



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



İZOLE SIÇAN KALBİNDE OLUŞTURULAN İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNDE D-LİMONEN'İN ETKİLERİ

Damla Gizem SABUR

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. A. Tanju ÖZÇELİKAY**

**ANKARA
2020**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İZOLE SIÇAN KALBİNDE OLUŞTURULAN
İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNDE
D-LİMONEN'İN ETKİLERİ**

Damla Gizem SABUR

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. A. Tanju ÖZÇELİKAY**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
18L0237006 proje numarası ile desteklenmiştir**

**ANKARA
2020**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “İzole Sıçan Kalbinde Oluşturulan İskemi Reperfüzyon Hasarı Üzerinde d-limonen'in Etkileri” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Damla Gizem SABUR

Tarih: 14/07/2020

İmza

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon Hasarı	1
1.1.1. Miyokardiyal İskemi Hasarı	1
1.1.2. Miyokardiyal Reperfüzyon Hasarı	2
1.2. Oksidatif Stres	3
1.2.1. İskemi Reperfüzyon Hasarında Oksidatif Stresin Rolü	4
1.3. Antioksidanlar ve etki mekanizmaları	5
1.3.1. Antioksidanların İskemi Reperfüzyon Hasarındaki Rolü	6
1.3.1.1. N-Asetil L-Sistein	7
1.3.1.2. Monoterpenler	11
1.3.1.3. d-limonen	12
2. GEREÇ VE YÖNTEM	16
2.1. Kullanılan Gereçler	16
2.1.1. Malzemeler	16
2.1.2. Kimyasal maddeler	17
2.1.3. Biyokimyasal Analizler İçin Kullanılan Kitler	17
2.1.4. Deney hayvanları	18
2.2. Kullanılan Yöntemler	18
2.2.1. Deney Grupları	18
2.2.2. Langendorff Kalp Preparatının Hazırlanması	19
2.2.3. Biyokimyasal Analizler	19
2.2.3.1. LDH Ölçümü	19
2.2.3.2. Oksidatif Stres Parametrelerinin Ölçümü	20
2.3. İstatistiksel analiz	22
3. BULGULAR	23
3.1. İskemi Reperfüzyon Sonucu Kalp Fonksiyonundaki Değişiklikler	23
3.2. İskemi Reperfüzyon Sonucu Kalp Dokuları Üzerindeki Biyokimyasal Değişiklikler	29
4. TARTIŞMA	31
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	36
ÖZET	37
SUMMARY	38
KAYNAKLAR	39
EKLER	45

Ek1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı	45
ÖZGEÇMİŞ	47



ÖNSÖZ

Yapılan araştırmalar, doğal ürünlerin içeriğindeki bazı moleküllerin çeşitli kardiyak bozukluklara karşı yararlı etkiler oluşturduğunu göstermiştir Özellikle son yıllarda d-limonen ile yapılan çalışmalarda antioksidan etkisi gösterilmiş olup, kalp üzerinde çeşitli etkilerinin bulunduğu da ortaya konmuştur. Bu nedenle tezin içeriğini, d-limonenin iskemi reperfüzyon hasarındaki koruyucu etkisinin ve antioksidan özelliğinin araştırılması oluşturmaktadır.

Yüksek lisans eğitimim süresince, tecrübesi, bilgi birikimi ve deneysel çalışmalarına olan katkılarına her aşamada bana destek olan, tüm süreç içerisinde her konuda anlayış ve hoşgörüyle yol gösterip gelişimime katkıda bulunan danışman hocam Sayın Prof. Dr. A.Tanju ÖZÇELİKAY'a,

Desteklerini her zaman yanımda hissettiğim değerli öğretim üyeleri, Prof. Dr. Arzu ONAY BEŞİKCİ, Prof.Dr. Nuray ARI, Prof. Dr. Serap GÜR, Doç.Dr. Ebru ARIOĞLU İNAN, Doç. Dr. Işıl ÖZAKCA GÜNDÜZ, ve Dr. Gizem KAYKI MUTLU'ya,

Özellikle deneysel çalışma dönemim süresince hiçbir konuda yardımını esirgemeyen, her koşulda destek olan, bütün süreci benim için kolaylaştıran ve hayatımda benim için ayrı yerleri bulunan Arş. Gör. Dr. Berna GÜVEN, Arş. Gör. Betül Rabia ERDOĞAN, Arş. Gör. Dr.Aysu SELÇUK, Ecz. Heba ASKER, Ecz. Zeynep Elif YEŞİLYURT, Ecz. Zümra KARA'ya,

A.Ü.E.F. Farmakoloji Anabilim Dalı çalışanlarına,

Süreç içerisinde en zorlu dönemlerimde, hayatın her alanında bana destek olan, başta çalışma azmini ve kendisini örnek aldığım Uzm.Ecz. Caner ERYOL olmak üzere, Y. Müh. Berkay Kaan KARATAŞ ve Ecz. Bedriye TAŞKIN'a,

Her zaman yanımda olan ve benim için bugüne kadar büyük emek sarfeden, varlıklarıyla hayatımı anlamlı, değerli ve güzel kılan, bana güvenip her kararına saygı duyan ve hep arkamda durup destek olan sevgili aileme; annem Ayla SABUR, babam Öztürk SABUR ve abim Çağdaş Uğur SABUR'a sonsuz teşekkürler...

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP	Adenozin Trifosfat
CK-MB	Plazma Kreatin Kinaz Miyokard İzoenzimi
CMLC-1	Kardiyak Miyozin Hafif Zincir-1
cTnI	Kardiyak Troponin-I
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	İndirgenmiş Glutasyon
GSSG	Oksitlenmiş Glutasyon
GST	Glutasyon-S-Transferaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HR	Heart Rate (Kalp Atım Hızı)
İ.P.	İntraperitoneal
İ.V.	İntravenöz
İ/R	İskemi/Reperfüzyon
LDH	Laktat Dehidrogenaz
L-NAME	NG-Nitro-L-Arginin Metil Esteri
LVDP	Sol Ventrikül Diyastolik Basıncı
LVEDP	Sol Ventrikül Diyastol Sonu Basıncı
MDA	Malondialdehit
mPTP	Mitochondrial Permeability Transition Pore
NAC	N-Asetil-L-Sistein
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat-H
O [·]	Reaktif Süperoksit
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
RPP	Rate Pressure Product (Hız Basıncı Ürünü)
S.C.	Subkutan
SL	Sarkolemmal
SOD	Süperoksit Dizmutaz
STZ	Streptozosin
-dP/dt	Basıncı Düşüş Hızı
+dP/dt	Basıncı Gelişme Hızı
-SH	Sülfidril
-OH	Hidroksil

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. İskemi-reperfüzyon hasarında meydana gelen majör patolojik olaylar	3
Şekil 1.2. İskemi reperfüzyon hasarı sonucu kardiyak fonksiyon bozukluğu gelişiminde rol oynayan kardiyomiyositlerde oksidatif strese bağlı hücre içinde meydana gelen değişiklikler	5
Şekil 1.3. NAC'in mitokondrideki koruyucu mekanizmaları	8
Şekil 1.4. NAC'in biyolojik aktiviteleri için olası mekanizmalar	9
Şekil 3.1. LVDP'deki değişimleri gösteren orjinal kayıtlar	24
Şekil 3.2. İskemi-reperfüzyon periyodu süresince elde edilen verilerin grafiği	26
Şekil 3.3. İskemi-reperfüzyon periyodu süresince elde edilen verilerin grafiği	27
Şekil 3.4. İskemi ve reperfüzyon süreçlerinin sonunda elde edilen değerlerin yüzde değişim grafiği.	28

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. İzole kalplerde iskemi öncesi ve reperfüzyon sonunda toplanan perfüzlarda ölçülen reperfüzyon sonundaki LDH miktarının iskemi öncesindeki LDH miktarına göre yüzde artışı	29
Çizelge 3.2. İzole kalp dokularında ölçülen total antioksidan ve oksidan seviyeleri	29
Çizelge 3.3. İzole kalp dokularında ölçülen diğer oksidatif stres parametreleri	30



1. GİRİŞ

1.1. Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon Hasarı

Kardiyovasküler hastalıklar dünyada ve özellikle gelişmiş ülkelerde ölüm nedenlerinin başında gelmektedir (Dhalla ve ark., 2007). İskemi-reperfüzyon (İ/R), şiddetli miyokardiyal iskemisinden kaynaklanan hasarı azaltmak ve kan akışını yeniden sağlamak amacıyla yaygın olarak kullanılan; tromboliz, anjiyoplasti ve koroner bypass operasyonu gibi prosedürlerle ilişkili klinik bir problemdir (Dhalla ve ark., 2000). Kalpte İ/R hasarı; iskemik kalp hastalığı, miyokard infarktüsü gibi patolojik durumlar yanında anjiyoplasti ve koroner bypass cerrahisi gibi müdahaleler sırasında da ortaya çıkabilmektedir (Dhalla ve ark., 2000). İ/R sonucunda kalpte; kontraktıl disfonksiyon, metabolik anormallikler, subselüler bozukluklar, apoptoz, aritmi ve kardiyomiyositlerde geri dönüşümsüz hasar oluşmaktadır (Bartekova ve ark., 2018). Oksidatif stres ve Ca^{+2} overload'u (hücre içinde aşırı kalsiyum birikimi), iskem-reperfüzyonun hasarında ortaya çıkan söz konusu bozuklukları açıklamak için öne sürülen iki önemli mekanizmadır (Dhalla ve ark., 2000). Her iki mekanizmanın da birbiri ile ilişkili olduğu düşünülmekle birlikte, hangisinin daha önce olduğu konusunda net bir bilgi bulunmamaktadır (Dhalla ve ark., 2000).(Şekil 1.1).

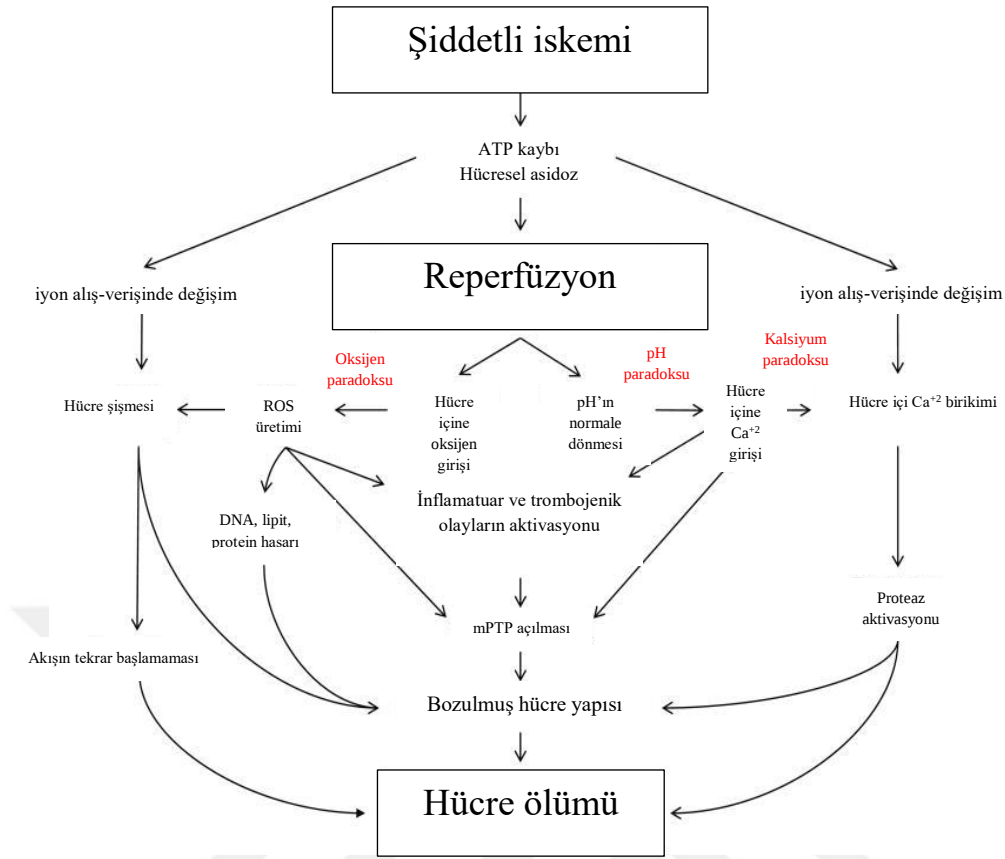
1.1.1. Miyokardiyal İskemi Hasarı

Miyokardiyal iskemik hasar, koroner kan akımının ciddi şekilde bozulmasından kaynaklanır (Buja, 2005). Dokuya giden kan akışının azalmasıyla meydana gelen oksijen eksikliği ile, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon hızla durur, bunun sonucunda enerji metabolizması için majör adenosin trifosfat (ATP) kaynağında kayıp oluşur. ATP üretiminin telafisi için anaerobik glikolizdeki artış, hücre içi asidoz ve hücrede hidrojen ile laktat birikimine yol açar (Buja, 2005). H^+ , hücresel pH'ı düşürerek enzim aktivitesinde bozulmaya neden olur (Wu ve ark., 2018). Hücre içi artmış H^+ , Na^+/H^+ değiştiriciyi aktive ederek hücre içi Na^+ artışına yol açar. Asit ve

yetersiz ATP nedeniyle azalmış Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi, hücre içi Na^+ düzeyini artırır. Bunun sonucunda sarkolemmal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ değiştiricisi ters yönde çalışarak intraselüler Ca^{+2} birikimine sebep olur. Ca^{+2} deki bu artış hücrese ATP'nin tüketilmesini hızlandırır ve iskemik hücre hasarı oluşturur (Steenbergen ve ark., 1990).

1.1.2. Miyokardiyal Reperfüzyon Hasarı

Reperfüzyon, iskemik miyokardiyum hasarını önlemede gerekli olmasına karşın, yeterli süre içerisinde sağlanmazsa paradoksal olarak iskemik hasarın daha da şiddetlenmesine neden olmaktadır (Dorado ve ark., 2012). Akut miyokard iskemisi sırasında görülen hücre içi pH düşüşü, reperfüzyon sırasında laktatın temizlenmesi ve Na^+/H^+ değiştiricisinin aktivasyonu ile hızla normale döndürölür (Hausenloy ve ark., 2013). Reperfüzyon sırasında hızlı pH değişiminin mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneklerinin (mPTP) açılmasına izin vererek, kardiyomiyosit ölümüne ve sitotoksitenin artmasına yol açabileceği gösterilmiştir (pH paradoksu) (Yang, 2018). pH'ın normale dönüşü, Ca^{+2} hücre içine girişini artırırken (kalsiyum paradoksu), oksijen akışı, ksantin oksidaz tarafından indüklenen reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini artırır (oksijen paradoksu) (Kalogeris ve ark., 2017). Bunun gibi çeşitli mekanizmalar tarafından üretilen ROS, hücrelerde lipit, protein ve DNA yapısında değişikliklere yol açarak, hücre membran permeabilitesini artırır ve hücre ölümüne neden olur (Kalogeris ve ark., 2017). ROS aynı zamanda gerek enflamatuar ve trombojenik olayları tetikler, gerekse doğrudan mPTP'nin açılmasına yol açar (Logue ve ark., 2005). Bu durum sitokrom C ve proapoptotik moleküllerin salgılanması sonucu kardiyomiyosit ölümüne neden olur (Gottlieb, 2003).



Şekil 1.1. İskemi-reperfüzyon hasarında meydana gelen majör patolojik olaylar (Kalogeris ve ark., 2017).

1.2. Oksidatif Stres

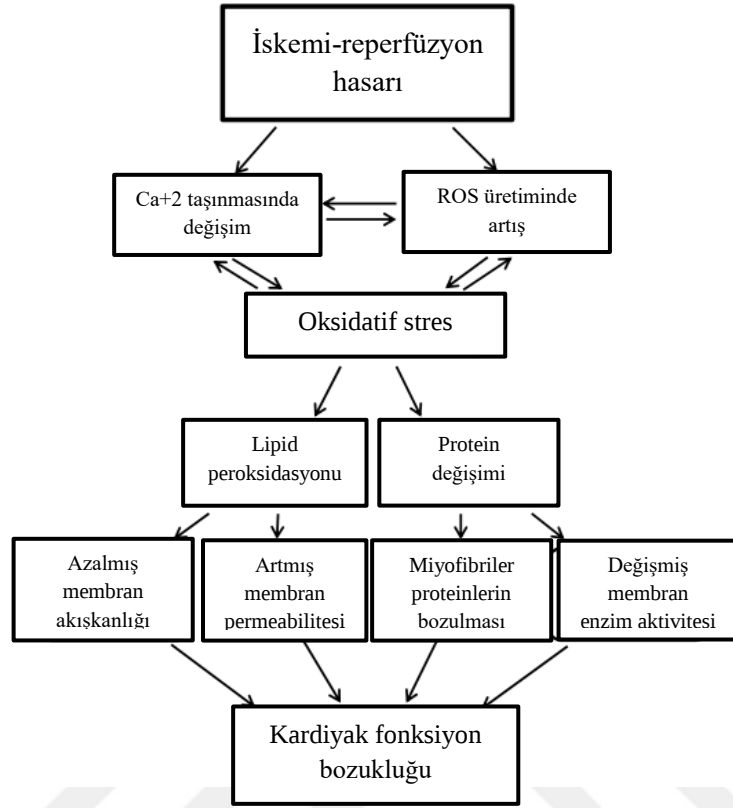
İn vivo olarak fazla ROS üretimi, vücudun peroksitleri temizleme kapasitesini azaltarak, oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengeye zarar verir ve bu da dokuda oksidatif hasara yol açar (Shen ve ark., 2019). Genellikle ROS üretiminin artışından kaynaklı olan oksidatif stres, metabolik değişiklikler yanında fosfolipit ve protein yapısını bozarak lipid peroksidasyonu ve tiyol gruplarının oksidasyonuna yol açıp çeşitli proteinlerin fonksiyonlarında ve membran geçirgenliğinde değişime neden olmaktadır (Dhalla ve ark., 2000). Oksidatif stres, sarkolemmal (SL) Ca^{+2} ATPaz pompasında ve Na^{+} - K^{+} ATPaz aktivitesini azaltarak hücreye Ca^{+2} girişini arttırırken çıkışını azaltır ve bunun sonucu hücre içi Ca^{+2} birikimine yol açar (Dixon ve ark., 1990; Dixon ve ark., 1992). Buna ek olarak oksidatif stres aynı zamanda sarkoplazmik retikulum Ca^{+2} -ATPaz pompasını da inhibe ederek hücre içinde daha fazla Ca^{+2}

birikimine ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Netticadan ve ark., 1999). Bu değişimler aynı zamanda koroner arter düz kas hücrelerinde de gözlenmektedir (Elmoselhi ve ark., 1994; Grover ve ark., 1995). Oksidatif stres kaynaklı bu hasar, katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi birçok antioksidan tarafından azaltılabilmektedir (Dhalla ve ark., 2000). Öte yandan iskemi sırasında hücre içi Ca^{+2} düzeyindeki artış, ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümünü sağlayarak, süperoksit radikallerinin üretimine yol açmaktadır (Goldhaber ve Weiss, 1992). Bir ksantin oksidaz inhibitörü olan allopurinolün kalpte iskemi-reperfüzyon hasarını önlediği gösterilmiştir (Arnold ve ark., 1980).

1.2.1. İskemi Reperfüzyon Hasarında Oksidatif Stresin Rolü

Yapılan çalışmalarda İ/R hasarının en azından kısmen oksidatif stres ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Dhalla ve ark., 2000). Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit radikalleri, hidroksil radikali ve peroksinitrat gibi ROS'ların iskemi sonrası reperfüzyon sonucu arttığı gösterilmiştir (Slezak ve ark., 1995). İskemi-reperfüzyon sonucu kalplerde, kontraktıl fonksiyonda azalma, aritmi, gen ekspresyonunda değişiklik ve adrenerjik aktivite kaybı saptanmıştır (Temsah ve ark., 1999). Benzer sonuçlar, çeşitli şekilde ROS oluşturulmuş ortamda perfüze edilen kalplerde de tespit edilmiştir (Shao ve ark., 1995).

İzole edilmiş sıçan kalplerinde 30 dakika global iskemiye takiben 60 dakika reperfüzyonun, sol ventrikül diyastolik basıncı (LVDP), $+dP/dt$ (basınç gelişme hızı) ve $-dP/dt$ (basınç düşüş hızı) değerlerini azaltıp, sol ventriküler diyastol sonu basıncı (LVEDP) arttırarak kontraktıl fonksiyonlarda değişme neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca iskemi-reperfüzyonun, H_2O_2 , Ca^{+2} i, MDA içeriklerinde artışa yol açtığı, SOD ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerle tedavinin bu değişikliklere karşı koruyucu olduğu saptanmıştır (Temsah ve ark., 1999). (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. İskemi reperfüzyon hasarı sonucu kardiyak fonksiyon bozukluğu gelişiminde rol oynayan kardiyomiyositlerde oksidatif strese bağlı hücre içinde meydana gelen değişiklikler (Bartekova ve ark., 2018).

1.3. Antioksidanlar ve etki mekanizmaları

Miyokardiyal antioksidanlar, hücre içi düzeyde protein, karbohidrat, lipit ve DNA üzerinde oksidatif hasarı azaltan ya da geciktiren maddeler olarak tanımlanmaktadır. Antioksidanların birçok mekanizma ile etki ettiği öne sürülmüştür; ROS veya prokürsörlerinin süpürülmesi, ROS üretiminin inhibe edilmesi, metal iyonlarına bağlanma yoluyla ROS üretiminin katalizinin zayıflatılması, endojen antioksidan üretiminin artırılması ve anti-apoptotik gen düzeyini artırarak apoptotik hücre ölümünün azaltılması (Dhalla ve ark., 2000).

Antioksidanlar genellikle endojen (vücutta üretilen) ve eksojen (dışardan alınan) olarak sınıflandırılmaktadır (Dhalla ve ark., 2000). Bu konuda SOD, CAT, C ve E vitaminleri gibi endojen antioksidan enzimler dışında (1,2) N-asetilsistein (NAC), N-merkaptopropionilglisin, polifenoller (resveratrol, quercetin, epikateşin), kurkumin, ve doğal bitki ekstaktları gibi antioksidan özelliği olan bazı eksojen ajanların kalpte İ/R hasarını azalttığı ifade edilmektedir (Bartekova ve ark., 2018). Kardiyak korumada antioksidanların terapötik etkisi ve yüksek koruyucu etkisini gösteren klinik çalışmalar mevcuttur (Bagheri ve ark., 2016).

Endojen antioksidanlardan SOD, süperoksit anyon radikalının H_2O_2 'ye dönüşümünü katalize eder. SOD, endotel hücre yüzeyi ve sitoplazmada CuSOD veya ZnSOD şeklinde, mitokondride ise MnSOD formunda bulunmaktadır (Ohta ve ark.,1994). H_2O_2 , glutatyon peroksidaz (GPx) gibi peroksidazlar veya CAT aracılığıyla H_2O ve O_2 'ye dönüştürülür. GPx, bu reaksiyonu indirgenmiş glutatyon (GSH) varlığında gerçekleştirerek aynı zamanda oksitlenmiş glutatyon (GSSG) açığa çıkmasına yol açar. GSSG ise tekrar GSH'ye dönmek için nikotinamid adenin dinükleotit fosfat-H (NADPH)'a gereksinim duymaktadır. GPx aktivitesi katalazdan çok daha fazla olduğu için, kalpte H_2O_2 gibi serbest radikallerin süpürülmesinde daha önemli bir rol oynamaktadır (Ohta ve ark.,1994). Öte yandan CAT, peroksizomda bulunan membrana bağlı bir enzim olmasına karşın mitokondriyal matrikste de aktivite göstermektedir (Steare ve Yellon, 1993).

1.3.1. Antioksidanların İskemi Reperfüzyon Hasarındaki Rolü

Miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarında antioksidanların yararlı etkilerinin olduğunu konusunda çelişkili sonuçlar mevcuttur (Nguyen ve Landmark, 1996; Persad ve ark., 1997; Price ve ark., 1997; Miwa ve ark., 1999; Marchioli, 1999; Tribble, 1999). Çeşitli deneysel yöntem ve teknikler, kullanılan hayvan türündeki farklılıklar, farklı özelliklerde antioksidanların kullanılması, İ/R süresi bu çelişkili sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Dhalla, 2000). İskemik kalpte endojen antioksidanların azaldığı ve bunun İ/R şiddetine bağlı olduğu gösterilmiştir (Haramaki

ve ark., 1998). İzole sıçan kalbinde, askorbat ve glutatyon gibi hidrofilik antioksidanların düzeyinin 40 dakikalık reperfüzyon süresince azaldığı, oksitlenmiş formlarının ise arttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte ubikinol-9 ve vitamin E gibi lipofilik antioksidanların düzeyinin ancak daha şiddetli bir İ/R hasarı sonucu azaldığı saptanmıştır (Nguyen ve Landmark, 1996; Marchioli, 1999; Tribble, 1999).

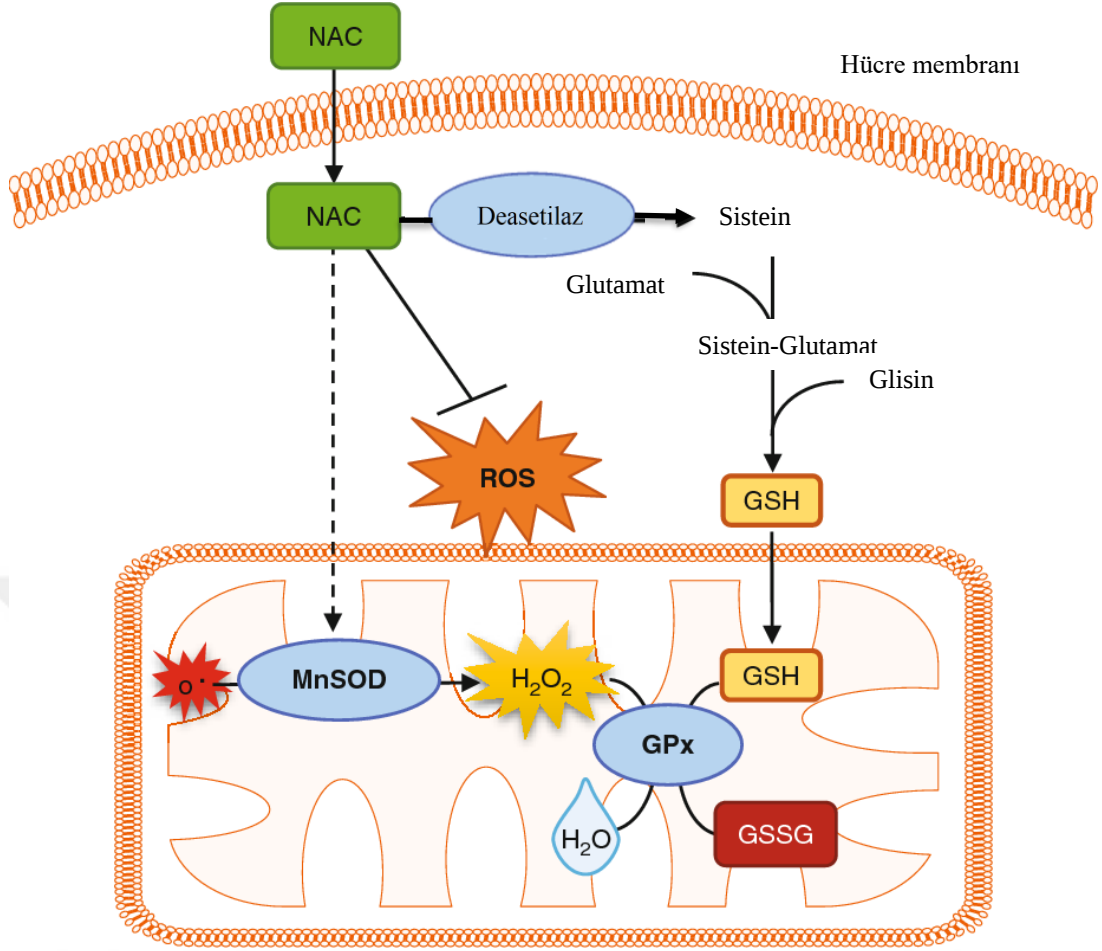
CAT ve SOD gibi endojen antioksidanların İ/R sırasında miyokardda meydana gelen hasarı önlemede önemli rol oynadığı rapor edilmiştir (Woo ve ark., 1998). Benzer şekilde GPx' in de İ/R'de miyokardiyumu koruduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir (Blaustein ve ark.,1989; Werns ve ark., 1992). Selenyum gibi glutatyon döngüsü için gerekli bir koenzim eksikliğinin de sıçan kalplerini oksidatif hasara karşı daha duyarlı hale getirdiği öne sürülmüştür (Konz ve ark., 1989).

Plazmada yer alan ve yağda çözünen bir antioksidan olan Vitamin E, oksidatif stresi azaltarak akut iskemide yararlı etkiler gösterdiği bilinmektedir (Keaney ve ark., 1999; Spencer ve ark., 1999). Koroner tıkanıklık sebebiyle mortalite görülen sıçanlarda vitamin E tedavisinin, mortalite oranını kontrol grubuna göre %50 azalttığı ve aritmik değişiklikleri önemli derecede azalttığı gösterilmiştir (Sethi ve ark., 2000).

1.3.1.1. N-Asetil L-Sistein

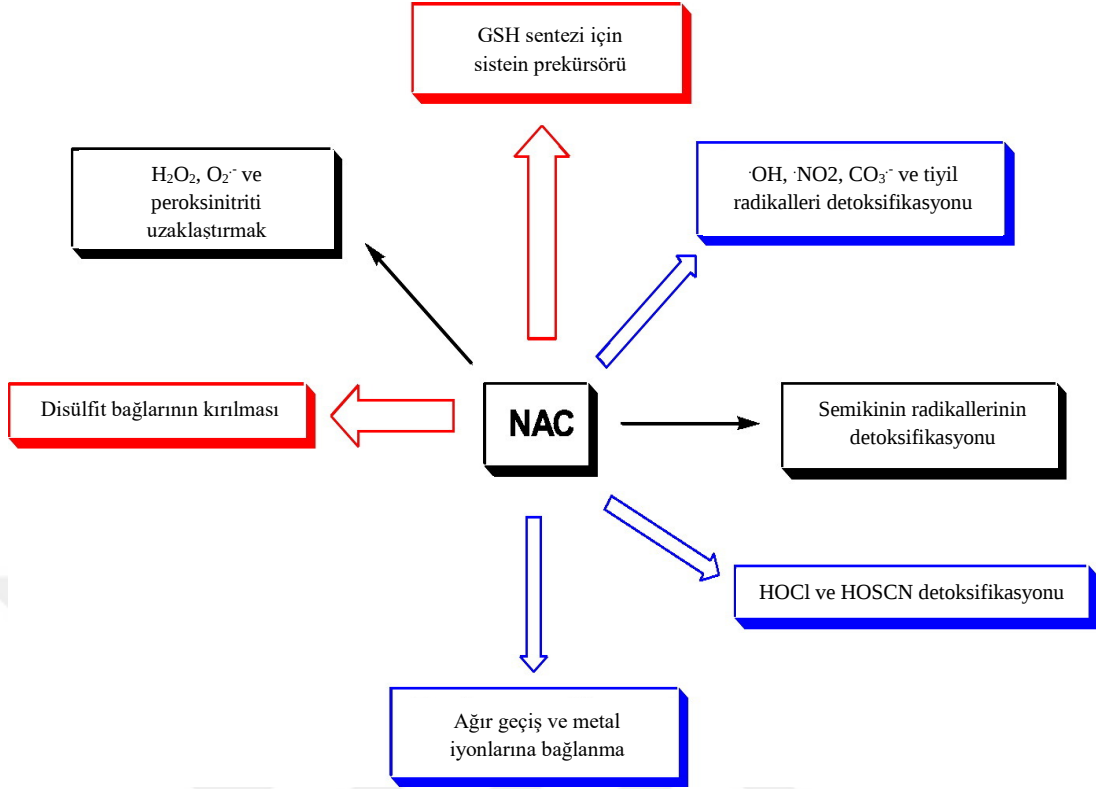
L-sistein aminoasitin asetilenmiş formu olan NAC, GSH prekürsörüdür. Klinikte 50 yıldan fazla süredir mukolitik ajan olarak kullanılmakta olup; sülfidril grubu (-SH) kaynağı olmasından dolayı kalp hastalıkları da dahil olmak üzere, oksidatif stres ve GSH düşüşü ile karakterize olan çeşitli klinik durumlarda NAC ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Kelly, 1998).

-SH grupları, ROS'a karşı savunma için gereklidir (Aruoma ve ark., 1989). NAC, GSH sentezini stimüle ederek glutatyon S-transferaz (GST) aktivitesini artırır, detoksifikasyonu güçlendirir ve aynı zamanda doğrudan serbest radikal süpürücüdür (Vries ve ark., 1993) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. NAC'in mitokondrideki koruyucu mekanizmaları. NAC, hücre içinde reaktif oksijen türlerini doğrudan temizleyebilir. Hücre içinde NAC deasetilasyonu, GSH sentezi için sistein üretimi sağlar. Sitozolde sentezlenen GSH, GPx aracılığıyla H₂O₂'nin H₂O'ya dönüşümünün devamlılığını sağlaması açısından önemlidir. Elektron taşıma zinciri tarafından üretilen reaktif süperoksit (O₂⁻), mitokondride bulunan MnSOD ile H₂O₂'ye dönüştürülür. Mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte NAC, MnSOD seviyesini artırmaktadır (Frye ve Berk., 2018).

NAC'in antioksidan özelliği ile ilişkili olası diğer mekanizmalar Şekil 1.4'te gösterilmiştir.



Şekil 1.4. NAC'in biyolojik aktiviteleri için olası mekanizmalar (kırmızı renk: başlıca mekanizmalar, mavi renk: olası mekanizmalar, siyah renk: fizyolojik koşullar altında önemi olmayan mekanizmalar). (Ssmuni ve ark., 2013)

Miyokardiyal iskeminin hücre içi tiyol kaynağı ve proteinlerin -SH gruplarının içeriğinde önemli bir azalmaya yol açtığı bilinmektedir. Bu nedenle, kalpte İ/R kaynaklı oksidatif hasarı azaltma potansiyeline sahip bir kardiyoprotektif ajan olan NAC ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır (Bartekova ve ark., 2018). Bu çalışmaların birçoğunda NAC'in, kalbin mekanik fonksiyonlarında iyileşme sağladığı, ventriküler aritmi insidansını ve İ/R'ye bağlı miyokard hasarını azalttığı gösterilmiştir (Qiu ve ark., 1990; Tang ve ark., 1991). Kardiyak İ/R sırasında koroner akışı korumasının ve arttırmasının yanı sıra, hücrelerdeki hidroksil (-OH) ve glutatyon içeriğini değiştirmesi aracılığıyla etki gösterdiği düşünülmektedir (Tang ve ark., 1991).

Ayrıca NAC'in İ/R kaynaklı GSSG birikimini ortadan kaldırarak, dokudaki GSH ve proteinlerdeki -SH içeriğini arttırdığı gösterilmiştir (Ceconi ve ark., 1988; Aberola ve ark., 1991)

Mitokondriyal oksidatif fosforilasyondaki İ/R kaynaklı hasarın NAC ile ön tedavi sonucu azaldığı belirtilmiştir (Makazan ve ark., 2007). Benzer şekilde NAC uygulamasının hemorojik şok modelinde miyokard hasarını ve ödemin yanı sıra oksidatif stresi azalttığı rapor edilmiştir (Bartekova ve ark., 2018).

Köpeklerde NAC uygulamasının serbest radikal aracılı reperfüzyon hasarı üzerindeki rolünü incelenmek için tasarlanan bir çalışmada, sol inen koroner arterin 90 dakika tıkanmasından sonra 4 saat reperfüzyon uygulanmıştır. Reperfüzyon sırasında 1 saat boyunca 250 mg/kg, 3 saat boyunca idame doz olarak 70 mg/kg NAC uygulanan köpeklerde LVEDP ve lipid peroksidasyonunun tedavi edilmeyen gruba göre anlamlı olarak düşük olduğu gözlemlenmiştir (Tripathi ve Hedge, 1998)

Sıçan modelinde sol ana koroner arter altındaki bir alanın 30 dakika boyunca ligasyonu ve ardından 3 saatlik reperfüzyonunu içeren protokol uygulanan bir çalışmada, iskemik periyodun ortasında 50 mg/kg ve 150 mg/kg dozlarında NAC intravenöz (i.v.) olarak enjekte edilmiştir. Reperfüzyon sonunda, hücre ölümünün belirteçleri ve oksidatif stres belirteci olan malondialdehit (MDA) seviyesini ölçmek için hayvanlardan kan örnekleri alınmıştır. NAC'ın, tek başına veya kombinasyon halinde, kontrol grubuna kıyasla serum MDA seviyelerini dolayısıyla oksidatif stresi, enfarktüs alanını ve apoptotik aktiviteyi önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir (Şentürk ve ark., 2014)

Fetal nikotin maruziyetinin kardiyovasküler hastalık geliştirme riski üzerinde yapılan bir çalışmada, gebe sıçanlara gestasyonun 4.gününden doğum sonrası 10. güne kadar subkutan (s.c.) yolla ozmotik minipompalarla nikotin uygulanmış, grupların birine içme suyu ile NAC verilmiş, diğerine verilmemiştir. 8 aylık yavru sıçanların izole edilmiş kalpleri Langendorff sisteminde perfüze edilmiştir. Perinatal nikotin uygulamasının iskemi ve reperfüzyonun neden olduğu sol ventrikül hasarını önemli ölçüde arttırdığı, sol ventrikül fonksiyonunun ve koroner akış hızının iskemi sonrası iyileşmesini azalttığı, reaktif oksijen türlerinin üretimini arttırdığı gözlemlenmiş olup, NAC tedavisi uygulanan grupta reaktif oksijen türlerinin üretiminde nikotin aracılı artışı inhibe ettiği gözlemlenmiştir. NAC tedavisinin aynı zamanda kalpte perinatal

nikotin kaynaklı iskemi artışı ve reperfüzyon hasarını bloke etmiş olduğu belirtilmiştir (Xiao ve ark., 2016)

Streptozosin (STZ) uygulaması ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda 4 hafta oral gavaj yolu ile uygulanan 1,5 g/kg/gün dozda NAC tedavisinin kardiyak fonksiyonlar üzerindeki etkisi incelenmiştir. NAC tedavisinin, miyokardiyal disfonksiyonu ve miyokardiyal İ/R hasarını azalttığı, kardiyak hipertrofiyi iyileştirdiği belirtilmiştir (Wating ve ark.,2016).

Diyabetik miyokardiyal İ/R hasarında; 4 hafta boyunca 1,5 mg/kg/gün dozda NAC uygulanan sıçanlarda kontrol gruba göre oksidatif stres ve kardiyak parametreler karşılaştırılmıştır. NAC uygulamasının, diyabetik hayvanlarda İ/R kaynaklı oksidatif stres artışını ve kardiyak apoptozdaki artışları önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (Wang ve ark., 2017)

3 gün boyunca intraperitoneal (i.p.) (250 mg/kg/gün dozda) uygulanmış NAC'in, sisplatin kaynaklı kardiyotoksisiteye olan etkisi incelenen bir çalışmada; plazma kreatin kinaz miyokard izoenzimi (CK-MB), laktat dehidrogenaz (LDH), kardiyak troponin-I (cTnI) ve kardiyak miyozin hafif zincir-1 (CMLC-1) gibi kardiyak parametreler ölçülerek kalp fonksiyonları değerlendirilmiştir. Aynı zamanda kalp dokularında total oksidan kapasite, total antioksidan kapasite, lipid hidroperoksit ve tiyol seviyeleri ölçülmüş, kalp histopatolojik olarak analiz edilmiştir. Sisplatinin, dokuda total oksidan kapasite ve lipid hidroperoksit seviyelerini arttırırken, total antioksidan kapasite ve total antioksidan seviyelerini azalttığı tespit edilmiştir. Sisplatin uygulamasından sonra NAC tedavisinin kalpteki histolojik ve fonksiyonel değişiklikleri iyileştirdiği gözlenmiştir (Gunturk ve ark., 2019).

1.3.1.2. Monoterpenler

Bazı tıbbi bitkilerin uçucu yağlarında bulunan fitokimyasallar grubundaki monoterpenlerin, akut miyokard enfarktüs (Han ve ark., 2016), doksorubisin kaynaklı

kardiyotoksosite (Li ve ark., 2016) ve kardiyak yeniden modellenmeye (Zhou ve ark., 2013) karşı kardiyoprotektif etki gösterdiği bilinmektedir.

Bir monoterpen olan mirtenol'ün de, gastroprotektif, antinosiseptif, antikanser, antihiperglisemik, antihipertansif, antiinflamatuvar ve antioksidan aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda İ/R hasarı üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada antioksidan rol oynayan mirtenolün sıçan kalbinde İ/R hasarına karşı koruma sağladığı belirtilmiştir. (Britto ve ark., 2018)

Miyokardiyal İ/R hasarı üzerindeki etkileri araştırılan bir monoterpen olan karvakrol, sıçanlara 7 gün boyunca 25, 50 ve 100 mg/kg dozlarda i.p. olarak uygulanmış ve kardiyak parametreler ile birlikte biyokimyasal ölçümler yapılmıştır. 50 ve 100 mg/kg dozlarında, İ/R grubuna göre MDA düzeylerinde anlamlı bir azalma, CAT düzeylerinde ve SOD seviyelerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Karvakrolün aynı zamanda iskemi reperfüzyon modeli ile karşılaştırıldığında kardiyomiyosit apoptozisinde ve enfarktüs hacminde önemli bir düşüşe yol açtığı belirtilmiştir (Chen ve ark., 2017)

1.3.1.3. d-limonen

Limonen de, insanlar tarafından ağırlıklı olarak turuncgiller, havuç, kahve, portakal ve hindistan cevizi gibi geleneksel gıdaların bir bileşeni olarak tüketilen monosiklik bir terpendir (Roberto ve ark., 2009). 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-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 son yıllarda yapılan birçok araştırma, d-limonenin güçlü antioksidan özelliklere sahip olduğunu ve organizmaları oksidatif hasardan koruduğunu göstermiştir (Wang ve ark.,

2018). Bu çalışmalarda d-limonenin lipit 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).

Yüksek yağlı diyetle beslenen ve NG-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) tedavisi uygulanan sıçanlarda insülin direnci ve oksidatif stres kaynaklı karaciğer hasarında limonenin etkileri üzerine yapılan bir çalışmada, sıçanlar %2 d-limonen içeren yemler ile 4 hafta boyunca tedavi edilmiştir. Yüksek yağlı diyet ile beslenen L-NAME uygulanan sıçanlarda sistolik kan basıncı ve kalp atım hızında (HR) artış, antioksidan düzeyinde azalma gözlemlenmiştir. Meydana gelen metabolik ve patolojik değişimlerin d-limonen tedavisi alan sıçanlarda azaldığı rapor edilmiştir (Santiago ve ark., 2012)

D-limonenin STZ kaynaklı diyabetik sıçanlarda lipit peroksidasyonu ve antioksidan enzimler üzerindeki etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, kontrol ve diyabetik sıçan gruplarına 45 gün boyunca 100 mg/kg d-limonen ve 600 mcg/kg glibenklamid intragastrik tüp ile verilmiş olup, plazma ve dokulardan TBARS, lipit hidroksiperoksitler, CAT, GPx, GST, GSH, Vitamin C ve Vitamin E gibi oksidatif stres ve antioksidan parametreleri ölçülmüştür. D-limonen tedavisi almış diyabetik sıçanlarda, tedavi almamış diyabetik sıçanlara göre lipit peroksidasyon düzeyleri önemli derecede azaldığı, antioksidan enzim aktivitelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Biyokimyasal ölçüm sonuçlarına göre d-limonenin, STZ-kaynaklı diyabetik sıçanlarda antioksidan özellikler aracılığıyla histopatolojik koruma sağladığı belirtilmiştir (Murali ve ark., 2012).

Timokinon ve d-limonenin hipolipidemik ve antioksidan etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada 30 gün boyunca aterojenik diyet uygulanan sıçanlar gavaj yoluyla günde 2 kez 200 mg d-limonen ve 10 mg timokinon ile tedavi edilmiştir. Ölçülen parametreler sonucunda kardiyovasküler hastalık riskinin önlenmesinde bu bileşiklerin önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Shafeeque ve ark., 2013)

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).

Oksidatif stres kaynaklı katarakt gelişiminde d-limonenin koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, *in vitro* 125-1800 µM konsantrasyonlarda kullanılan d-limonenin H₂O₂ ile indüklenen ROS oluşumunu azalttığı ve böylece hücre sağ kalım oranını arttırdığı belirtilmiştir (Bai ve ark., 2016).

STZ kaynaklı tip 1 diyabet geliştirilen sıçanlarda d-limonenin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, kontrol ve diyabetik gruplara ayrılmış olan sıçanlara 50 mg/kg d-limonen oral yol ile uygulanmıştır. D-limonen'in DNA hasarı, Glutasyon redüktaz (GR) ve MDA seviyelerini önemli derecede azalttığı; GSH seviyesini, CAT, SOD ve GPx enzim aktivitesini anlamlı derece arttırdığı, diyabetik sıçanların lipid ve karaciğer enzim parametrelerini değiştirdiği gözlemlenmiştir (Bacanlı ve ark., 2017).

Spontan hipertansif sıçanlarda serebral iskemide d-limonenin etkilerini incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada, sıçanlara i.p. yolla 1 hafta boyunca 20 mg/kg d-limonen uygulanmıştır. İskemi sonrasında sıçanlarının beynindeki vasküler endotelial büyüme faktörü mRNA ekspresyonu, d-limonen ile önemli ölçüde artmıştır. d-limonen'in aynı zamanda, SOD ve CAT aktivitelerini arttırmış, MDA seviyesini düşürmüş, glutasyon içeriğini arttırmış olduğu gösterilmiştir. Serebral iskemik hasar sonrasında d-limonenin serebral inflamasyonu inhibe ettiği, vasküler yeniden modellenme ve antioksidan aktiviteleri ile iskemi hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu belirtilmiştir (Wang ve ark., 2017).

D-limonen'in oksidatif stres, inflamasyon ve gen ekspresyonunu etkileyerek gastroprotektif etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, gastrik ülser oluşumunu indüklemek için oral yolla etanol verilen sıçanlara, oral yolla (%8 tween 80), karbenoksolon (100 mg/kg) veya limonen (25, 50 veya 100 mg/kg) uygulanmıştır. SOD, GR, GPx ve GSH düzeyleri ölçülen sıçanlarda GPx düzeylerini kontrol grubuna

göre anlamlı derece arttırdığı gözlemlenmiştir. D-limonenin oksidatif stres ve inflamatuvar cevap gibi lokal mukozal savunma mekanizmaları düzenleyerek gastroprotektif etki gösterdiği belirtilmiştir (Souza ve ark., 2019).

D-limonenin, 10, 20 ve 40 mg/kg dozlarında i.v. olarak uygulanmış sıçanlarda, antiaritmik ve bradikardik etkileri incelenmiştir. Kardiyak parametreler ölçülmüş ve d-limonenin hipotansiyon ile ilişkili kalıcı bradikardi oluşturduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda d-limonenin aritmi oranını azalttığı belirtilmiştir. İzole edilmiş kalplere uygulanan 10^{-3} M dozundaki d-limonenin HR ve LVDP'de önemli düşüslere neden olduğu rapor edilmiştir (Nascimento ve ark., 2019).

2019'da yayımlanan başka bir çalışmada ise farelerde 24 saat arayla iki kez izoproterenol (150 mg/kg ip) uygulaması ile oluşturulan miyokard enfarktüs modelinde isopreterenol'den 30 dakika sonra verilen D-limonenin (10 μ M= 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).

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 olmadığı hem fonksiyonel hem de oksidatif stres parametreleri dikkate alınarak araştırılmıştır. Önceki deneysel çalışmalara göre İ/R hasarı üzerinde antioksidan özelliği gösterilmiş olan NAC, bu çalışmada pozitif kontrol grubu olacak şekilde kullanılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Gereçler

2.1.1. Malzemeler

- Blood Pressure Transducer (MAY, Commat Ltd., Ankara, TÜRKİYE)
- Isıtmalı su sirkülatörü (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 sistemi

2.1.2. Kimyasal maddeler

-d-limonen ((R)-(+)-Limonene)

-N-Asetil-L-sistein

-Krebs Çözeltisi için kullanılan kimyasal maddeler (NaCl, KCl, CaCl₂, MgSO₄, KH₂PO₄, NaHCO₃, 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)

2.1.3. 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)

2.1.4. 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.

2.2. Kullanılan Yöntemler

2.2.1. Deney Grupları

Çalışmamızda 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.

2.2.2. 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 CaCl₂, 1,25 MgSO₄, 1,2 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃ 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, -80°C'de oksidatif stres ve antioksidant enzim aktivitelerinin ölçümü için saklanmıştır.

2.2.3. Biyokimyasal Analizler

2.2.3.1. LDH Ölçümü

İzole kalplerde iskemi reperfüzyon hasarının bir göstergesi olarak LDH ölçümü yapılmıştır. Bu amaçla iskemi öncesi ve reperfüzyonun 40. dakikasında 1 dakika süre ile toplanan perfüzetatlar, likit nitrojen ile dondurulup -80 derecede ölçüm gününe kadar saklanmıştır. Perfüzattaki 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.

2.2.3.2. Oksidatif Stres Parametrelerinin Ölçümü

Total 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 absorbans altında kolorimetrik olarak ölçüm yapılmıştır. Sonuçlar TOS için $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L, TAS için mmol Trolox equivalent/L olarak verilmiştir. Ayrıca TOS/TAS oranı da oksidatif stres belirteci olarak gruplar arasında değerlendirilmiştir.

TBARS (MDA) ölçümü için kullanılan ticare kitte (Cayman TBARS Assay Kit, 10009055, Cayman Chemical Company, Michigan USA) belirtilen şekilde, RIPA tamponu ile homojenize edilmiş kalp dokuları, 1600 x g hızda 4°C 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 kitte (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 sükroz içeren) ile homojenize edildikten sonra 1500 x g 4°C 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 4°C 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 (µM) 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 4°C 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 4°C 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 4°C de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantlar ayrılmıştır. Ancak örnekler üzerinde gerekli protokol uygulanmış olmasına karşın reaksiyon oluşmamış ve ölçüm alınamamıştır.

2.3. İstatistiksel analiz

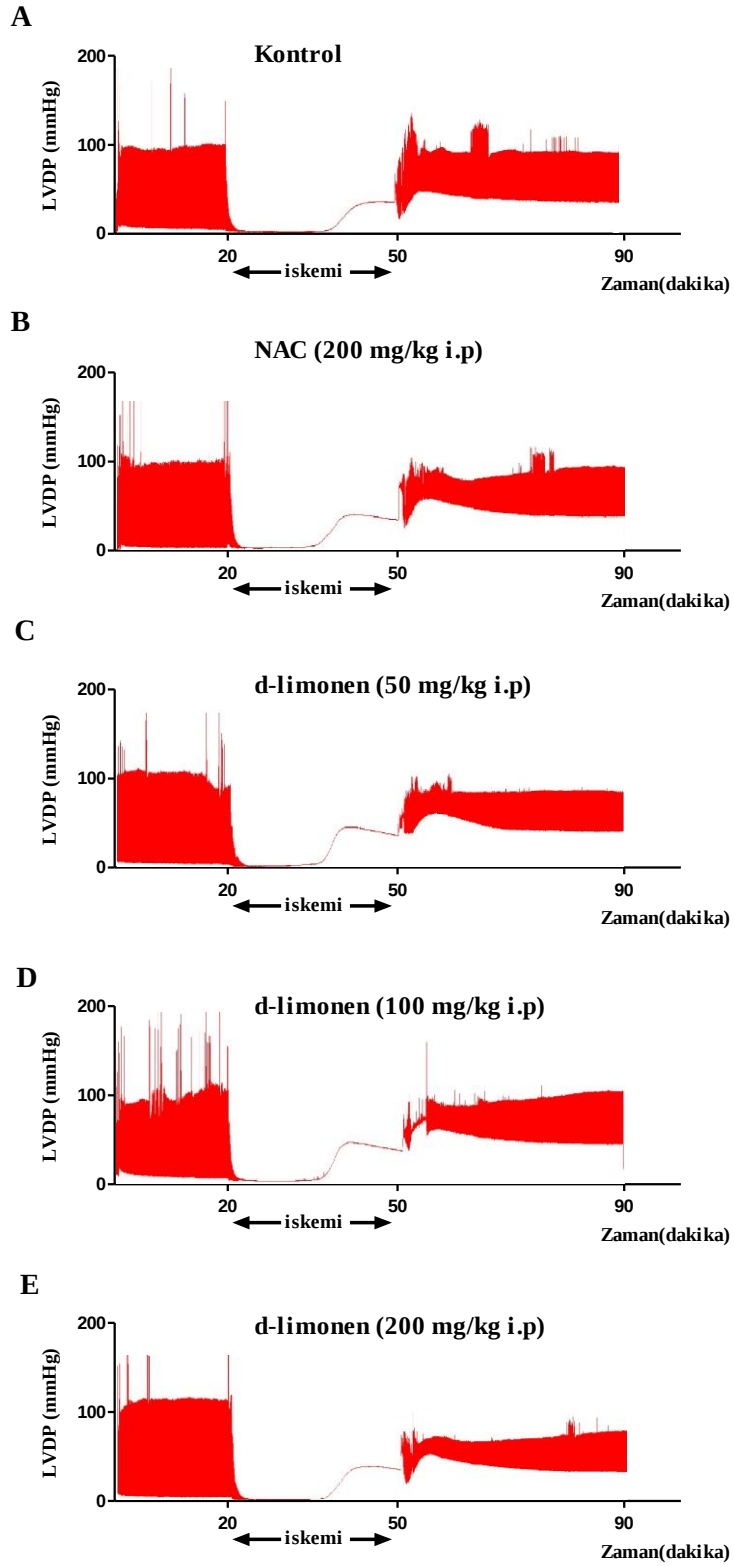
Çalışmada elde edilen tüm veriler, Ortalama±Standart Hata olarak gösterilmiştir. Grafikler ve istatistiksel analizler Graphpad Prism 5 programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki istatistiksel farklılık için; parametrik değerlerde tek yönlü ANOVA (One Way), parametrik olmayan değerler için ise Kruskal-Wallis uygulanmıştır. İstatistiksel farklılık $p<0,05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.



3. BULGULAR

3.1. İskemi Reperfüzyon Sonucu Kalp Fonksiyonundaki Değişiklikler

Bozulmuş kasılma fonksiyonu, kalpte İ/R hasarının en belirgin özelliğidir. Şekil 3.1A-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.

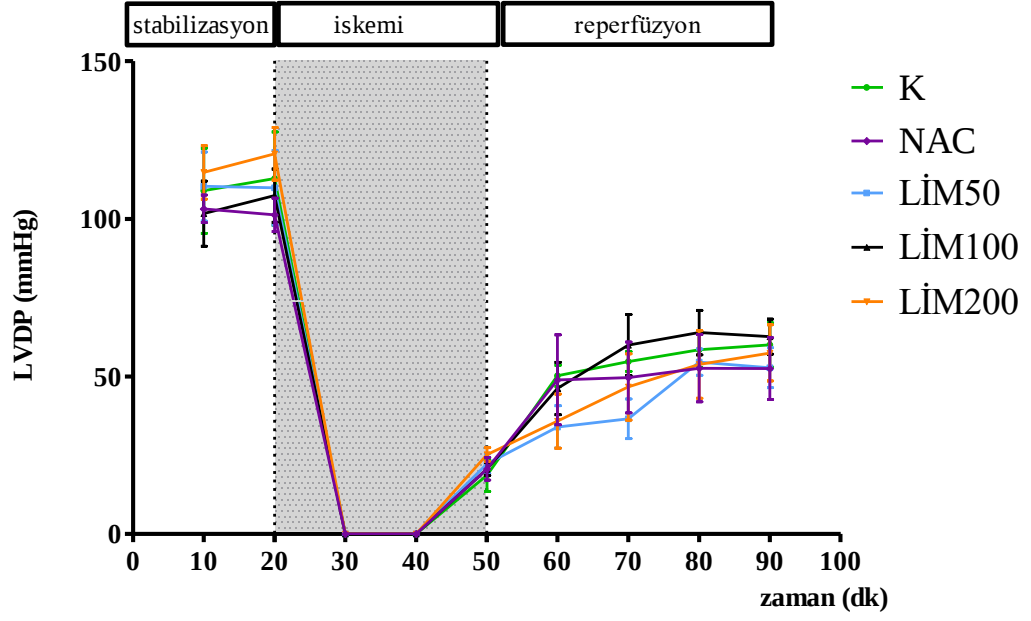


Şekil 3.1. LVDP'deki değişimleri gösteren orijinal kayıtlar. Kontrol grup (A), 200 mg/kg NAC tedavili grup (B), 50 mg/kg d-limonen tedavili grup (C), 100 mg/kg d-limonen tedavili grup (D), 200 mg/kg d-limonen tedavili grup (E).

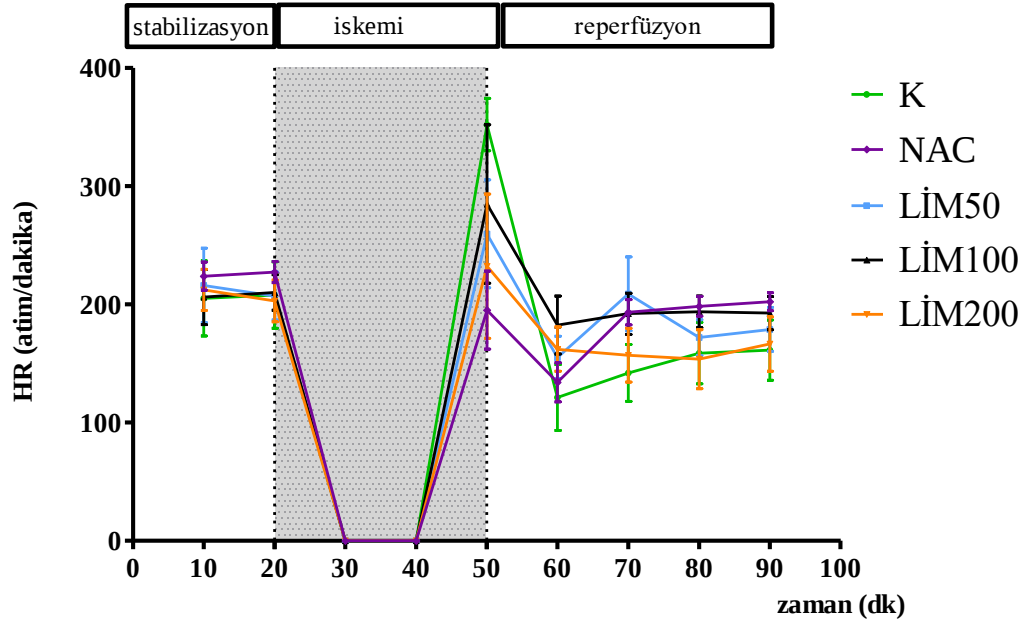
Çalışmamızda ilk olarak 7 gün süreyle farklı dozlarda uygulanan d-limonen tedavisinin İ/R sonucu kalbin kasılma fonksiyonunda oluşan azalmayı önleyip önlemediği incelenmiştir. Ancak kullanılan dozların hiçbirisiyle LVDP düzeyleri üzerinde anlamlı bir düzelme sağlanamamıştır. Benzer sonuçlar, izole kalpte 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 3.2.A-B ve Şekil 3.3.A-C).



A

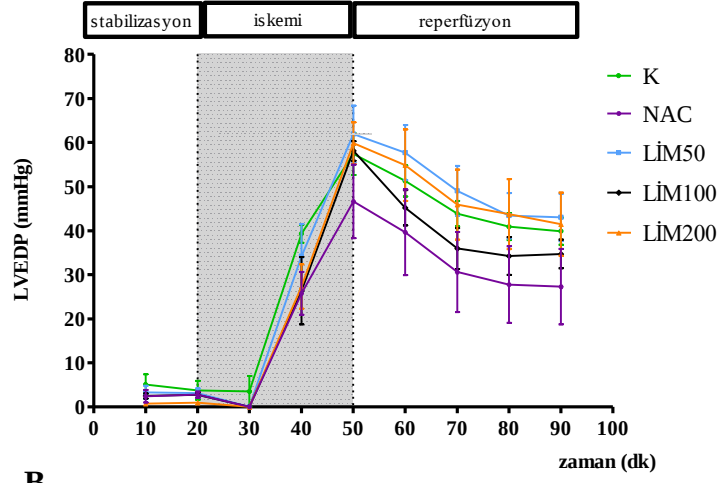


B

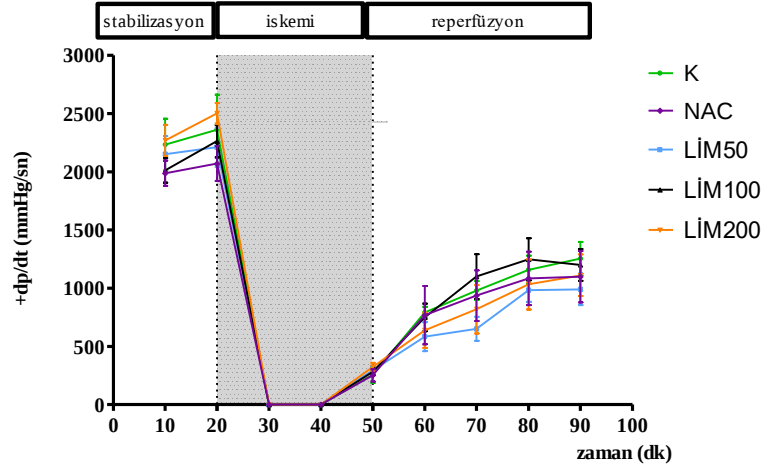


Şekil 3.2. İskemi-reperfüzyon periyodu süresince elde edilen verilerin grafiği. (A) LVDP, (B) HR

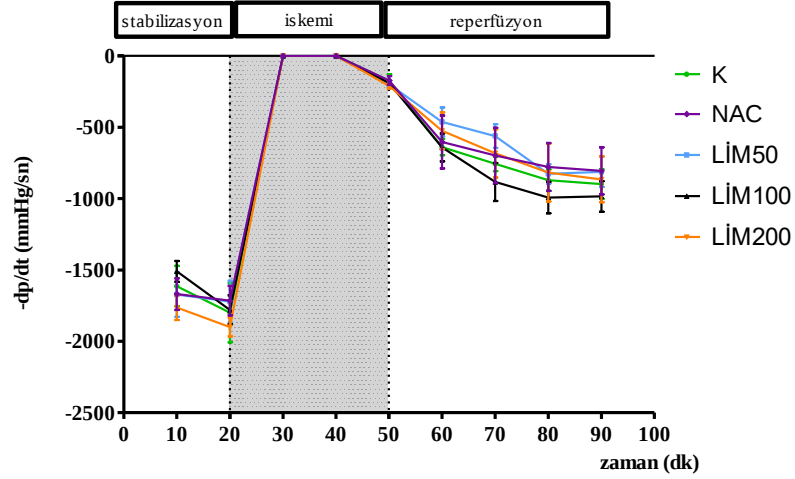
A



B

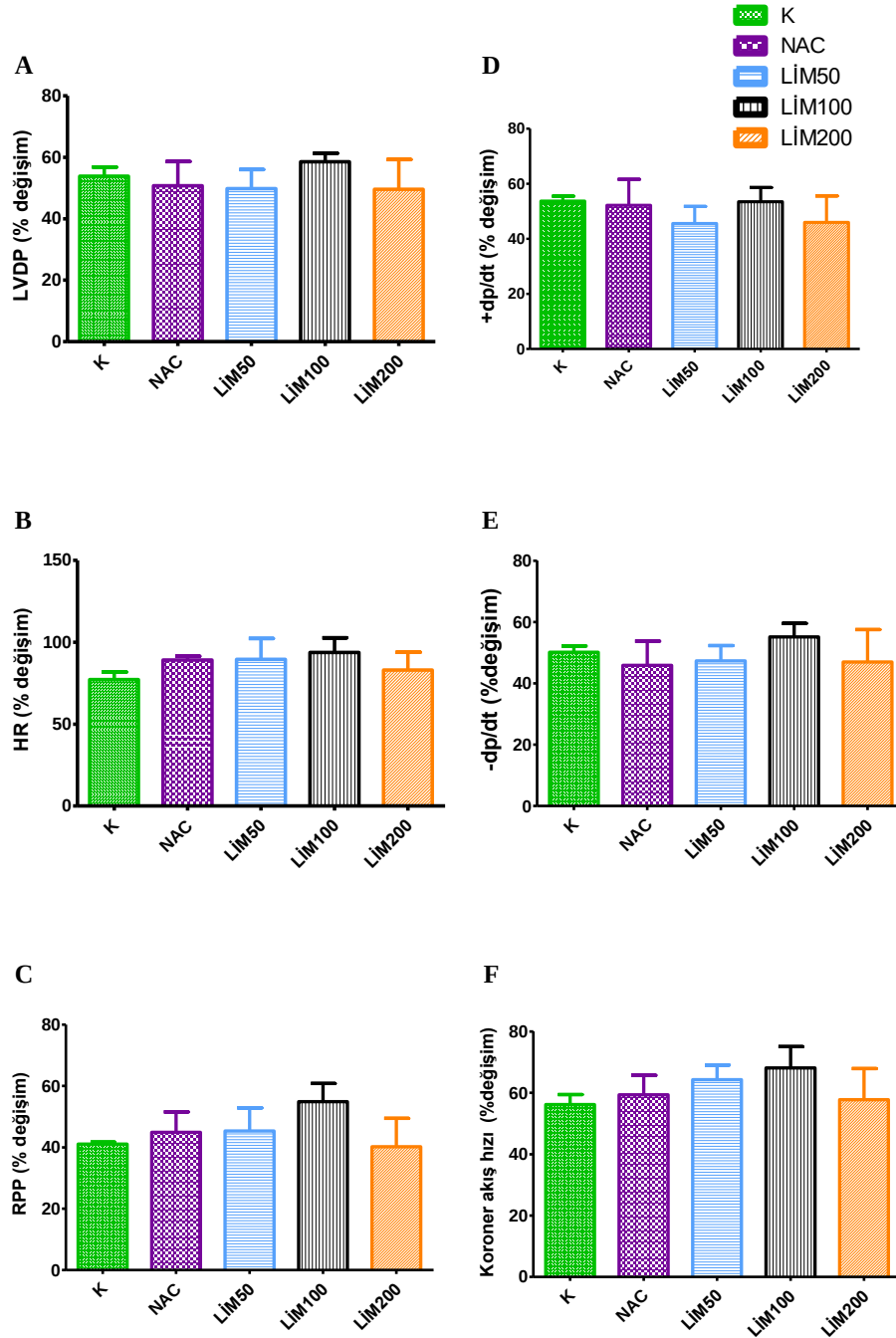


C



Şekil 3.3. İskemi-reperfüzyon periyodu süresince elde edilen verilerin grafiği. (A) LVEDP, (B) +dp/dt, (C) -dp/dt

Bu kayıtlardan elde edilen iskemi öncesi ve reperfüzyon sonu verilerin yüzde değişimlerinde de anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Şekil.3.4 A-F).



Şekil 3.4. 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).

3.2. İskemi Reperfüzyon Sonucu Kalp Dokuları Üzerindeki Biyokimyasal Değişiklikler

Çalışmamızda kalp hasarının bir göstergesi olarak iskemi öncesi ve reperfüzyon sonunda toplanan perfüzlarda 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 3.1).

Çizelge 3.1. 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)

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

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 3.2 ve Çizelge 3.3).

Çizelge 3.2. 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)

	K	NAC	LİM50	LİM100	LİM200
TAS (mmol Trolox equivalent/L)	0,52±0,1	0,41±0,06	0,49±0,03	0,39±0,06	0,47±0,03
TOS (μmol H ₂ O ₂ equivalent/L)	17,4±0,7	16,1±1,2	19,4±1,5	18,6±1,2	17,3±1,1
TOS/TAS	39,1±7,2	42,6±6,2	39,2±1,9	52,1±10,0	37,5±3,1

Çizelge 3.3. İzole kalp dokularında ölçülen diğer oksidatif stres parametreleri (Sonuçlar Ortalama±Standart Hata olarak verilmiştir, n=5-6)

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

4. TARTIŞMA

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 problemidir (Dhalla ve ark., 2000). Aterosikleroz, trombozis ya da koroner arter spazmı nedeniyle kalp dokusuna yeterli düzeyde oksijenli kanın sağlanamaması kalpte iskemiye 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^{+2} 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_2O_2 , 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 myokard 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 yanıtlarını 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-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 isopreterenol'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. Yukarda 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 (1,2 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-1,2 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).



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

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.

ÖZET

İzole Sıçan Kalbinde Oluşturulan İskemi-Reperfüzyon Hasarı Üzerinde d-Limonen'in Etkileri

Oksidatif 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.

SUMMARY

Effects of d-limonene on ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart

Oxidative 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.

KAYNAKLAR

- AHMAD 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, KEZDI 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, MIGUEL-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 carvedilol 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 Ca²⁺ transport during oxidative stress. *Mol Cell Biochem*, **99(2)**:125-33.
- DURÇO AO, DE SOUZA DS, HEIMFARTH L, MIGUEL-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 NFκB 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.
- TRIBBLE 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**: 699-706

- WANG 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)**:699-706
- WANG 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.
- WERNES 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)**:1215-20
- WOO 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)**: e0150557
- YANG 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 β /Smads and NF- κ B pathways. *J. Mol. Histol.* **44**:357–367.

EKLER

Ek 1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 12/06/2019
TOPLANTI NO : 2019-12
DOSYA NO : 2018-56
KARAR NO : 2019-12-118

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY'ın yaptığı; araştırmacı olarak Damla Gizem SABUR'un katıldığı "İzole Sıçan Kalbinde Oluşturulan İskemi/Reperfüzyon Hasarı Üzerine d-limonen'in Etkileri" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzun 11/04/2018 tarihli toplantısında alınan 2018-8-66 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Proje Yürütücüsü tarafından Kurulumuza verilen 31/05/2019 tarih ve 17261 sayılı dilekçe ile çalışmada deney aşamasında görülen aksaklıklar nedeniyle projede izin alınan 35 adet sıçana ilave olarak 20 adet sıçana daha ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir.

Söz konusu dilekçe, Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarih ve 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi" nin 11 (5) maddesi kapsamında değerlendirilmiş ve çalışmaya 20 sıçan ilave edilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sıçan
Hayvan Sayısı : 35 + 20 (İlave)
Geçerlilik Süresi : 01/09/2018-01/09/2019

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	Oylamaya katılmadı.
Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Nuri YIĞIT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	

Prof. Dr. Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof. Dr. Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	M. Kırkağaç
Doç. Dr. Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	M. Sağlam
Doç. Dr. Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	G. Göllü Bahadır
Dr. Öğr. Üyesi Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	A. Özgür
Dr. Vet. Hek. Gürbüz ERTÜRK (Üye)	Active Veteriner Sağlık Merkezi	Serbest	E	G. Ertürk
Uzm. Vet. Hek. Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	H. Devede
Uzm. Vet. Hek. Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	A. İşören
Fatma Aysun COŞKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	F. Aysun Coşkun

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı Damla Gizem

Soyadı SABUR

Doğum yeri ve tarihi ANTAKYA, 01/07/1991

Uyruğu T.C.

Medeni durumu Bekar

İletişim adresi ve telefon Mustafa Kemal Mah 2147.Sok No:3 06510 Çankaya/Ankara 0312 409 81 50

II- Eğitimi

2010/2016 Lisans, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

2005/2009 Aydınlikevler Anadolu Lisesi

1997/2004 Aydınlikevler İlköğretim Okulu

Yabancı dili: İngilizce

III- Mesleki Deneyimi:

Türk Eczacıları Birliği – Yazılım Geliştirme Uzman Yardımcısı (12/2016-Devam)