control, Doğa İlaç, %0,1, 25 ml)-Ksilazin (Xylazinbio, Bioveta, %2, 50 ml)Biyokimyasal Analizler İçin Kullanılan Kitler:-Cayman LDH Cytotoxicity Assay Kit (601170, Cayman Chemical Company, Michigan USA)-Rel Assay Total Antioxidant Status Assay Kit (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, TÜRKİYE)-Rel Assay Total Oxidant Status Assay Kit (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, TÜRKİYE)-Cayman TBARS Assay Kit (10009055, Cayman Chemical Company, Michigan USA)-Pierce BCA Protein Assay Kit (23225, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford USA)-Cayman Superoxide Dismutase Assay Kit (706002, Cayman Chemical Company, Michigan USA)-Cayman Glutathione Assay Kit (703002, Cayman Chemical Company, Michigan USA)-Cayman Glutathione Reductase Assay Kit (703202, Cayman Chemical Company, Michigan USA)-Cayman Catalase Assay Kit (707002, Cayman Chemical Company, Michigan USA)-Cayman Glutathione Peroxidase Assay Kit (703102, Cayman Chemical Company, Michigan USA)Deney hayvanları:Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Karar No:2018-8-66 ve 2019-12-118) olan çalışmamızda erkek Wistar sıçanlar (250-300 g) kullanılmıştır. Sıçanlar, tekli kafeslerde 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünün (06.00-18.00 saatleri arası aydınlık, 18.00-06.00 saatleri arası karanlık) sağlandığı Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi'nde barındırılmışlar, çeşme suyu ve standart laboratuvar diyetiyle ad libitum beslenmişlerdir.Kullanılan YöntemlerDeney GruplarıÇalışmamızda deney grupları aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur.-Kontrol (K): 7 gün süreyle i.p yol ile serum fizyolojik çözeltisi verilmiştir. (n=5) -N-Asetil-L-Sistein (NAC): 7 gün süreyle i.p. yol ile 200 mg/kg verilmiştir. (n=6)-d-limonen (LİM50): 7 gün süreyle i.p. yol ile 50 mg/kg verilmiştir. (n=6)-d-limonen (LİM100): 7 gün süreyle i.p. yol ile 100 mg/kg verilmiştir. (n=6)

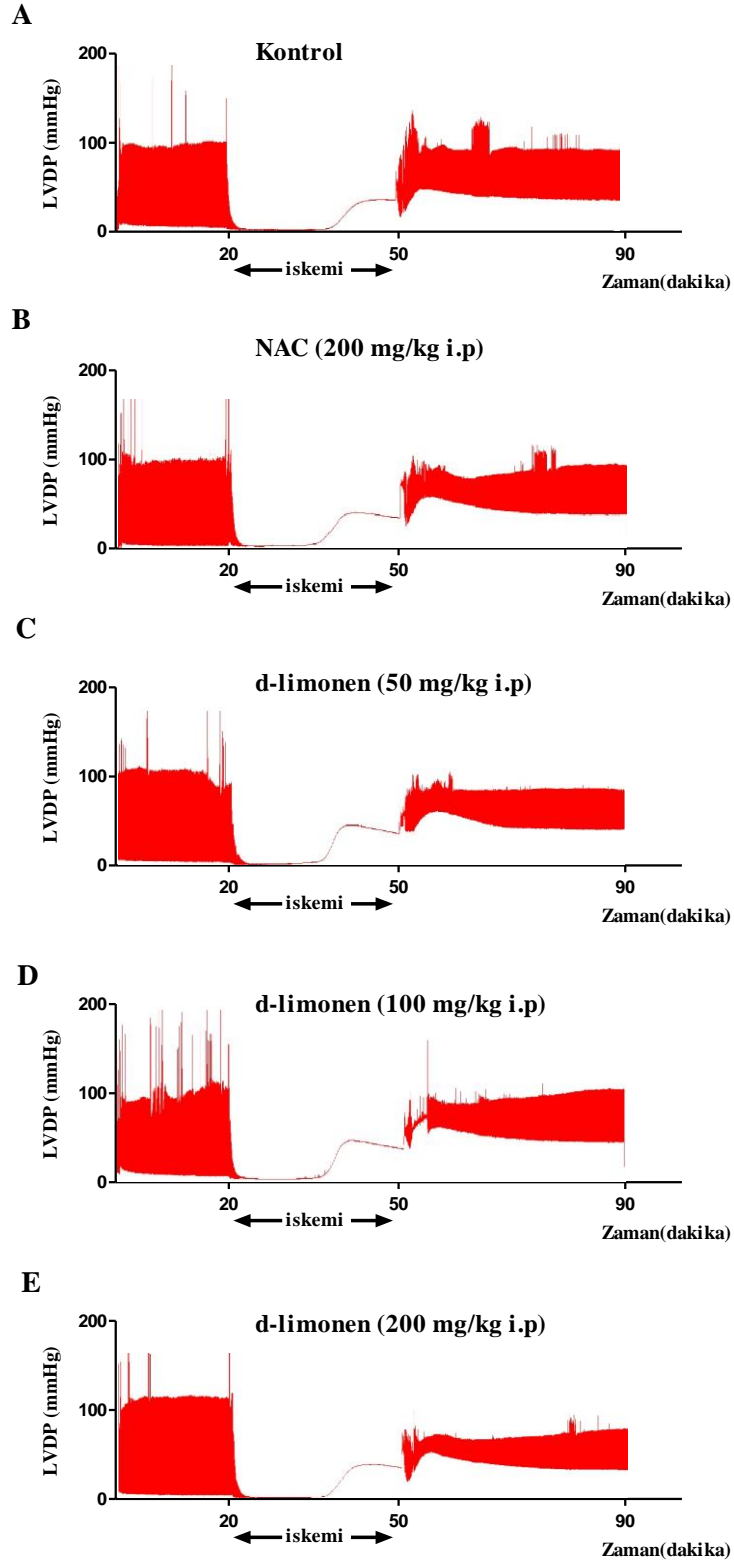
-d-limonen (LİM200): 7 gün süreyle i.p. yol ile 200 mg/kg verilmiştir. (n=6)i.p yolla ilaç uygulaması sıçanlara maksimum 1 ml hacimde yapılmıştır. Langendorff Kalp Preparatının Hazırlanması:Deney günü anestezi altındaki (50 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin i.m. yolla) sıçanların göğüs kafesleri açılarak çıkarılan kalpler temizlenerek çok kısa süre içerisinde (1-2 dakika) aortalarından Langendorff sistemine takılarak sabit basınç altında (65-70 mmHg) KrebsHenseleit çözeltisi (mM:120 NaCl, 4,8 KCl, 1,25 CaCl<sub>2</sub>, 1,25 MgSO<sub>4</sub>, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub> ve 10 glukoz, 37°C, pH:7,4) ile perfüze edilmeye başlanmıştır. Bir basınç transdüsörüne bağlı içi suyla dolu lateks balon sol ventrikül içine yerleştirilmiş ve LVEDP her deney başında 5-10 mmHg olacak şekilde ayarlanmıştır. 20 dakika stabilizasyon süresinden sonra kalpler üzerinde 30 dakika global iskemi ve arkasından 40 dakika reperfüzyon işlemi yapılmıştır. 90 dakikalık deney süresince HR, koroner akış hızı, LVDP, LVEDP, +dP/dt -dP/dt bilgisayar programı (MP100 Biopac-System Inc, ABD) kullanılarak kaydedilmiştir. LVDP ve HR değerlerinin çarpımıyla hesaplanan hız basınç ürünü (RPP) kardiyak performansın bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Deney sonu kalp dokuları langendorff sisteminden alınarak, sıvı nitrojen içinde dondurulmuş, -80oC'de oksidatif stres ve antioksidant enzim aktivitelerinin ölçümü için saklanmıştır. Biyokimyasal Analizler:LDH Ölçümüİzole kalplerde iskemi reperfüzyon hasarının bir göstergesi olarak LDH ölçümü yapılmıştır. Bu amaçla iskemi öncesi ve reperfüzyonun 40. dakikasında 1 dakika süre ile toplanan perfüzetler, likit nitrojen ile dondurulup -80 derecede ölçüm gününe kadar saklanmıştır. Perfüzetdeki LDH düzeyleri, spektrofotometrede (490 nm'de) kolorimetrik olarak ölçülmüştür (Cayman LDH Cytotoxicity Assay Kit, 601170, Cayman Chemical Company, Michigan USA). LDH sonuçları her bir kalp için, iskemi öncesi değerleri ile karşılaştırılarak reperfüzyon sonundaki yüzde artış olarak verilmiştir. Oksidatif Stres Parametrelerinin ÖlçümüTotal antioksidan seviyesi (TAS) ve Total oksidan seviyesi (TOS) ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür (Rel Assay Total Antioxidant Status Assay Kit ve Rel Assay Total Oxidant Status Assay Kit, Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, TÜRKİYE). Ölçüm için kalp dokuları 50 mM pH: 7,40 fosfat tamponu ile homojenize edildikten sonra 3000 rpm hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlarda daha sonra protokole uygun şekilde sırayla TAS için 660 nm ve TOS için 530 nm absorpsiyon altında kolorimetrik olarak ölçüm yapılmıştır. Sonuçlar µmol/L olarak verilmiştir. Ayrıca TOS/TAS oranı da oksidatif stres belirteci olarak gruplar arasında değerlendirilmiştir. TBARS (MDA) ölçümü için kullanılan ticare kitle (Cayman TBARS Assay Kit, 10009055, Cayman Chemical Company, Michigan USA) belirtilen şekilde, RIPA tamponu ile homojenize edilmiş kalp dokuları, 1600 x g hızda 4oC de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantlar ayrılmıştır. Elde edilen süpernatantlarda daha sonra protokole uygun olarak 530 nm'de kolorimetrik olarak ölçüm yapılmıştır. MDA miktarı nmol/mg protein olarak verilmiştir. Doku protein düzeyleri, ticari BCA ölçüm kiti (Pierce BCA Protein Assay Kit, 23225, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford USA) kullanılarak ölçülmüştür. SOD ölçümü için kullanılan ticari kitle (Cayman Superoxide Dismutase Assay Kit, 706002, Cayman Chemical Company, Michigan USA) kalp dokuları, HEPES tamponu (pH 7.2; 1 mM EGTA, 220 mM mannitol, 70 mM sükröz içeren) ile homojenize edildikten sonra 1500 x g 4oC de 5 dakika santrifüj edilmiş; elde edilen süpernatantlar süpernatantlarda daha sonra protokole uygun olarak 450 nm'de kolorimetrik olarak ölçüm yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarda SOD miktarı U/ml olarak verilmiştir. Total GSH ölçümü ticari kit (Cayman Glutathione Assay Kit, 703002, Cayman Chemical Company, Michigan USA) kullanılarak yapılmıştır. Fosfat tamponu (pH 6-7; 1 mM EDTA içeren) ile

homojenize edilen dokular, 10000 x g 4oC de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlara, metafosforik asit ve trietanolamin çözeltileri kullanılarak deproteinizasyon işlemi uygulanmış ve süpernatantlarda daha sonra protokole uygun olarak 450 nm absorbansta ölçüm gerçekleştirilmiştir. “End Point” yöntemine göre hesaplamalar yapılmıştır. Sonuçlar Total GSH miktarı ( $\mu\text{M}$ ) olarak verilmiştir. Glutasyon redüktaz miktarı ölçümü için kullanılan ticari kit (Cayman Glutathione Reductase Assay Kit, 703202, Cayman Chemical Company, Michigan USA) protokolüne uygun olarak, fosfat tamponu (pH 7,5; 50 mM potasyum fosfat ve 1mM EDTA içeren) ile homojenize edilen kalp dokuları 10000 x g 4oC de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantlar ayrılmıştır. Standartlar ve örneklerde daha sonra protokole uygun olarak 340 nm’de dakikada bir defa olmak üzere 5 ölçüm alınmıştır. Sonuçlar, nmol/dakika/ml olarak verilmiştir. Katalaz aktivitesinin ölçümü için kullanılan kitte (Cayman Catalase Assay Kit (707002, Cayman Chemical Company, Michigan USA), fosfat tamponu (pH 7,0; 50 mM potasyum fosfat ve 1 mM EDTA içeren) ile homojenize edilen kalp dokuları, 10000 x g 4oC de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlara gerekli kit protokolü uygulandıktan sonra 540 nm absorbansta ölçüm yapılmıştır. Katalaz aktivitesi nmol/dakika/ml olarak verilmiştir. Glutasyon peroksidaz miktarı ölçümü için kullanılan ticari kit (Cayman Glutathione Reductase Assay Kit, 703102, Cayman Chemical Company, Michigan USA) protokolüne uygun olarak, fosfat tamponu (pH 7,5; 50 mM Tris-HCl, 5mM EDTA ve 1 mM DTT içeren) ile homojenize edilen kalp dokuları 10000 x g 4oC de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantlar ayrılmıştır. Ancak örnekler üzerinde gerekli protokol uygulanmış olmasına karşın reaksiyon oluşmamış ve ölçüm alınamamıştır. İstatistiksel analiz Çalışmada elde edilen tüm veriler, Ortalama $\pm$ Standart Hata olarak gösterilmiştir. Grafikler ve istatistiksel analizler Graphpad Prism 5 programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki istatistiksel farklılık için; parametrik değerlerde tek yönlü ANOVA (One Way), parametrik olmayan değerler için ise Kruskal-Wallis uygulanmıştır. İstatistiksel farklılık  $p < 0,05$  düzeyinde değerlendirilmiştir.

#### IV. Analiz ve Bulgular

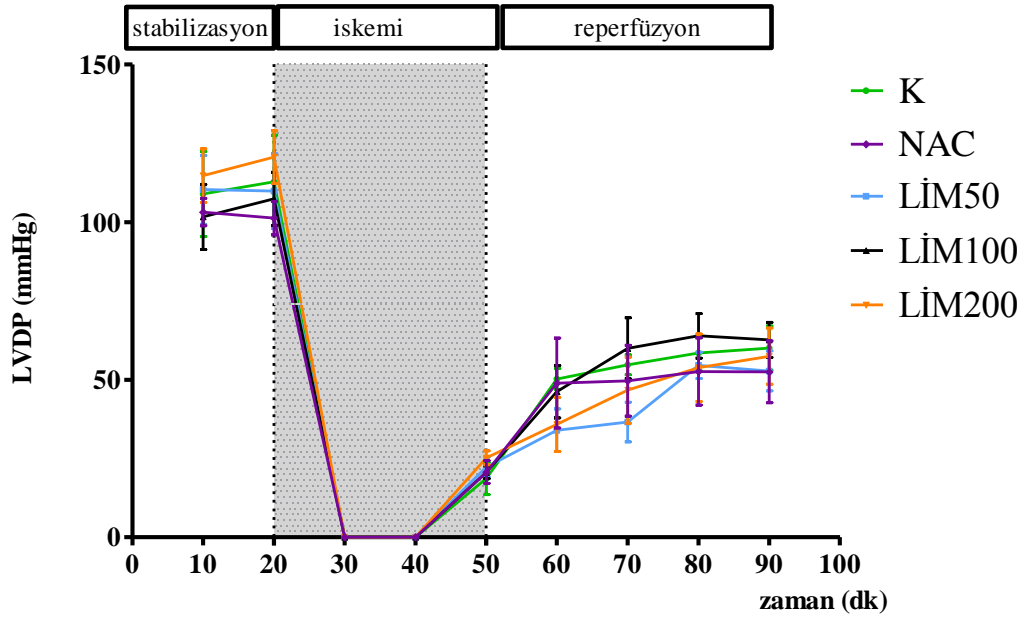
İskemi Reperfüzyon Sonucu Kalp Fonksiyonundaki Değişiklikler Bozulmuş kasılma fonksiyonu, kalpte İ/R hasarının en belirgin özelliğidir. Şekil 1.A-E kontrol ve tedavi edilmiş grupların spontan atım yapan kalplerinde 90 dakika boyunca alınmış orjinal LVDP kayıtlarını göstermektedir. Görüldüğü gibi iskeminin başlamasından sonra LVDP'ler sıfırlanmış ve reperfüzyonla birlikte kısmen bir artış göstermiştir. İskemi öncesi ile karşılaştırıldığında kontrol kalplerin LVDP değerinde reperfüzyon sonrası yaklaşık olarak %50 azalma saptanmıştır (Şekil 1). Çalışmamızda ilk olarak 7 gün süreyle farklı dozlarda uygulanan d-limonen tedavisinin İ/R sonucu kalbin kasılma fonksiyonunda oluşan azalmayı önleyip önlemediği incelenmiştir. Ancak kullanılan dozların hiçbiriyle LVDP düzeyleri üzerinde anlamlı bir düzelme sağlanamamıştır. Benzer sonuçlar, izole kalpte zamana bağlı olarak elde edilen diğer veriler üzerinde de görülmüştür. Çalışmamızda antioksidan özelliği bilinen NAC ile 7 gün süreyle yapılan tedavinin izole kalpteki İ/R hasarı üzerine etkisi de incelenmiştir. Ne var ki, beklentinin aksine NAC tedavisinin İ/R hasarı üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptanmıştır (Şekil 2.A-B ve Şekil 3.A-C). Bu kayıtlardan elde edilen iskemi öncesi ve reperfüzyon sonu verilerin yüzde değişimlerinde de anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Şekil.4 A-F). İskemi Reperfüzyon Sonucu Kalp Dokuları Üzerindeki Biyokimyasal Değişiklikler Çalışmamızda kalp hasarının bir göstergesi olarak iskemi öncesi ve reperfüzyon sonunda toplanan perfüzatlarda LDH düzeyi ölçülmüştür. İskemi öncesi ve reperfüzyon sonrası veriler karşılaştırıldığında tedavi yapılmamış kontrol kalplerde reperfüzyon sonunda, iskemi öncesine göre LDH düzeyinde ortalama yüzde 28,6 artış bulunmuştur. D-limonen ve NAC tedavisi yapılmış sıçanların izole kalplerinde de kontrol gruba göre anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir (Çizelge 1). Kalpte İ/R hasarında oksidatif stresin önemli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamızda oksidatif stres belirteçleri ve antioksidan enzimlerin aktiviteleri de ölçülmüştür. İncelenen tüm gruplarda izole kalpte İ/R sonucu elde edilen fonksiyonel değişikliklere ve LDH düzeylerine benzer şekilde oksidatif stres parametrelerinde de anlamlı bir değişiklik olmamıştır (Çizelge 2 ve Çizelge 3). Şekil ve Çizelgeler dosya yükleme bölümüne yüklenmiştir.



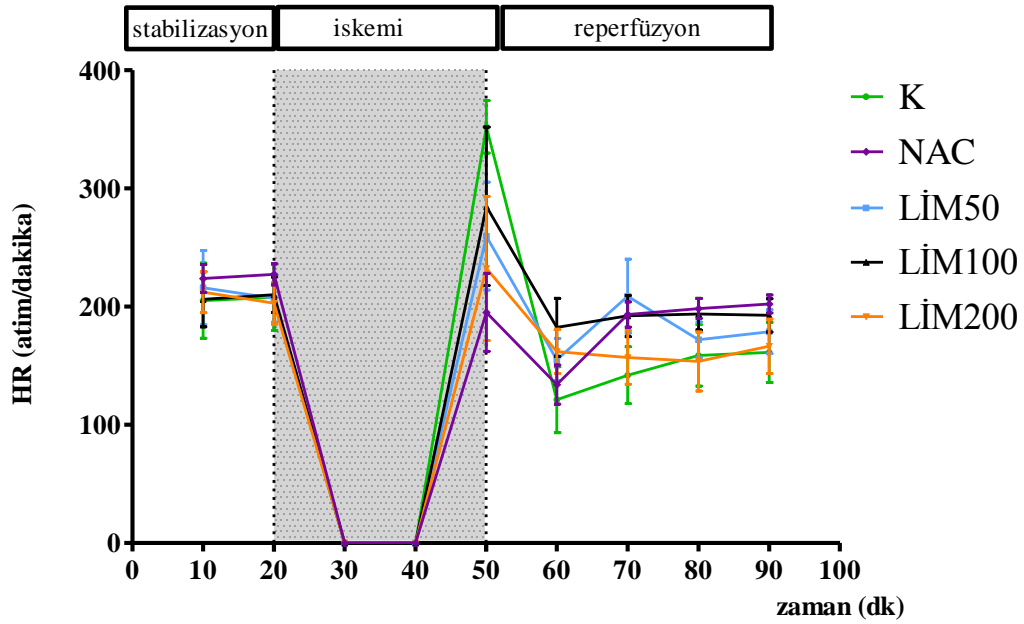


**Şekil 1.** LVDP'deki değişimleri gösteren orjinal kayıtlar. Kontrol grup (A), 200 mg/kg NAC tedavili grup (B), 50 mg/kg d-limonen tedavili grup (C), 100 mg/kg d-limonen tedavili grup (D), 200 mg/kg d-limonen tedavili grup (E).

A

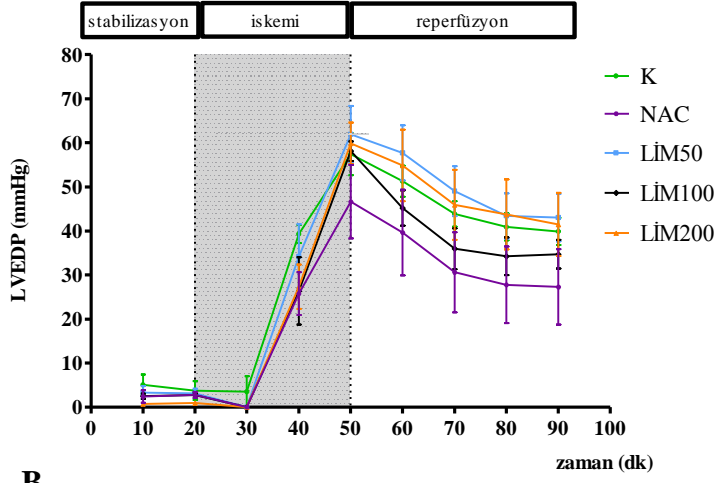


B

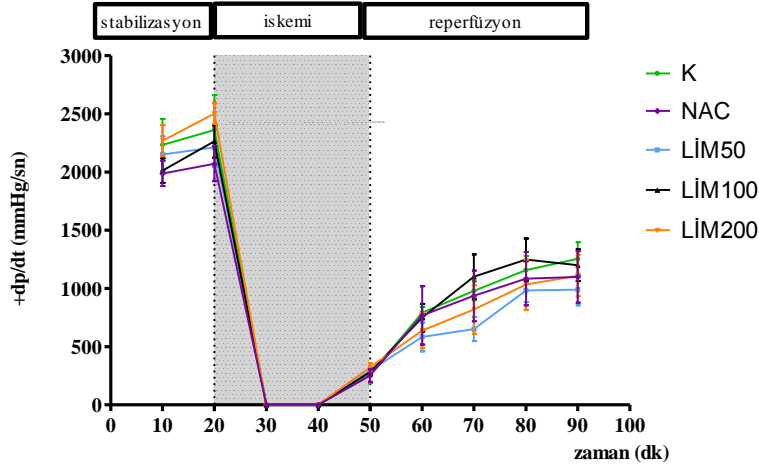


Şekil 2. İskemi-reperfüzyon periyodu süresince elde edilen verilerin grafiği. (A) LVDP, (B) HR

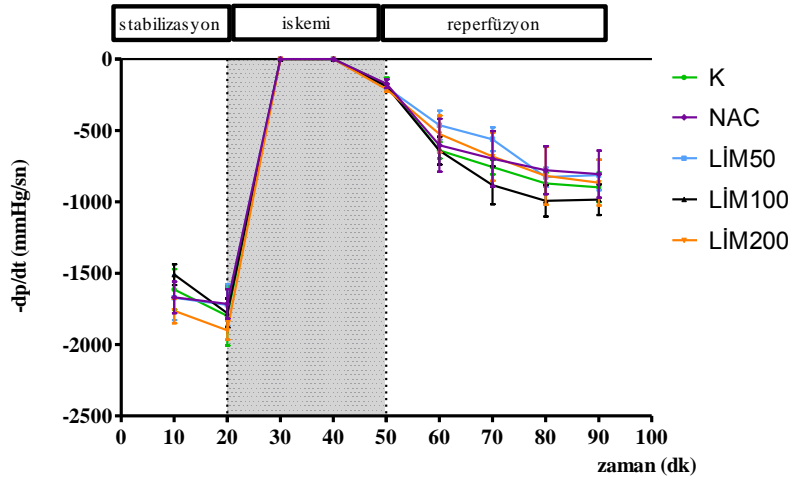
A



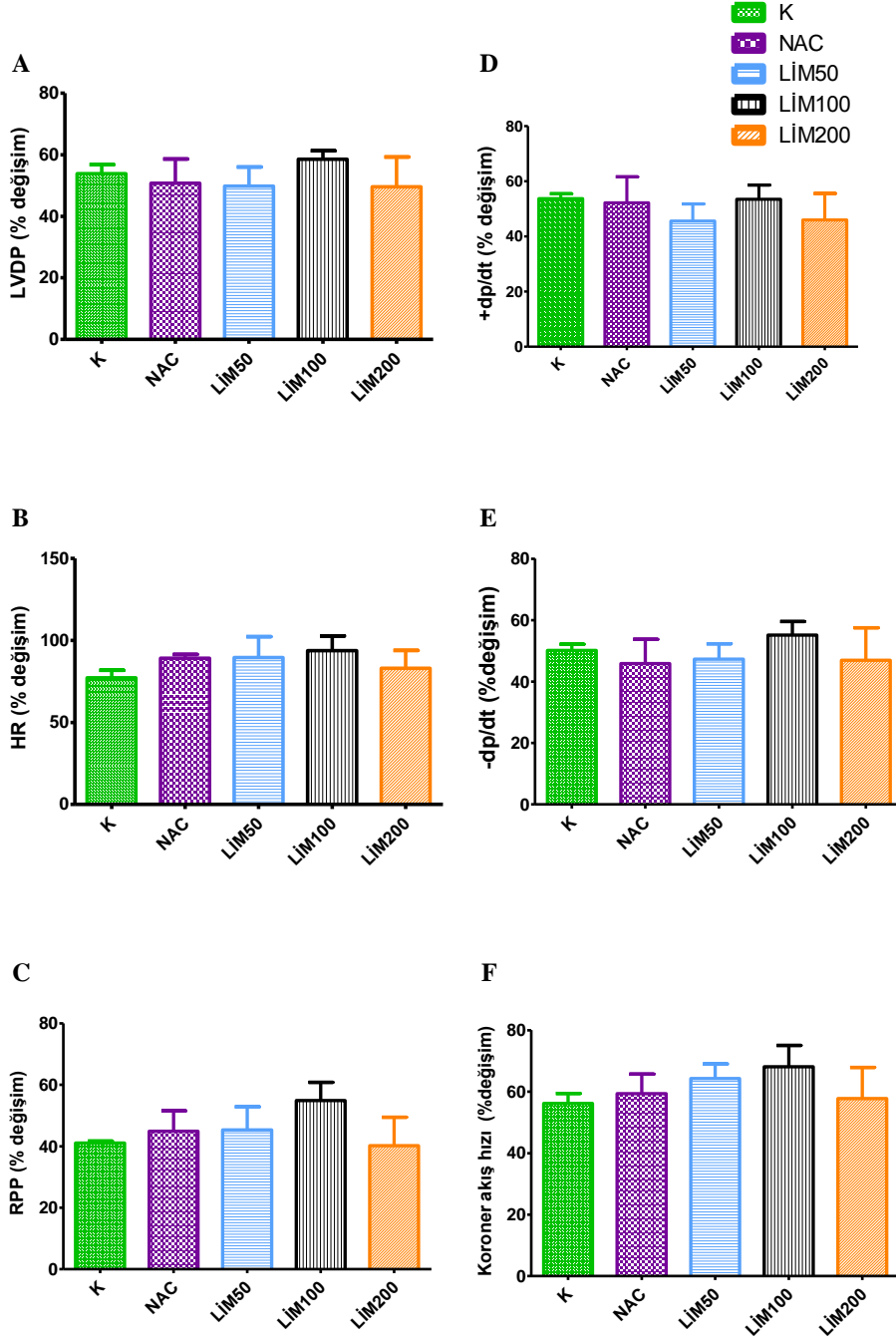
B



C



Şekil 3. İskemi-reperfüzyon periyodu süresince elde edilen verilerin grafiği. (A) LVEDP, (B) +dp/dt, (C) -dp/dt



**Şekil 4.** İskemi ve reperfüzyon süreçlerinin sonunda elde edilen değerlerin yüzde değişim grafiği. Yüzde değişim, reperfüzyon sonunda (90. dakika) ölçülen değer, iskemi öncesinde (20. dakika) ölçülen değere göre yüzde değişimini ifade etmektedir. (A) LVDP (% değişim), (B) HR (% değişim), (C) RPP (% değişim), (D) +dp/dt (% değişim), (E), -dp/dt (% değişim), (F) Koroner akış hızı (% değişim).

**Çizelge 1.** İzole kalplerde iskemi öncesi ve reperfüzyon sonunda toplanan perfüzlarda ölçülen reperfüzyon sonundaki LDH miktarının iskemi öncesindeki LDH miktarına göre yüzde artışı (Sonuçlar Ortalama±Standart Hata olarak verilmiştir, n=5-6)

	<b>K</b>	<b>NAC</b>	<b>LİM50</b>	<b>LİM100</b>	<b>LİM200</b>
<b>LDH (% değişim)</b>	28,6±8,0	30,7±8,9	22,4±8,0	19,5±6,6	20,6±6,0

**Çizelge 2.** İzole kalp dokularında ölçülen total antioksidan ve oksidan seviyeleri (TAS ve TOS) ile TOS/TAS oranı (Sonuçlar Ortalama±Standart Hata olarak verilmiştir, n=5-6)

	<b>K</b>	<b>NAC</b>	<b>LİM50</b>	<b>LİM100</b>	<b>LİM200</b>
<b>TAS (µmol/L)</b>	522,7±105	409,0±55,4	492,6±25,2	394,0±57,9	467,5±26,6
<b>TOS (µmol/L)</b>	17,4±0,7	16,1±1,2	19,4±1,5	18,6±1,2	17,3±1,1
<b>TAS/TOS</b>	3,9±0,7	4,3±0,6	3,9±0,2	5,2±1,0	3,6±0,3

**Çizelge 3.** İzole kalp dokularında ölçülen diğer oksidatif stres parametreleri (Sonuçlar Ortalama±Standart Hata olarak verilmiştir, n=5-6)

	<b>K</b>	<b>NAC</b>	<b>LİM50</b>	<b>LİM100</b>	<b>LİM200</b>
<b>TBARS (MDA) (nmol/mg protein)</b>	2,1±0,3	2,9±0,7	3,0±0,6	3,8±0,7	3,3±0,6
<b>SOD (U/ml)</b>	1,6±0,1	1,8±0,1	1,7±0,2	1,7±0,1	1,6±0,2
<b>Total GSH (µM)</b>	1,3±0,3	1,3±0,4	1,4±0,5	1,7±0,6	1,4±0,2
<b>GR (nmol/dakika/ml)</b>	47,1±7,5	35±7,3	44,8±4,8	39,8±5	38±5,2
<b>CAT (nmol/dakika/ml)</b>	154,5±8,1	138,3±8,1	144±1,5	149,8±4,3	136,7±2,9

## V. Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada 7 gün süreyle üç farklı dozda (50, 100 ve 200 mg/kg, ip) in vivo d-limonen tedavisinin izole perfüze sıçan kalbinde İ/R hasarı sonucu görülen fonksiyonel bozukluklar ve oksidatif stres üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda aynı zamanda antioksidan özelliği bilinen NAC de pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar, kontrol sıçan kalplerinde İ/R hasarı sonucu oluşan fonksiyonel bozukluklar ve oksidatif stres üzerinde gerek d-limonen gerekse NAC tedavilerinin herhangi bir yararlı etkiye sahip olmadığını göstermiştir. Kardiyovasküler hastalıklar dünyada ve özellikle gelişmiş ülkelerde ölüm nedenlerinin başında gelmektedir (Dhalla ve ark., 2007). Kalpte İ/R hasarı; iskemik kalp hastalığı, miyokard infarktüsü gibi patolojik durumlar yanında anjiyoplasti ve koroner bypass cerrahisi gibi müdahaleler sırasında da görülebilen klinik bir problemdir (Dhalla ve ark., 2000). Ateroskleroz, tromboz ya da koroner arter spazmı nedeniyle kalp dokusuna yeterli düzeyde oksijenli kanın sağlanamaması kalpte iskemiyeye neden olmaktadır. Bu nedenle iskemik kalbin çok kısa sürede reperfüzyonu kalp hasarını önlemek açısından gereklidir. Ancak reperfüzyonun kısa süre içinde oluşmaması tekrar oksijenli kan sağlanmış olmasına karşın, paradoksal olarak kalpte İ/R hasarına yol açmaktadır (Dorado ve ark., 2012). Bunun sonucu kalpte fonksiyonel (kasılma ve gevşeme gücünün azalması, aritmi), metabolik (oksidatif fosforilasyonun azalması) ve yapısal (apoptozis, nekroz) değişiklikler oluşmaktadır (Temsah ve ark., 1999). Yapılan çok sayıdaki çalışmalarda İ/R hasarı sırasında kalpte görülen söz konusu bozuklukların hücre içi aşırı Ca<sup>2+</sup> birikimi ve oksidatif stres ile ilişkili olduğu açıkça gösterilmiştir (Dhalla ve ark., 2000). Oksidatif stres, İ/R sırasında birkaç yolla kalpte hasar oluşturabilmektedir. İ/R sırasında oksidatif stresin oluşması endojen antioksidanlar (SOD, CAT, GPx, GSH, E vit.) ve oksidanlar (ROS) arasındaki dengenin bozulmasıyla ilişkilidir (Shen ve ark., 2019). Reperfüzyon sırasında kardiyomyosit mitokondrisi ve ksantinoksidaz aracılığıyla oluşan serbest oksijen radikalleri (süperoksit anyonu, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hidroksil radikali, peroksinitrit vb.) lipid peroksidasyonuna, protein oksidasyonuna ve DNA oksidasyonuna neden olmaktadır. Bunun sonucunda hücre membran permeabilitesi ve akışkanlığı değişir ve çeşitli proteinlerde fonksiyonel bozukluklar meydana gelmektedir (Kalogeris ve ark., 2017). Bu nedenle İ/R sonucu oluşan oksidatif stresin önlenmesi ya da en azından azaltılması İ/R sonrası kalbin normal fonksiyonunu sürdürmesi açısından potansiyel bir yarar sağlayabilir. Gerçekten süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimler dışında (1,2) N-asetilsistein, N-merkaptopropionilglisin, polifenoller (resveratrol, kuersetin, epikateşin), C ve E vitaminleri, kurkumin, ve doğal bitki ekstaktları gibi antioksidan özelliği olan bazı eksojen ajanların kalpte İ/R hasarını azalttığını ya da önlediğini gösteren umut verici deneysel çalışmalar bulunmaktadır (Bartekova ve ark., 2018). Yapılan araştırmalar, doğal ürünlerin içeriğindeki bazı moleküllerin çeşitli kardiyak bozukluklara karşı yararlı etkiler oluşturduğunu göstermiştir (Shukla ve ark 2010). Bir kaç tıbbi bitkinin esansiyel yağında yaygın olarak bulunan bazı monoterpenlerin (Mirtenol, Karvakrol, Paeoniflorin gibi) akut miyokard enfarktüsü (Chen Y ve ark., 2017) İ/R hasarı (Britto ve ark., 2018) ve doksorubisin'in kardiyotoksik (Li ve ark., 2016) etkisine karşı belirgin bir kardiyoprotektif etki oluşturduğu gösterilmiştir. Chen ve ark (2017), 7 gün süreyle üç farklı dozda karvakrol (25, 50 ve 100 mg/kg ip) tedavisinin sıçanlarda in vivo İ/R hasarına bağlı ortaya çıkan yapısal, fonksiyonel ve biyokimyasal değişiklikleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar 50 ve 100 mg/kg karvakrol uygulamasının anti-oksidatif ve anti-apoptotik etki sonucu infarkt alanı azalttığını, SOD ve katalaz aktivitesini arttırırken MDA düzeyini düşürdüğü tespit etmişlerdir. Moreira de Britto ve ark (2018) 7 gün süreyle mirtenol ile (50 mg/kg oral) tedavi ettikleri sıçanların kalplerinde ex-vivo İ/R hasarının sonuçlarını inceledikleri çalışmalarında söz konusu monoterpenin İ/R sonrası kalbin kasılma yanıtını düzelttiğini, aritmi oluşumunu ve infarkt alanını azalttığını saptamışlardır. Çalışmada ayrıca mirtenol tedavisinin antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırarak

oksidatif stresi tamamen önlediği ve pro-apoptotik yolağı inhibe ettiği rapor edilmiştir. Limonen (p-menta-1,8-dien) portakal, mandalina, limon ve greyfurt gibi narenciye meyvelerinden elde edilen yağın ana maddesidir. Limonen'in aktif formu d-limonendir (Bacanlı ve ark., 2017). d#8208;limonen tat vermek amacıyla yiyeceklere güvenle katılabilecek maddelerin listesinde bulunmaktadır (Sun, 2007). ). İnsan ve hayvanlarda oral yolla verildikten sonra hızla ve tama yakın bir oranda gastrointestinal sistemden absorbe olmaktadır. In vivo ve in vitro çalışmalarda d-limonen'in antikanser, antidiyabetik, antifungal, antiinflamatuvar ve analjezik özelliklerinin olduğu belirtilmiştir (Roberto ve ark., 2009). Buna ek olarak çok sayıdaki araştırmada d-limonenin güçlü antioksidan özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark., 2018). Bu çalışmalarda d-limonenin lipid peroksidasyonu azalttığı ve antioksidan enzim aktivitelerini (SOD, CAT, GPx, GST) arttırdığı tespit edilmiştir (Rehman ve ark., 2014; Verma ve ark., 2018; Tang ve ark., 2019).2016 yılında yapılan bir çalışmada 30 gün süreyle oral yolla yapılan d-limonen tedavisinin (50, 100, 200 mg/kg) farelerde oluşturulan serebral İ/R hasarı sonucu görülen davranışsal, yapısal ve biyokimyasal değişiklikleri doz bağımlı olarak anlamlı bir şekilde düzelttiği ve bu etkilerinin onun antioksidan aktivitesiyle ilişkili olduğu saptanmıştır (Kaur ve Bansal, 2016). 2019'da yayımlanan başka bir çalışmada ise farelerde 24 saat arayla iki kez izoproterenol (150 mg/kg ip) uygulaması ile oluşturulan miyokard enfarktüs modelinde isoproterenol'den 30 dakika sonra verilen D-limonenin (10 µM= 1,4 mg/fare, i.p.) kardiyak bozuklukları düzelttiği, infarkt alanı azalttığı, oksidatif stresi önlediği, kardiyak hasar belirteçlerinin (LDH ve CK-MB) düzeyini azalttığı ve apoptozisi baskıladığı gösterilmiştir (Durço ve ark.,2019). Çalışmamızda kullanılan d-limonen dozları, sıçanlarda intraperitoneal LD50 değerinin (4,5 g/kg) (Kim ve ark., 2013) çok altında olup, önceki çalışmalarda kullanılan d-limonen ve monoterpen dozlarına göre uygulama yoluna bağlı olarak seçilmiştir. Yukarıda belirtilen önceki çalışmaların aksine araştırmamızda 3 farklı dozda 7 gün süreyle yapılan d-limonen tedavisi izole perfüze sıçan kalbinde İ/R sonucu oluşan hasarı önlemede etkili bulunamamıştır. Elde edilen bu sonuçlardaki farklılıkların nedenleri şu şekilde açıklanabilir: d-limonen ve diğer monoterpenler (karvakrol) ile yapılan önceki çalışmalarda elde edilen olumlu sonuçlar, in vivo miyokard enfarktüsü ve İ/R hasarı oluşturulmuş deney hayvanlarında gösterilmiştir (Kaur ve Bansal, 2016; Chen ve ark., 2017; Durço ve ark.,2019). Bizim çalışmamızda ise, 7 günlük tedavi sonrasında İ/R hasarı in vitro izole sıçan kalplerinde oluşturulmuştur. Araştırmamızda d-limonen tedavisinin etkisiz olması, tedavi süresiyle de ilişkilendirilebilir. Ancak yayımlanmış çalışmalarda tedavi süresiyle ilişkili olmaksızın in vivo d-limonen uygulamasının sağlıklı hayvanlardaki antioksidan enzim aktivitelerini ve MDA düzeyleri üzerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı gösterilmiştir (Murali ve ark., 2012; Rehman ve ark.,2014; Bacanlı ve ark., 2017; Durço ve ark.,2019; Amini ve ark., 2020). Bu nedenle çalışmamızda ölçülmemiş olmakla birlikte 7 günlük d-limonen tedavisi kalp dokusunda oksidatif stres belirteçleri ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerinde anlamlı bir değişiklik yapmamış olabilir.Kullanılan yöntem açısından benzerlik gösteren yayınlanmış bir çalışmada ise 7 gün süreyle oral yolla mirtenol (50 mg/kg) tedavisinin izole kalplerde İ/R hasarını ve oksidatif stresi önlediği gösterilmiştir. Ancak söz konusu çalışmada kontrol sıçanların bazal LVDP değerlerinin tedavili sıçanlara göre daha yüksek olması iskemi sonrasında reperfüzyon hasarının farklı şiddette olmasına yol açarak yapılan tedavinin etkili görünmesine neden olmuş olabilir (Britto ve ark., 2018).Çalışmamızda İ/R hasarı ve oksidatif stres üzerine antioksidan özelliği bilinen NAC'in etkili olup olmadığı araştırılmıştır. Britto ve ark., (2018) çalışmalarında çok yüksek dozla (1,4 g/kg) yaptıkları NAC tedavisinin İ/R hasarını ve oksidatif stresi azaltmada etkili olduğunu göstermişlerdir. Bu nedenle araştırmamızın ön çalışmalarında NAC'in yüksek dozları (500 mg/kg/gün-1,4 g/kg/gün, oral) kullanılmıştır. Ancak tedavi sırasında deney hayvanlarında mide, ince ve kalın barsaklarında oluşan genişlemeyle birlikte belirgin konstipasyon ve ölüm tablosu görüldüğü için, çalışmamızda NAC dozu önceki çalışmalar dikkate alınarak 200 mg/gün olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte

beklentimizin aksine NAC tedavisinin de İ/R hasarını önlemede etkili olmadığı bulunmuştur. Bunun nedeni, patoloji oluşturmaksızın sağlıklı hayvanlara yapılan NAC tedavisinin mevcut antioksidan kapasite üzerine ilave bir etki yapmamasıyla ilişkili olabilir. Öte yandan, NAC'ın İ/R hasarı üzerindeki koruyucu etkisi konusunda çelişkili sonuçlar olduğu da ifade edilmektedir (Bartekova ve ark., 2018). Oksidatif stres, İ/R hasarında ortaya çıkan bozuklukları açıklamak için öne sürülen iki önemli mekanizmadan biridir. Hücre içi düzeyde protein, karbohidrat, lipit ve DNA üzerinde oksidatif hasarı azaltan ya da geciktiren maddeler olarak tanımlanan miyokardiyal antioksidanlar birçok mekanizma ile etki göstermektedirler. Doğal ürünlerin içeriğindeki bazı moleküllerin (monoterpenler gibi) çeşitli patolojik etkenlere karşı kardiyoprotektif etki gösterdiği saptanmıştır. Limonen de, insanlar tarafından ağırlıklı olarak turunçgiller, havuç, kahve, portakal ve hindistan cevizi gibi geleneksel gıdaların bir bileşeni olarak tüketilen monosiklik bir terpendir. Bu çalışmanın sonuçları in vivo d-limonen tedavisinin in vitro İ/R hasarını önlemede etkisiz olduğunu göstermiştir. Bu nedenle d-limonen etkisinin in vivo İ/R hasarı oluşturulan kalplerde tekrar araştırılması bir öneri olarak düşünülebilir.



**VI. Geleceğe İlişkin Öngörülen Katkılar**

Bulunmamaktadır.

**VII. Sağlanan Altyapı Olanakları ile Varsa Gerçekleştirilen Projeler**

Bulunmamaktadır.

**VIII. Sağlanan Altyapı Olanaklarının Varsa Bilim/Hizmet ve Eğitim Alanlarındaki Katkıları**

Desteklenen bu proje kapsamında bir yüksek lisans tez çalışması tamamlanmıştır. Bu açıdan bilim ve eğitim alanında katkısı bulunmaktadır.

## IX. Kaynaklar

KAYNAKLARAHMAD S, BEG ZH (2013). Hypolipidemic and antioxidant activities of thymoquinone and limonene in atherogenic suspension fed rats. *Food Chem.*138(2-3):1116-24.

ALBEROLA A, SUCH L, GIL F, ZARAGOZA R, MORCILLO EJ (1991). Protective effect of N-acetylcysteine on ischaemia-induced myocardial damage in canine heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 343(5):505-10.

AMINI R, ASLE-ROUSTA M, AGHAZADEH S. (2020) Hepatoprotective effect of limonene against chronic immobilization induced liver damage in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*.

ARNOLD WL, DEWALL RA, KEZDÍ P, ZWART HH. The effect of allopurinol on the degree of early myocardial ischemia. *Am Heart J*, 99(5):614-24.

ARUOMA OI, HALLIWELL B, HOEY BM, BUTLER J (1989). The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 593-597.

BACANLI M, ANLAR HG, AYDIN S, ÇAL T, ARI N, ÜNDEĞER BUCURGAT Ü, BAŞARAN AA, BAŞARAN N (2017). d-limonene ameliorates diabetes and its complications in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol*. 110:434-442.

BAGHERI F, KHORI V, ALIZADEH AM, KHALIGHFARD S, KHODAYARI S, KHODAYARI H (2016). Reactive oxygen species-mediated cardiac-reperfusion injury: Mechanisms and therapies. *Life Sci.*, 165: 43-55.

BAI J, ZHENG Y, WANG G, LIU P (2016). Protective Effect of D-Limonene against Oxidative Stress-Induced Cell Damage in Human Lens Epithelial Cells via the p38 Pathway. *Oxid Med Cell Longev*.1-12.

BARTEKOVA M, BARANCIK M, FERENCZYOVA K, DHALLA NS (2018). Beneficial Effects of N-acetylcysteine and N-mercaptopyrionylglycine on Ischemia Reperfusion Injury in the Heart. *Curr Med Chem*, 25(3):355-366.

BLAUSTEIN A, DENEKE SM, STOLZ RI, BAXTER D, HEALEY N, FANBURG BL (1989). Myocardial glutathione depletion impairs recovery after short periods of ischemia. *Circulation*. 80(5):1449-57.

BRITTO RM, SILVA-NETO JAD, MESQUITA TRR, VASCONCELOS CML, DE ALMEIDA GKM, JESUS ICG, SANTOS PHD, SOUZA DS, MÍGUEL-DOS-SANTOS R, DE SÁ LA, DOS SANTOS FSM, PEREIRA-FILHO RN, ALBUQUERQUE-JÚNIOR RLC, QUINTANS-JÚNIOR LJ, GUATIMOSIM S, LAUTON-SANTOS S (2018). Myrtenol protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through antioxidant and anti-apoptotic dependent mechanisms. *Food Chem Toxicol*, 111:557-566.

BUJA LM (2005). Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol*,14(4):170-5.

CECONI C, CURELLO S, CARGNONI A, FERRARI R, ALBERTINI A, VISIOLI O (1988). The role of glutathione status in the protection against ischaemic and reperfusion damage: effects of N-acetyl cysteine. *J Mol Cell Cardiol*, 20(1):5-13.

CHEN Y, BA L, HUANG W, LIU Y, PAN H, MINGYAO E, SHI P, WANG Y, LI S, QI H, SUN H, CAO Y (2017). Role of carvacrol in cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through activation of MAPK/ERK and Akt/eNOS signaling pathways. *European Journal of Pharmacology*. (796):90-100.

DHALLA NS, SAINI HK, TAPPIA PS, SETHI R, MENGI SA, GUPTA SK (2007). Potential role and mechanisms of subcellular remodeling in cardiac dysfunction due to ischemic heart disease. *J Cardiovasc Med*, 8(4): 238-50.

DHALLA NS, ELMOSELHI AB, HATA T, MAKINO N (2000). Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 47(3):446-56.

DIXON IM, HATA T, DHALLA NS (1992). Sarcolemmal Na(+)-K(+)-ATPase activity in congestive heart failure due to myocardial infarction. *Am J Physiol*. 262(3 Pt 1):C664-71.

DIXON IM, KANEKO M, HATA T, PANAGIA V, DHALLA NS (1990). Alterations in cardiac membrane Ca<sup>2+</sup> transport during oxidative stress. *Mol Cell Biochem*, 99(2):125-33.

DURÇO AO, DE SOUZA DS, HEIMFARTH L, MÍGUEL-DOS-SANTOS R, RABELO TK,

OLIVEIRA BARRETO T, RHANA P, SANTOS SANTANA MN, BRAGA WF, SANTOS CRUZ JD, LAUTON-SANTOS S, SANTANA-FILHO VJ, BARRETO RSS, GUIMARÃES AG, ALVAREZ-LEITE JI, QUINTANS JÚNIOR LJ, VASCONCELOS CML, SANTOS MRVD, BARRETO AS (2019). d-Limonene Ameliorates Myocardial Infarction Injury by Reducing Reactive Oxygen Species and Cell Apoptosis in a Murine Model. *J Nat Prod.* 82(11):3010-3019. FRYE ER, BERK M (2018). The Therapeutic Use of N-Acetylcysteine (NAC) in Medicine, Ed.: Frye E.R., BERK M, s:91. GARCÍA-DORADO D, RUIZ-MEANA M, INSERTE J, RODRIGUEZ-SINOVAS A, PIPER HM (2012). Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res,* 94(2):168-80. GUNTURK EE, YUCEL B, GUNTURK I, YAZICI C, YAY A, KOSE K (2019). The effects of N-acetylcysteine on cisplatin induced cardiotoxicity. *Bratisl Lek Listy.* 120(6):423-428. HAN F, ZHOU D, YIN X, SUN Z, HAN J, YE L, ZHAO W, ZHANG Y, WANG Z, ZHENG L (2016). Paeoniflorin protects diabetic mice against myocardial ischemic injury via the transient receptor potential vanilloid 1/calcitonin gene-related peptide pathway. *Cell Biosci.* 6:37. HARAMAKI N, STEWART DB, AGGARWAL S, IKEDA H, REZNICK AZ, PACKER L (2018). Networking antioxidants in the isolated rat heart are selectively depleted by ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med.* 25(3):329-39. HAUSENLOY DJ, YELLON DM (2013). Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest,* 123(1):92-100. KALOGERIS T, BAINES CP, KRENZ M, KORTHUIS RJ (2016). Ischemia/Reperfusion. *Compr Physiol,* 7(1):113-170. KEANEY JF JR1, SIMON DI, FREEDMAN JE (1999). Vitamin E and vascular homeostasis: implications for atherosclerosis. *FASEB J.* (9):965-75. KELLY GS (1998), Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev,* 3(2):114-27. KONZ KH, HAAP M, HILL KE, BURK RF, WALSH RA (1989). Diastolic dysfunction of perfused rat hearts induced by hydrogen peroxide. Protective effect of selenium. *J Mol Cell Cardiol.* 21(8):789-95. LI JZ, TANG XN, LI TT, LIU, LJ, YU SY, ZHOU GY, SHAO QR, SUN HP, WU C, YANG Y (2016) Paeoniflorin inhibits doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis by downregulating micro RNA-1 expression. *Exp. Ther. Med.* 11: 2407–2412. MAKAZAN Z, SAINI HK, DHALLA NS (2007). Role of oxidative stress in alterations of mitochondrial function in ischemic-reperfused hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol,* 292(4):H1986-94. MARCHIOLI R (1999). Antioxidant vitamins and prevention of cardiovascular disease: laboratory, epidemiological and clinical trial data. *Pharmacol Res,* 40(3):227-38. MIWA K, IGAWA A, NAKAGAWA K, HIRAI T, INOUE H (1999). Consumption of vitamin E in coronary circulation in patients with variant angina. *Cardiovascular Research,* 45(1):291-298. MIWA K, IGAWA A, NAKAGAWA K, HIRAI T, INOUE H (1999). Consumption of vitamin E in coronary circulation in patients with variant angina. *Cardiovasc Res.* (1):291-8. MURALI R, KARTHIKEYAN A, SARAVANAN R (2013). Protective effects of D-limonene on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 112(3):175-81. NASCIMENTO GA, SOUZA DS, KIMA BS, VASCONCELOS CML, ARAUJO AAS, DURÇO AO, QUINTANS LJJ, ALMEIDA JRGS, OLIVEIRA AP, SANTANA-FILHO VJ, BARRETO AS, SANTOS MRV (2019). Bradycardic and Antiarrhythmic Effects of the D-Limonene in Rats. *Arq. Bras. Cardiol.* (113):5. NGUYEN KN, LANDMARK K (1996). Can vitamin E prevent development of coronary heart disease?. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 116(9):1109-13. OHTA H, ADACHI T, HIRANO K (1994). Internalization of human extracellular-superoxide dismutase by bovine aortic endothelial cells. *Free Radic Biol Med,* 16(4):501-7. PERSAD S, TAKEDA S, PANAGIA V, DHALLA NS (1997). Beta-adrenoceptor-linked signal transduction in ischemic-reperfused heart and scavenging of oxyradicals. *J Mol Cell Cardiol.* (2):545-58. PRICE JE, FOWKES FG (1997). Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular disease.

The epidemiological evidence. *Eur Heart J.* 18(5): 719–727. QIU Y, BERNIER M, HEARSE DJ (1990). The influence of N-acetylcysteine on cardiac function and rhythm disorders during ischemia and reperfusion. *Cardioscience*, 1(1):65-74. REHMAN MU, TAHIR M, KHAN AQ, KHAN R, ODAY-O-HAMIZA, LATEEF A, HASSAN SK, RASHID S, ALI N, ZEESHAN M, SULTANA S (2014). D-limonene suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and inflammation via repression of COX-2, iNOS, and NF#954;B in kidneys of Wistar rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 239(4):465-76. ROBERTO D1, MICUCCI P, SEBASTIAN T, GRACIELA F, ANESINI C (2010). Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: relation to H2O2 modulation and cell proliferation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 106(1):38-44. SAMUNI Y, GOLDSTEIN S, DEAN OM, BERK M (2013). The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta.* 1830(8):4117-29. SETHI R, TAKEDA N, NAGANO M, DHALLA NS (2000). Beneficial effects of vitamin E treatment in acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* (1):51-8. SHAO Q, MATSUBARA T, BHATT SK, DHALLA NS (1995). Inhibition of cardiac sarcolemma Na(+)-K+ ATPase by oxyradical generating systems. *Mol Cell Biochem*, 147(1-2):139-44. SHUKLA SK, GUPTA S, OJHA SK, SHARMA SB (2010). Cardiovascular friendly natural products: a promising approach in the management of CVD. *Nat Prod Res.* 24(9):873-98. SLEZAK J, TRIBULOVA N, PRISTACOVA J, UHRIK B, THOMAS T, KHAPER N, KAUL N, SINGAL PK (1995). Hydrogen peroxide changes in ischemic and reperfused heart. Cytochemistry and biochemical and X-ray microanalysis. *Am J Pathol*, 147(3): 772-81. SOUZA MC, VIEIRA AJ, BESERRA FP, PELLIZZON CH, NÓBREGA RH, ROZZA AL (2019). Gastroprotective effect of limonene in rats: Influence on oxidative stress, inflammation and gene expression. *Phytomedicine.* (53):37-42. STEARE SE, YELLON DM (1993). The protective effect of heat stress against reperfusion arrhythmias in the rat. *J Mol Cell Cardiol*, 25(12):1471-81. STEENBERGEN C, MURPHY E, WATTS JA, LONDON RE (1990). Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circ Res*, 66(1):135-46. SU W, ZHANG Y, ZHANG Q, XU J, ZHAN L, ZHU Q, LIAN Q, LIU H, XIA ZY, XIA Z, LEI (2016). N-acetylcysteine attenuates myocardial dysfunction and postischemic injury by restoring caveolin-3/eNOS signaling in diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*, 15:146. SUN J (2007). D-Limonene: safety and clinical applications. *Altern Med Rev.* (3):259-64. ŞENTÜRK T, ÇAVUN S, AVCI B, YERMEZLER A, SERDAR Z, SAVCI V (2014). Effective inhibition of cardiomyocyte apoptosis through the combination of trimetazidine and N-acetylcysteine in a rat model of myocardial ischemia and reperfusion injury. *Atherosclerosis*, 237(2):760-6. TANG LD, SUN JZ, WU K, SUN CP, TANG ZM (1991). Beneficial effects of N-acetylcysteine and cysteine in stunned myocardium in perfused rat heart. *Br J Pharmacol.* 102(3): 601–606. TANG XP, GUO XH, GENG D, WENG LJ (2019). d-Limonene protects PC12 cells against corticosterone-induced neurotoxicity by activating the AMPK pathway. *Environ Toxicol Pharmacol.* 70:103192. TEMSAH RM, NETTICADAN T, CHAPMAN D, TAKEDA S, MOCHIZUKI S, DHALLA NS (1999). Alterations in sarcoplasmic reticulum function and gene expression in ischemic-reperfused rat heart. *Am J Physiol.*, 277(2): H584-94. TRIPATHI Y, HEGDE BM (1998). Effect of N-acetylcysteine on myocardial infarct size following ischemia and reperfusion in dogs. *Indian J Physiol Pharmacol*, 42(1):50-6. TRİBBLE DL (1999). AHA Science Advisory. Antioxidant consumption and risk of coronary heart disease: emphasis on vitamin C, vitamin E, and beta-carotene: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation.* 99(4):591-5. VERMA N, YADAV A, BAL S, GUPTA R, AGGARWAL N (2019). In Vitro Studies on Ameliorative Effects of Limonene on Cadmium-Induced Genotoxicity in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Appl Biochem Biotechnol.* 187(4):1384-1397. VICTOR ANTONY SANTIAGO J, JAYACHITRA J, SHENBAGAM M, NALINI N (2012). Dietary d-limonene alleviates insulin resistance and oxidative stress-induced liver injury in high-fat

diet and L-NAME-treated rats. Eur J Nutr. 51(1):57-68.VRIES DN, FLORA DS (1993). N-acetyl-l-cysteine. J Cell Biochem Suppl, 17F:270-7.WANG S, WANG C, YAN F, WANG T, HE Y, LI H, XIA Z, ZHANG Z (2017). N-Acetylcysteine Attenuates Diabetic Myocardial Ischemia Reperfusion Injury through Inhibiting Excessive Autophagy. Mediators of Inflammation, 1-10.WANG X, LI G, SHEN W (2018). Protective effects of D Limonene against transient cerebral ischemia in stroke prone spontaneously hypertensive rats. Experimental And Therapeutic Medicine, 15: 699-706WANG X, LI G, SHEN W. Protective effects of D-Limonene against transient cerebral ischemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Exp Ther Med. 15(1):699-706WANG X, LI G, SHEN W (2018). Protective effects of D-Limonene against transient cerebral ischemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Exp Ther Med. (1):699-706.WERNS SW, FANTONE JC, VENTURA A, LUCCHESI BR (1992). Myocardial glutathione depletion impairs recovery of isolated blood-perfused hearts after global ischaemia. J Mol Cell Cardiol, 24(11):1215-20WOO YJ, ZHANG JC, VIJAYASARATHY C, ZWACKA RM, ENGLEHARDT JF, GARDNER TJ, SWEENEY HL (1998). Recombinant adenovirus-mediated cardiac gene transfer of superoxide dismutase and catalase attenuates postischemic contractile dysfunction. Circulation. 98(19 Suppl):II255-60.XIANCHI LI, MIN LIU, RONGRONG SUN, YI ZENG, SHUANG CHEN, PEIYING ZHANG (2016). Protective approaches against myocardial ischemia reperfusion injury (Review). Experimental And Therapeutic Medicine, 12: 3823-3829.XIAO D, WANG L, HUANG X, LI Y, DASGUPTA C, ZHANG L (2016) Protective Effect of Antenatal Antioxidant on Nicotine-Induced Heart Ischemia Sensitive Phenotype in Rat Offspring. PLoS ONE 11 (2): e0150557YANG CF (2018). Clinical manifestations and basic mechanisms of myocardial ischemia/reperfusion injury. Tzu Chi Medical Journal, 30(4): 209–215.ZHOU H, YANG HX, YUAN Y, DENG W, ZHANG JY, BIAN, ZY, ZONG J, DAI J, TANG QZ (2013). Paeoniflorin attenuates pressure overload-induced cardiac remodeling via inhibition of TGF#946;/Smads and NF-#954;B pathways. J. Mol. Histol. 44:357–367.

## **X. Ekler**

### **a) Mali Bilanço ve Açıklamaları:**

Toplam 19780,04 ? ödenek ile onaylanan projemiz kapsamında alınan tüm sarf ve kimyasal maddeler (19084 ? tutarında) kullanılmıştır.

### **b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar:**

Projemizde makine ve teçhizat için herhangi bir harcama yapılmamıştır.

### **c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar :**

Bulunmamaktadır.

### **d) Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar) (Altyapı ve Yönlendirilmiş Projeler için uygulanmaz):**

Bulunmamaktadır.

### **e) Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler (Altyapı ve Yönlendirilmiş Projeler için uygulanmaz):**

Bulunmamaktadır.