

## İskemi/Reperfüzyon Hasarında Hesperidinin Nöroprotektif Etkisi

Neuroprotective Effects of Hesperidin In Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury

Saadet Çeliközlü<sup>1</sup>, Filiz Özyiğit<sup>2</sup>, Said Altıkat<sup>3</sup>, Sibel Köktürk<sup>4</sup>, Halit Çeliközlü<sup>5</sup><sup>1</sup> Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Altıntaş Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Altıntaş, Kütahya, Türkiye<sup>2</sup> Bandırma On Yedi Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Bandırma, Balıkesir, Türkiye<sup>3</sup> Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı, Kütahya, Türkiye<sup>4</sup> İstanbul Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji Embriyoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye<sup>5</sup> Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Kütahya, Türkiye

Yazışma Adresi / Correspondence:

Saadet Çeliközlü

Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Altıntaş Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Altıntaş 43800 Kütahya, Türkiye

T: +90 533 816 02 86

E-mail: saadet.celikozlu@dpu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 30.09.2022

Kabul Tarihi / Accepted: 26.04.2023

Çevrimiçi / Online: 30.06.2023

Orcid ve Mail Adresleri

Saadet Çeliközlü <https://orcid.org/0000-0001-9825-6458>, saadet.celikozlu@dpu.edu.trFiliz Özyiğit <https://orcid.org/0000-0002-0062-4281>, fozyigit@bandirma.edu.trSaid Altıkat <https://orcid.org/0000-0002-5763-3787>, sayit.altikat@ksbu.edu.trSibel Köktürk <https://orcid.org/0000-0001-5636-3300>, sibelkokterk1@gmail.comHalit Çeliközlü <https://orcid.org/0000-0002-0456-7077>, halit.celikozlu@ksbu.edu.tr

Cite this article/Atf:

Çeliközlü S, Özyiğit F, Altıkat S, Köktürk S, Çeliközlü H. İskemi/Reperfüzyon Hasarında Hesperidinin Nöroprotektif Etkisi.

Sakarya Med J 2023 ;13(2):263-274 DOI: 10.31832/smj.1182213

## Öz

Amaç	Hesperidin güçlü antioksidan özelliklere sahip bir bitki flavonoididir. Bu özelliği ile hesperidinin, iskemik hasarın önlenmesinde etkili bir ajan olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmanın amacı, sıçanlarda serebral iskemii/reperfüzyon hasarına karşı hesperidinin farklı dozlarının koruyucu etkisini araştırmaktır.
Yöntem ve Gereçler	Çalışmada kontrol, sham, iskemii/reperfüzyon (I/R), hesperidin 50 (Hes 50) ve hesperidin 100 (Hes 100) olmak üzere 5 grup hazırlandı. Her grupta 8 adet olmak üzere toplam 40 adet erkek Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanıldı. İskemi oluşturmak için Pulsinelli ve Brierly'nin dört damar oklüzyon modeli kullanıldı. 30 dakika iskemii ve 30 dakika reperfüzyon uygulandı. Hesperidin, iskemiden 30 dakika önce intraperitoneal olarak enjekte edildi. Histopatolojik çalışma için beyin dokusuna hematoxilen eozin boyaması uygulandı. Ayrıca beyin dokusunda SOD, CAT, MDA ve total protein seviyeleri belirlendi. Moleküler belirteç olarak ise TNF-α mRNA ekspresyon seviyeleri RT-qPCR tekniği ile ölçüldü.
Bulgular	I/R grubunda kontrol grubuna göre CAT ve SOD değerlerinde azalma, MDA değerinde artış, toplam protein değerinde hafif artış saptandı. Hes 50 ve Hes 100 gruplarında, I/R grubu ile kıyaslandığında CAT, SOD değerleri arttı, MDA ve toplam protein değerleri önemli ölçüde azaldı. I/R grubunda kontrol grubuna kıyasla hipokampusun CA1 bölgesinde önemli bir nöron kaybı gözlemlendi. Hes 50 grubunda I/R grubuna göre hipokampustaki nöron hasarının azaldığı ve nöron sayısının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı bulundu. Beyin dokusundaki TNF-α mRNA ekspresyon değerleri, I/R grubunda kontrol ve sham gruplarına göre anlamlı derecede yüksekti. Hes 50 grubunda I/R grubuna kıyasla mRNA ekspresyon miktarında önemli bir azalma gözlemlendi (p<0,05).
Sonuç	Bu çalışmanın sonuçlarına göre, antioksidan potansiyeli olan hesperidin, serebral iskemii/reperfüzyonun neden olduğu oksidatif stres hasarına karşı nöroprotektif ve anti-inflamatuar etkiler göstermiştir. Düşük doz hesperidin (Hes 50) grubunda anti-inflamatuar ve nöroprotektif etkiler öne çıkarken, hem Hes 50 hem de Hes 100 gruplarında antioksidan etkinin daha baskın olduğu tespit edilmiştir.
Anahtar Kelimeler	Serebral iskemii; reperfüzyon; hesperidin; koruyucu etki.

## Abstract

Introduction	Hesperidin is a plant flavonoid with powerful antioxidant properties. With this feature, hesperidin was thought to be an effective agent in the prevention of ischemic damage. The aim of this study was to investigate the protective effect of different doses of hesperidin against cerebral ischemia/reperfusion injury.
Materials and Methods	In this study, 5 groups were prepared as control, sham, ischemia/reperfusion (I/R), hesperidin50 (Hes 50), and hesperidin100 (Hes 100). 40 male Sprague-Dawley rats, 8 in each group, were used. Four vessel occlusion model was used to induce ischemia. 30minutes of ischemia and 30minutes of reperfusion were applied. Hesperidin was injected intraperitoneally 30minutes before ischemia. Hematoxylin eosin staining were performed, SOD, CAT, MDA, and total protein levels were determined in brain tissue. As a molecular marker, TNF-α mRNA expression levels were measured by RT-qPCR technique.
Results	In the I/R group, CAT and SOD values decreased, the MDA value increased, a slight increase in the total protein value was found compared to the control group. CAT, SOD values increased, MDA and total protein values decreased significantly in Hes 50 and Hes 100 groups. A significant loss of neurons was observed in the CA1 region of the hippocampus in the I/R group compared to the control group. It was found that neuron damage in the hippocampus decreased and the number of neurons increased statistically significantly in the Hes 50 group compared to the I/R group. TNF-α mRNA expression values in brain tissue were significantly higher in the I/R group than control and sham groups. A significant decrease in the amount of mRNA expression was observed in the Hes50 group compared to the I/R group (p<0.05).
Conclusion	According to the results of this study, hesperidin, which has antioxidant potential, showed neuroprotective and anti-inflammatory effects against oxidative stress damage caused by cerebral ischemia/reperfusion. While anti-inflammatory and neuroprotective effects were prominent in the low-dose hesperidin (Hes 50) group, the antioxidant effect was more dominant in both Hes 50 and Hes 100 groups.
Keywords	: Cerebral ischemia; reperfusion; hesperidin; protective effect.



## GİRİŞ

İskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı, dokunun oksijen yoksunluğu ile başlayan, serbest oksijen radikallerinin üretimi ile devam eden ve inflamatuvar yanıtla genişleyen karmaşık bir patolojik süreçtir.<sup>1</sup> İskemik inme dünyada önemli bir ölüm nedenidir ve önemli sakatlıklara neden olur. İnmenin önemli bir kısmı serebral damarların trombozu veya embolik oklüzyonu sonucu oluşur.<sup>2</sup> İnme ve serebral İ/R hasarının patogenezinde süper oksit radikallerinin önemli rolü vardır. Bu nedenle serebral İ/R tedavisinde süper oksit radikallerini süpürücü antioksidan uygulamalar ile ilgili çalışmalara ilgi artmıştır.

Hesperidin (3,5,7-trihidroksi-4-metoksiflavanon) limon, greyturt, portakal, domates ve kirazda bol miktarda bulunan bir bitki biyoflavonoididir. Mükemmel radikal süpürücü aktiviteye, analjezik, anti-kanserojen, anti-hipertansif, anti-viral, anti-alerjik, radyoprotektif, anti-inflamatuvar, antioksidan etkiler gibi farmakolojik aktivitelere sahiptir.<sup>3-7</sup>

Bu çalışmada, histopatolojik çalışma için beyin dokularına hematoksilen eozin boyama uygulandı. Biyokimyasal inceleme için ise oksidatif hasarın önemli belirteçlerinden olan MDA (malondialdehit), SOD (süper oksit dismutaz), CAT (katalaz) seviyeleri ve toplam protein değerleri tespit edildi. MDA, lipid peroksidasyonunun en hassas göstergelerinden biridir.<sup>8</sup> Yağ asitleri, O<sub>2</sub> ve metal katalizörler (Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>+</sup>) bulunduğu sürece lipid peroksidasyonu yeni serbest radikallerin oluşumuna yol açar. Bu nedenle reperfüzyon periyodu lipid peroksidasyonu için oldukça uygundur.<sup>8</sup> Lipid peroksidasyonu nedeniyle membran geçirgenliğinde bozulma, membrana bağlı Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase enzim aktiviterinde azalmaya neden olur. Sonuç olarak protein sentezi, değişimi ve protein sentezi için hayati önem taşıyan K<sup>+</sup> ve Mg<sup>+</sup> konsantrasyonları engellenir. Artan lipid peroksidasyonu ayrıca proteolitik lizozomal enzimlerin ve mitokondriyal matris enzimlerinin sitoplazmaya salınmasına neden olabilir. Bu, hücre içi proteolize ve hücresel yıkıma yol açar. Bu koşullar altında, SOD ve katalaz gibi antioksidan enzimleri içeren antioksidan savunma sistemi,

nöronal hücrelerin reaktif oksijen türlerinin neden olduğu ölüme karşı direncinde çok önemli bir role sahiptir.<sup>9</sup>

Çalışmada ayrıca, iskemi ile miktarı artan inflamasyon faktörlerinden biri olan TNF- $\alpha$  (tümör nekroz faktör) geninin mRNA ekspresyon miktarı belirlendi. Yapılan çalışmalar, postiskemik yanıtta TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımının arttığını göstermektedir. İskemi-reperfüzyon sonucu TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 düzeylerindeki artış ile mortalite, akut solunum sıkıntısı sendromu ve çoklu organ yetmezliği riskinde artış arasında ilişki vardır.<sup>10</sup> İskemi-reperfüzyon sırasında artan hücre içi Ca<sup>2+</sup> tarafından yönlendirilen patolojik süreç, kalsiyum pirofosfat ve ürik asit oluşumudur. Bu süreç, iskemi-reperfüzyon hasarını şiddetlendiren TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  (interlökin-1 $\beta$ ) gibi inflamatuvar faktörleri aktive eden sinyaller gönderir. Bu sitokinler, diğer sitokinlerin ve kemokinlerin ekspresyonunu arttırarak derin iltihaplanma ile daha fazla hücre hasarını tetikleyecek bir sitokin fırtınasını ateşler.<sup>11</sup> Bu çalışmada, güçlü bir antioksidan etkiye sahip olan hesperidin deneysel olarak oluşturulan serebral iskemi/reperfüzyon hasarına karşı beyin dokusunda farmakolojik, histopatolojik ve biyokimyasal koruyucu etkileri araştırılmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEMLER

Bu çalışma Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Yetiştirme Araştırma ve Uygulama Merkezi laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Hayvan deneyleri için gerekli etik izinler Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulu'ndan alınmıştır (No: 2017.06.03).

### Kimyasal Malzemelerin Hazırlanması

Hesperidini çözmek için çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich, ABD) kullanıldı (Hesperidin, C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>O<sub>15</sub>, Moleküler ağırlık: 610,56, saflık  $\geq$  %95, CAS Numarası: 520-26-3, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas, ABD).

### Deney Grupları

Çalışmada 40 adet erkek Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Gruplar şu şekilde oluşturuldu;

- Kontrol grubu (n=8): Bu gruptaki sıçanlara herhangi bir uygulama yapılmadı.
- Sham grubu (n=8): Bu gruptaki sıçanlara cerrahi işlem uygulandı ancak iskemi/reperfüzyon hasarı oluşturulmadı. 1.5 ml/kg DMSO cerrahi işlemden 1 saat önce intraperitoneal olarak verildi.<sup>12</sup>
- İskemi/Reperfüzyon (İ/R) grubu (n=8): Bu gruptaki sıçanlara yarım saat iskemi ve yarım saat reperfüzyon uygulandı.
- Hesperidin 50 mg/kg + İ/R grubu (Hes 50) (n = 8): Bu gruptaki sıçanlara iskemiden bir saat önce 50 mg/kg hesperidin intraperitoneal olarak verildi. Ardından yarım saat iskemi ve yarım saat reperfüzyon uygulandı.
- Hesperidin 100 mg/kg + İ/R grubu (Hes 100) (n = 8): Bu gruptaki sıçanlara iskemiden bir saat önce 100 mg/kg hesperidin intraperitoneal olarak verildi. Ardından yarım saat iskemi ve yarım saat reperfüzyon uygulandı.

### Serebral İskemi/Reperfüzyon Oluşturma Metodu

Çalışmamızda iskemi oluşturmak için Pulsinelli ve Brierly'nin dört damar oklüzyon modeli kullanıldı.<sup>13</sup> Anestezi ve analjeziden sonra boyun dorsalinin orta hattında bir keski yapıldı ve bipolar elektrokoter ile her iki Arteria vertebralis C1 foramen alaris boyunca koterize edildi. Koter uygulamasından 24 saat sonra sıçanların boynuna, anestezi altında orta hat kesisi yapıldı. Mikrodiseksiyon ile karotid arterlere ulaşıldı ve her iki Arteria carotis communis vasco bulldog klemp ile 30 dakika kapalı tutuldu. Daha sonra klemp çıkarılarak 30 dakika reperfüzyon uygulandı.

Deney sonunda sıçanlar sakrifiye edildi ve geniş bir kraniektomi ile beyinleri çıkarıldı. Beyin dokuları üç bölüme ayrıldı. İlk parça histopatolojik inceleme için %10 formaldehit solüsyonuna konuldu. İkinci ve üçüncü parçalar biyokimyasal ve moleküler çalışmalar için -80°C'de saklandı.

### Histolojik İnceleme

% 10'luk formaldehit solüsyonuna konulan beyin dokuları, rutin doku fiksasyon işlemlerinden sonra parafine gömüldü ve mikrotom ile 5-10 µm'lik kesitler alındı. Dokulara hematoksilin eozin boyaması yapıldı. Kesitler mikroskop (Nikon, ECLIPSE Ci-E) altında incelendi, hipokampusun CA1 bölgesi fotoğraflandı ve ImageJ görüntü analiz programı ile analiz edildi.

### Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analiz için sıçanlardan uygun şekilde alınan beyin parçaları analize kadar -80°C'de saklandı. Analizlerden önce beyin dokuları, pH 7.4, 50 uM ve 0.25 M sakkaroz içeren soğutulmuş bir sodyum fosfat tamponu içinde 8000 rpm'de 5 dakika homojenize edildi. Homojenatlar, 10.000 rpm'de +4°C'de 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantta, SOD ve CAT enzim aktiviteleri, MDA seviyeleri ve toplam protein miktarı belirlendi.

### Katalaz (CAT) aktivite seviyesinin belirlenmesi

CAT aktivitesi, Aebi<sup>14</sup> metoduna göre ölçüldü. Analizin prensibi, CAT enzimi tarafından hidrojen peroksite ayrıştırılma (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) hız sabitinin belirlenmesi esasına dayanır. Bir birim (1U.) CAT, 37°C'de, 60 saniyede 1 µmol hidrojen peroksiti dönüştüren enzim aktivitesine eşittir. CAT aktivitesi, spektrofotometrik olarak, 240 nm'de bir dakika boyunca, numune ve kör absorbans değişimleri gözlemlenerek ölçüldü. Sonuçlar U/mg protein olarak hesaplandı.<sup>15</sup>

### Süperoksit dismutaz (SOD) aktivite seviyelerinin belirlenmesi

SOD aktivitesinin belirleme yöntemi, SOD'un 6-hidroksidopaminin (6-OHDA) otoksidasyonu üzerindeki inhibisyon etkisinin spektrofotometrik ölçümüne bağlıdır.<sup>16,17</sup> Bir ünite SOD aktivitesi, 37°C'de 1 dakikada 6-OHDA'nın otoksidasyonunu % 50 oranında azaltan enzim miktarı olarak kabul edilir. Spektrofotometrik ölçümler oksidasyonun 60. saniyesine kadar 490 nm'de yapıldı. Çünkü otoksidasyon hız eğrisi ilk dakikada sabittir. Sonuçlar protein miktarları tespit edilerek U/mg protein olarak hesaplandı.

### Malondialdehit (MDA) seviyesi tayini

Lipid peroksidasyon indeksi için; yaygın olarak benimsenen bir yöntem olan ve lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA seviye tayini, Draper ve Hadley'in<sup>18</sup> çifte ısıtma metodu yöntemiyle belirlendi. Yöntemin prensibi, tiyobarbitürik asidin (TBA), MDA ile reaksiyon sırasında oluşan pembe rengin 532 nm'de spektrofotometrik ölçümü esasına dayanır. MDA konsantrasyonları, MDA için 1,1,3,3-tetraetoksipropan kullanılarak MDA-TBA kompleksinin standart çözeltisi yardımıyla hesaplandı. Sonuçlar nmol/mg protein olarak verildi.

### Protein miktarı tayini

Doku homojenatlarının protein konsantrasyonu Lowry ve ark.'nın yöntemine göre sıgır serum albümini kullanılarak mg/ml olarak hesaplandı.<sup>19</sup>

### İstatistiksel Analizler

Elde edilen biyokimyasal analiz sonuçları IBM SPSS Statistics 20 (IBM, New York, USA) paket programı kullanılarak analiz edildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda ANOVA testi, grup içi karşılaştırmalarda Post-Hoc Tukey testi kullanıldı.  $p < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### Moleküler Analiz

Moleküler çalışma için  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan beyin parçalarından RNA izolasyonu öncesinde beyin dokuları homojenizatör ile homojenize edildi. Ardından santrifüj ile elde edilen süpernatanttan High Pure RNA Tissue Kit-Version 09 (Roche) kullanılarak mRNA izolasyonu yapıldı. Ardından Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit-Version 6.0 (Roche) ile cDNA elde edildi. Örnek cDNA'ları PCR grade su ile 1:10 oranında dilüe edildi. TNF- $\alpha$  geninin mRNA ekspresyon miktarı, FastStart Essential DNA Green Master (Roche) kullanılarak kit prosedürlerine uygun olarak RT-qPCR ile tespit edildi. Bunun için aşağıda dizilimi verilmiş özel üretim primerler kullanıldı. RT-qPCR sonucunda örnekler için CP değerleri ve melting eğrileri belirlendi. Elde edilen veriler LightCycler 480 Instrument

Software Version 1.5.1 kullanılarak analiz edildi.

Sıçan TNF- $\alpha$  (Forward):

5' TGAACCTTCGGGGTGATCG 3'

Sıçan TNF- $\alpha$  (Reverse):

5' GGGCTTGTCACCTCGAGTTTT 3'

### Housekeeping Gen

Normalizasyon için housekeeping gen olarak  $\beta$ -Aktin geni kullanıldı. Kullanılan  $\beta$ -Aktin geninin özel üretim primer dizilimleri aşağıda verilmiştir.

$\beta$ -Aktin (Forward): 5' CCCGCGAGTACAACCTTCT 3'

$\beta$ -Aktin (Reverse): 5' CGTCATCCATGGCGAACT 3'

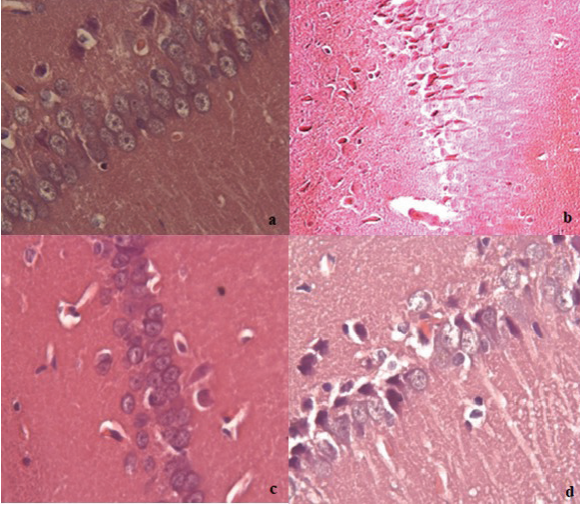
## BULGULAR

### Histolojik Bulgular

Kontrol ve sham gruplarında, hipokampusun CA1 bölgesinde nöronların çoğunda, perikaryonun merkezinde homojen boyanmış bir sitoplazma ile çevrili yuvarlak veya oval şekilli belirgin nukleollusa sahip bir nukleus vardı (Şekil 1.a). Sham ve kontrol grubunda hipokampal nöronlar belirli bir düzende sıralanmıştı.

İ/R grubundaki sıçan hipokampusunun CA1 nöronları, dejenerasyonla tutarlı morfolojik değişiklikler gösterdi. İ/R grubunda nöronların çoğu dejenerasyonun bir göstergesi olan sitoplazmalarının ve nukleusunun yoğunlaşması nedeniyle koyu bir boyanma gösterdiler. İ/R grubunda belirgin bir CA1 nöron kaybı gözlemlendi. İ/R grubunda nöronlar, artan hücreler arası mesafe dolayısıyla aralıklı ve gelişigüzel dağılmış bir şekilde düzensiz bir sıralanma gösterdiler (Şekil 1.b).

Hes 50 grubunda İ/R grubuna kıyasla, hipokampustaki nöron hasarı azalmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde nöron sayısı artmıştı ( $p=0,0018$ ) (Şekil 1.c). Hes 100 grubunda ise nöronal hasar ve nöron sayısı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $p=0,961$ ) (Şekil 1.d).



Şekil 1. a. Kontrol grubunda hipokampusun CA1 bölgesinde nöronların boyanmaları homojen, çekirdekleri büyük ve yuvarlak ve nükleolusları belirgindi. b. İ/R grubunda hipokampusdaki CA1 bölgesinde çok sayıda piknotik nükleuslu koyu ve küçülmüş nöron gözlemlendi. İ/R grubunda nöron kaybı dolayısıyla nöronlar arası mesafe geniş ve düzensiz bir dağılım gözlemlendi. c. Hes 50 mg/kg grubunda hipokampusun CA1 bölgesinde az sayıda hasarlı nöron gözlemlendi. d. Hes 100 mg/kg grubunda hipokampusun CA1 bölgesinde çok sayıda hiperkromatik nöron ve nöron kaybı gözlemlendi, H&E, 40X.

### Biyokimyasal Bulgular

Biyokimyasal analiz sonuçları Tablo 1'de verilmiştir.

### CAT enzim aktivite seviyesi

CAT enzim aktivite düzeyi kontrol grubunda  $0,98 \pm 0,32$ , sham grubunda  $0,81 \pm 0,27$ , reperfüzyon sonrası İ/R grubunda  $0,93 \pm 0,64$ , Hes 50 ve Hes 100 gruplarında ise sırasıyla  $0,97 \pm 0,88$  ve  $1,13 \pm 0,24$  U/mg protein olarak bulunmuştur.

CAT değerleri açısından kontrol ve sham grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. ( $p=0,165$ ). İ/R grubunda CAT enzim aktivite düzeyindeki azalma kontrol grubuna göre hafif bir düşüş göstermesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p = 0,989$ ). Hes 50 grubundaki CAT enzim aktivite düzeyindeki artış İ/R grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken ( $p=0,965$ ), Hes 100 grubunda istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p=0,029$ ). Hes 50 ve Hes 100 gruplarının CAT değerleri, kontrol ve İ/R grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmıştır (sırasıyla  $p=0,086$ ,  $p=0,000$ ). Hes 50 ve Hes 100 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ( $p=0,125$ ) (Şekil 2).

### SOD enzim aktivite seviyesi

SOD enzim aktivite düzeyi kontrol grubunda  $5,53 \pm 0,72$ , sham grubunda  $5,43 \pm 0,25$ , reperfüzyon sonrası İ/R grubunda  $4,44 \pm 1,08$ , Hes 50 grubunda  $6,33 \pm 0,95$  ve Hes 100

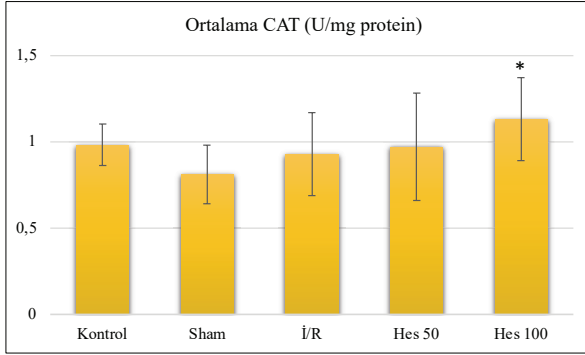
Tablo 1. Grupların biyokimyasal analiz sonuçlarının karşılaştırılması.

	Kontrol (n=8)	Sham (n=8)	İ/R (n=8)	Hes 50 (n=8)	Hes 100 (n=8)
CAT (U/mg. protein)	$0.98 \pm 0.12^a$	$0.81 \pm 0.17^a$	$0.93 \pm 0.24^a$	$0.97 \pm 0.31^b$	$1.13 \pm 0.24^b$
SOD (U/mg. protein)	$5.53 \pm 0.72^a$	$5.43 \pm 0.85^a$	$4.44 \pm 1.08^b$	$6.33 \pm 0.95^c$	$6.87 \pm 0.55^c$
MDA (nmol/mg. protein)	$9.34 \pm 0.65^a$	$10.31 \pm 0.61^a$	$17.32 \pm 1.13^b$	$12.55 \pm 0.82^c$	$11.43 \pm 0.70^d$
T. Protein (mg/ml)	$88.50 \pm 0.24^a$	$91.30 \pm 0.81^a$	$90.80 \pm 0.72^a$	$90.30 \pm 0.60^a$	$83.70 \pm 0.19^a$

Sonuçlar ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir.

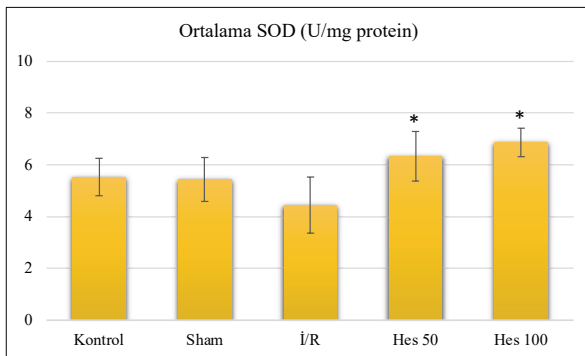
\* : Bir parametreye ait değerler birbirleri ile istatistiksel anlamlılık bakımından karşılaştırılmış ve anlamlılık düzeyi harf ile gösterilmiştir. Yatay düzlemde aynı harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur, ( $p > 0.05$ ), farklı harflerle gösterilen değerler ise birbirinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklıdır ( $p < 0.05$ ).

grubunda  $6,87 \pm 0,55$  U/mg protein olarak bulunmuştur.



Şekil 2. Grupların ortalama CAT (katalaz) seviyeleri (\* İ/R grubuna kıyasla  $p < 0.05$ ).

Kontrol ve sham grupları arasında SOD değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. İ/R grubundaki SOD enzim aktivite düzeyindeki düşüş, kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p=0.006$ ), ( $p=0.0014$ ). İ/R grubu ile karşılaştırıldığında Hes 50 ve Hes 100 gruplarının SOD enzim aktivite düzeyi anlamlı olarak yükselmiş ve kontrole yakın bir değere ulaşmıştır ( $p=0.000$ ), ( $p=0.000$ ). Hes50 ve Hes100 grupları arasında SOD değerleri açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0,380$ ), Sham grubu ile Hes 50, Hes 100 grupları arasında anlamlı istatistiksel fark bulundu ( $p=0.0031$ ), ( $p=0.0000$ ). (Şekil 3)

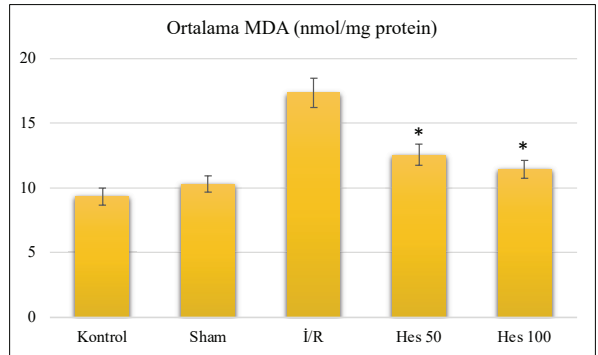


Şekil 3. Grupların ortalama SOD (süperoksit dismutaz) seviyeleri (\* İ/R grubuna kıyasla  $p < 0.05$ ).

### MDA seviyeleri

MDA seviyesi kontrol grubunda  $9.34 \pm 0.2$  nmol/mg ve sham grubunda  $10.31 \pm 0.6$  nmol/mg iken, reperfüzyon sonrası İ/R grubunda  $17.32 \pm 0.1$  nmol/mg'a yükselmiştir. Hes 50 ve Hes 100 gruplarında ise sırasıyla  $12.55 \pm 0.8$  ve  $11.43 \pm 0.7$  nmol/mg'a düşmüştür.

Grupların MDA değerleri incelendiğinde, İ/R grubundaki MDA düzeyi artışı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p = 0,000$ ). MDA seviyeleri, Hes 50 ve Hes 100 gruplarında İ/R grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır (sırasıyla  $p = 0,000$ ,  $p = 0,000$ ). Hem Hes 50 hem de Hes 100 gruplarının MDA değerlerindeki düşüş kontrole yakın gerçekleşmiştir. Hes 50 ve Hes 100 grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir. ( $p = 0,007$ ) (Şekil 4).



Şekil 4. Grupların ortalama MDA (malondialdehit) seviyeleri (\* İ/R grubuna kıyasla  $p < 0.05$ ).

### Toplam protein seviyesi

Toplam protein seviyesi kontrol grubunda  $88,50 \pm 0,2$ , sham grubunda  $91.30 \pm 0.8$ , reperfüzyon sonrası İ/R grubunda  $90.80 \pm 0.7$ , Hes 50 grubunda  $90.30 \pm 0.6$  ve Hes 100 grubunda ise  $83,70 \pm 0,1$  mg/ml olarak bulunmuştur.

Kontrol grubuna göre İ/R grubunun toplam protein düzeyindeki artış, istatistiksel olarak anlamlı değildir. ( $p = 0.954$ ). Hes 50 ve Hes 100 gruplarının toplam protein seviyesi İ/R grubu ile karşılaştırıldığında bir miktar düşmüştür fakat bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır

( $p = 1.000$ ), ( $p = 0.225$ ). Toplam protein değerleri açısından Hes 50 ve Hes 100 grupları arasında da anlamlı bir fark yoktur. ( $p = 0.290$ ).

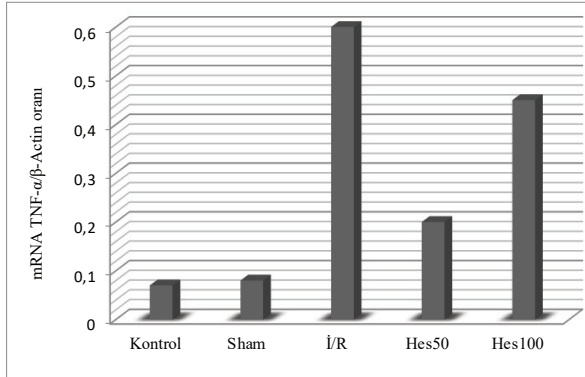
### Moleküler analiz sonuçları

Beyin dokularından RNA izole edildikten sonra TNF- $\alpha$  mRNA ekspresyon değerleri, RT-qPCR tekniği ile belirlendi. Sonuçlara göre, beyin dokusunda mRNA ekspresyon değerleri açısından kontrol grubu ile sham grubu arasında fark gözlenmemiştir.

TNF- $\alpha$  mRNA ekspresyonunun, kontrol ve sham gruplarına kıyasla İ/R grubunda önemli ölçüde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

İskemi/reperfüzyon öncesi koruyucu olarak 50 mg/kg hesperidin uygulanan Hes 50 grubunda mRNA ekspresyon miktarında İ/R grubuna göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Hes 100 grubunda ise İ/R grubuna göre TNF- $\alpha$  mRNA ekspresyon miktarında hafif bir azalma saptanmıştır. Fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Grupların TNF- $\alpha$  mRNA ekspresyon seviyeleri Şekil 5'te verilmiştir.



Şekil 5. Grupların TNF- $\alpha$  mRNA ekspresyon seviyeleri

### TARTIŞMA

Beyin oksidatif stres hasarına karşı çok hassastır. Çünkü beynin oksidatif metabolik aktivite hızı yüksek, antioksidan kapasitesi nispeten düşüktür ve nöronal onarım yetersizdir. Bu sebeple iskemi durumlarında oksidatif stresin sebep olduğu hasarı en aza indirgeyecek koruyucu antioksidan uygulamalar önem arz etmektedir.<sup>20</sup> Hesperidin, lipofilik yapıya sahip metoksillenmiş bir narenciye flavonoididir. Diğer flavonoidlerden daha yüksek bir antioksidan etkiye sahiptir. Hücrel antioksidan inhibitör enzimleri aktive etme yeteneğini koruyan 3 hidroksil grubuna sahiptir.<sup>4</sup> Bu nedenle hesperidin, iskeminin erken evresinde inflamatuvar yanıtı önlemesi ve antioksidan savunma sistemini aktive etmesi, iskemik hasarı azaltması açısından önemlidir. Hesperidinin sıçan serebral iskemi modelinde beyin yaralanmalarını hafiflettiği görülmüştür.<sup>21</sup> Biz çalışmamızda birçok polifenol bileşikte olduğu gibi potansiyel bir antioksidan etkiye sahip olan hesperidinin serebral iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerini araştırdık.<sup>22</sup>

Önceki çalışmalarda, deneysel iskemi/reperfüzyon yaralanma modelinin oluşturulma süreleri organlara göre değişiklik göstermiş, hatta bazı çalışmalarda aynı organ üzerinde farklı süreler bile uygulanmıştır. İskemi süresinin 10 dakika, 30 dakika, reperfüzyon süresinin ise 15 dakika, 20 dakika ve 24 saat olduğu yayınlar bulunmaktadır.<sup>9,23</sup> Bu çalışmada 30 dakika iskemi/30 dakika reperfüzyon süresi ile iskemi/reperfüzyon hasarı oluşturulmuştur.

Antioksidanların kan-beyin bariyerini geçme yeteneği, potansiyel bir nöroprotektif ajan olarak kabul edilmeleri için temel bir ön koşuldur. Önceki çalışmalara göre, hesperidinin de kan beyin bariyerini geçebildiği tespit edilmiştir. Hesperidinin nöroprotektif etkisi, hücrel antioksidan savunma mekanizmalarını kolaylaştırması ve kan-beyin bariyerini geçebilen güçlü radikal süpürücü özelliklere sahip olması ile açıklanabilir.<sup>22,24,25</sup>

Farklı organlarda İ/R yaralanma modellerinde hesperidi-

nin antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri gösterilmiştir. Miyokardiyal, intestinal, testis İ/R yaralanmalarına karşı hesperidinin koruyucu etkilerine dair çalışmalar bulunmaktadır.<sup>5,26,27</sup>

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, hesperidinin, serebral İ/R hasarına bağlı oksidatif stres ve inflamasyonu azaltmada etkili olduğu bulunmuştur. Fakat doza bağlı olarak farklı etkiler görülmüştür. Chen ve arkadaşları<sup>28</sup> hesperidinin etkilerinin doza bağımlı olduğuna ve hücre tipine göre değişebileceğine dikkat çekmiştir. Çalışmamızda 50 mg/kg dozunda hesperidin ile hipokampus hücrelerinde nöroprotektif etki gözlenirken, 100 mg/kg dozunda gözlenmedi. Bu durumu hesperidinin doza bağımlı etkisi ile açıklayabiliriz.

Daha önceki çalışmalarda İ/R hasarına karşı 50 mg/kg, 100 mg/kg hesperidin dozları kullanılmıştır.<sup>29-32</sup> Gaur ve arkadaşları<sup>33</sup> serebral İ/R yaralanma modelinde 50 ve 100 mg/kg dozlarda hesperidin kullanmış ve oksidatif strese karşı antioksidan özellikler tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Kumar ve Kumar<sup>34</sup>'in yaptığı çalışmada da hesperidinin 50 mg/kg dozunun nöroprotektif etkisi olduğu bildirilmiştir. Çalışma sonuçlarımız bu çalışmaların sonuçları ile tutarlılık göstermektedir.

Kumar ve arkadaşları,<sup>35</sup> hiperhomosisteinemi nörotoksisite üzerine yaptıkları çalışmalarında, üç farklı dozda hesperidin kullanılmışlardır. Hesperidin'in 25 mg/kg dozunda koruyucu etkisi bulunmazken, 50 ve 100 mg/kg dozlarında koruyucu etkisi olduğu gözlenmiştir. 50 ve 100 mg/kg dozlarında hesperidinin serebral korteks ve hipokampus bölgesinde nörodejenerasyonu azaltıcı etkileri olduğu belirtilmiştir.<sup>35</sup>

Tsai ve arkadaşları<sup>36</sup> insan kondrosit hücrelerinde hesperidinin doza bağlı antioksidan ve anti-inflamatuvar etkilerini araştırmıştır. Çalışmada hesperidinin antioksidan aktivitesinin doza bağımlı olduğunu belirtmişler ve özellikle yüksek doz hesperidin verilen grupta oksidatif stresin

arttığını ve sitotoksitenin geliştiğini bulmuşlardır. Düşük doz hesperidin kullandıklarında ise bu etkilerin tam tersini görmüşlerdir.<sup>36</sup>

CAT ve SOD beyindeki endojen antioksidan savunma enzimleridir, bu da beyin İ/R hasarına karşı antioksidan potansiyeli olduğunu gösterir. SOD enziminin ana işlevi, hücreleri oksidatif hasara karşı korumaktır. Benzer şekilde, CAT enzimi ise hücreleri peroksitlerin zararlı etkilerinden ve çeşitli reaktif oksijen türleri reaksiyonlarından korur. İskemik organ dokusunda antioksidan enzim aktiviteleri önemli ölçüde azalır, bu da dokuyu oksidatif strese daha duyarlı hale getirir.<sup>22</sup> MDA ise, oksidatif stresin önemli göstergelerinden olan lipid peroksidasyonun belirtecidir.

Önceki çalışmalar, hesperidinin antioksidan ve radikal süpürücü etkileri olduğunu göstermektedir. Kumar ve Kumar,<sup>34</sup> hesperidinin MDA düzeylerinde azalmaya, SOD ve CAT düzeylerinde artışa neden olduğunu ve oksidatif stresi azaltan antioksidan bir yapıya sahip olduğunu bildirmişlerdir. Yine başka bir çalışmada, hesperidinin sisplatin hasarına bağlı negatif SOD, CAT enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyon seviyeleri üzerinde iyileştirici etkisi olduğu belirlenmiştir.<sup>37</sup>

Çalışma modelimizde, serebral İ/R, lipid peroksidasyonundaki artış ve antioksidan savunma sisteminin bileşenlerinde bir azalma yoluyla oksidatif stresi önemli ölçüde indüklemiştir. Bu çalışmanın verilerine göre İ/R uygulaması ile beyin dokusunda özellikle SOD seviyesi önemli ölçüde azalırken, MDA seviyesi anlamlı olarak artmıştır. Koruyucu olarak hesperidin uygulanan grupta bu değerlerde anlamlı bir düzelmeye tespit edilmiştir. Bu veriler, hesperidinin hem serbest radikallerin salınımını hem de hücre zarlarının oksidatif hasarını engelleyebileceği sonucuna varan önceki çalışmalarla oldukça tutarlıdır.<sup>5,22,38</sup>

TNF- $\alpha$ , sistemik inflamasyonda rol oynar ve apoptotik hücre ölümüne neden olan bir faktördür.<sup>39</sup> Yapılan çalışmalarda, serebral İ/R hasarından sonra TNF- $\alpha$  mRNA eks-



presyonunda bir artış bildirilmiştir.<sup>22,40</sup> Meng ve arkadaşları<sup>41</sup> miyokardiyal İ/R yaralanma modelinde, hesperidinin antiinflamatuvar aktivitesini ve artmış TNF- $\alpha$  seviyesini azaltıcı etkisini göstermişlerdir. Benzer şekilde Rizza ve arkadaşları<sup>42</sup> da hesperidinin TNF- $\alpha$  seviyelerindeki azaltıcı rolüne ve antiinflamatuvar özelliklerine dikkat çekmişlerdir. Heo ve arkadaşları<sup>43</sup> hesperidinin omurilik dokusundan proinflamatuvar sitokin üretimini baskılayarak TNF- $\alpha$  düzeylerini azalttığını göstermişlerdir. Nasab ve arkadaşları<sup>44</sup> farelerde travmatik beyin hasarında sekonder olarak gelişen depresyon modelinde hesperidinin nöroprotektif etkisini araştırmış ve hesperidinin inflamatuvar stokinleri (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) azalttığını belirtmişlerdir. Bu çalışmalar, hesperidinin serebral iskemi/reperfüzyon hasarının iyileştirilmesi üzerindeki etkilerinin, antioksidan özelliklerine ek olarak TNF- $\alpha$  proinflamatuvar stokinlerini de inhibe ederek ortaya çıktığını göstermektedir.

Bu çalışmada, beyin dokusunda TNF- $\alpha$  geninin mRNA ekspresyonu, kontrole göre İ/R grubunda önemli ölçüde artmıştır. mRNA ekspresyonunun, özellikle Hes 50 grubunda kontrole yakın bir değere düştüğü tespit edilmiştir. Serebral İ/R, beyin dokusunda histopatolojik hasar ve apoptoz insidansını artırır. Global beyin İ/R yaralanma modellerinde, hipokampusun piramidal hücreleri iskemiye en duyarlı hücreler olduğundan, bu bölgelerdeki hücre kaybı hasar miktarını değerlendirmede bir kriter olarak kabul edilir.<sup>45</sup>

Yapılan çalışmalara göre İ/R hasarı Caspas 3 işaretli apoptotik hücre sayısında artışa neden olmaktadır.<sup>21,46</sup> Meng ve arkadaşları,<sup>41</sup> miyokardiyal İ/R çalışmasında hesperidinin Caspas 3 aktivitesinde önemli bir azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Öztanır ve arkadaşları,<sup>21</sup> Gaur ve Kumar,<sup>29</sup> Wang ve Chui,<sup>47</sup> çalışmalarında hesperidinin nöronal apoptozu önlemede etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışma bulgularına göre, İ/R grubundaki sıçan hipokampusunun CA1 nöronları dejenerasyonla uyumlu morfolojik değişiklikler göstermiştir. İ/R grubundaki

nöronların çoğu, sitoplazmalarının ve çekirdeklerinin yoğunlaşması nedeniyle dejenerasyonun bir göstergesi olan koyu boyanma görülmüştür. İ/R grubunda önemli miktarda CA1 nöron kaybı gözlenmiştir. Hücreler arasındaki mesafe arttığı için nöronlar aralıklı ve rastgele dağılmış ve düzensiz bir şekilde sıralanmışlardır.

Serebral İ/R modelimizde (dört damar oklüzyon modeli), İ/R hasarı, nöronların apoptotik durumunun göstergesi olan Caspas 3 boyanmış hücre sayısında bir artışa neden olmuştur. Koruyucu olarak hesperidin uygulaması, İ/R hasarı nedeniyle artan Caspas 3 etiketli hücrelerde önemli bir azalma sağlamıştır. Hes 50 ve Hes 100 gruplarının hipokampus bölümlerinde hücrelerin yapılarının daha iyi korunduğunu söyleyebiliriz. Bu veriler dikkate alındığında sonuçlarımız literatürle benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmada sadece bir ilaç grubunun olması ve kullanılan ilacın etki mekanizmasının net olmaması gibi kısıtlılıklar bulunmaktadır. Çalışmada tek bir ilacın (hesperidin) iki farklı dozunun etkileri karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, etkinliği kanıtlanmış başka bir ilaçla karşılaştırılarak desteklenebilir. Ayrıca çalışmada hesperidinin iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisi belirlenmiş ancak etki mekanizması çalışılmamıştır. Elde edilen sonuçlar immünohistokimyasal verilerle güçlendirilebilir. Bu konu ile ilgili yapılacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

## SONUÇ

Sonuç olarak, bu çalışmanın verilerine göre, güçlü bir antioksidan olan hesperidin, iskemi/reperfüzyon nedeniyle oluşan serbest radikalleri nötralize eder, beyindeki nöron kaybını önler ve beynin daha fazla hasar görmesini engeller.

İnsanlarda iskemi-reperfüzyon hasarı oluşmadan önce hesperidin profilaktik olarak kullanılarak mevcut risklerden kaçınılabilir. Bunun için hesperidin içeren besinlerle beslenme alışkanlıkları düzenlenebilir. Bir egzersiz programıyla da desteklendiğinde trombolitik riskleri azaltmak

mümkün olabilir.

#### **Teşekkür**

Bu çalışma Kütahya Dumlupınar Üniversitesi BAP birimi tarafından desteklenmiştir (No: 2018-07).

#### **Yazar Katkısı**

Fikir – SÇ, FÖ; Veri toplanması ve/veya işlenmesi – SÇ, SA, FÖ, HÇ; Analiz ve/veya yorum - SÇ, SA, SK; Yazıyı yazan – SÇ, FÖ.

#### **Çıkar İlişkisi**

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

#### **Etik Kurul Onayı**

Hayvan deneyleri için gerekli etik izinler Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan alınmıştır (No: 2017.06.03).

## References

- Süleyman H, Özçiçek A. Molecular Mechanism of Ischemia Reperfusion Injury. *Arch Basic Clin Res* 2020; 2(1):25-7.
- Feigin VL, Mensah GA, Norrving B, Murray CJ, Roth GA. Group, G. B. D. S. P. E. Atlas of the Global Burden of Stroke (1990–2013): The GBD 2013 Study. *Neuroepidemiology* 2015; 45(3):230–236.
- Noshy PA, Azouz RA. Neuroprotective effect of hesperidin against emamectin benzoate-induced neurobehavioral toxicity in rats. *Neurotoxicology and Teratology* 2021; 86:106981. doi:10.1016/j.ntt.2021.106981
- Kara S, Gencer B, Karaca T, Tufan HA, Arikan S, Ersan I, Karaboga I, Hanci V. Protective effect of hesperidin and naringenin against apoptosis in ischemia/reperfusion-induced retinal injury in rats. *Sci. World J.* 2014;30: 797–824. doi:10.1155/2014/797824.
- Bayomy NA, Elshafey SH, ElBakary RH, Abdelaziz EZ. Protective effect of hesperidin against lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in adult albino rats: histological, immunohistochemical and biochemical study. *Tissue Cell.* 2014; 46(5):304-10. doi:10.1016/j.tice.2014.05.009
- Xie Q, Gao S, Lei M, Li Z. Hesperidin suppresses ERS-induced inflammation in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Aging (Albany NY)* 2022; 14(3):1265. doi:10.18632/aging.203817
- Selvaraj P, Pugaleendi KV. Hesperidin, a flavanone glycoside, on lipid peroxidation and antioxidant status in experimental myocardial ischemic rats. *Redox Report* 2010; 15(5):217-223. doi:10.1179/135100010X12826446921509.
- Su D, Li P, Wang X, Zhang W, Zhang Y, Wu C, Zhang W et al. Observing malondialdehyde-mediated signaling pathway in cerebral ischemia reperfusion injury with a specific nanolight. *Analytical chemistry* 2020;92(3): 2748-2755. doi:10.1021/acs.analchem.9b05008
- Tu Q, Wang R, Ding B, Zhong W, Cao H. Protective and antioxidant effect of Danshen polysaccharides on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013; 60:268-271. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.05.035
- Roumen RMH, Hendriks T, Ven-Jongekrijg J, Nieuwenhuijzen GAP, Sauerwein R, van der Meer JWM, Goris RJA. Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Annals of Surgery* 1993; 218(6):769-776. doi:10.1097/00000658-199312000-00011
- Zhang WF, Jin YC, Li XM, Yang Z, Wang D, Cui JJ. Protective effects of leptin against cerebral ischemia/reperfusion injury. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2019; 17(5):3282-3290. doi:10.3892/etm.2019.7377
- Gungor ANC, Gencer M, Karaca T, Hacivelioglu S, Uysal A, Korkmaz F, Demirtas S, Cosar E. The effect of hesperetin on ischemia/reperfusion injury in rat ovary. *Arch Gynecol Obstet* 2014; 290(4):763-769. doi:10.1007/s00404-014-3267-8
- Wang W, Liu X, Lu H, Liu L, Wang Y, Yu Y, Zhang T. A method for predicting the success of Pulsinell's four-vessel occlusion rat model by LDF monitoring of cerebral blood flow decline. *Journal of Neuroscience Methods* 2019; 328:108439. doi:10.1016/j.jneumeth.2019.108439
- Hadwan MH, Abed HN. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data in Brief* 2016; 6:194-199. doi:10.1016/j.dib.2015.12.012
- Coban A, Ciftci M, Ozdemir H, Altikar, S. Purification and characterization of catalase enzymes from chicken liver and sheep erythrocytes. *Asian J Chem* 2007; 19(5):3941-3953.
- Chafik A, Essamadi A, Çelik SY, Mavi A. Purification and biochemical characterization of a novel copper, zinc superoxide dismutase from liver of camel (*Camelus dromedarius*): An antioxidant enzyme with unique properties. *Bioorganic Chemistry* 2019; 86:428-436. doi:10.1016/j.bioorg.2019.02.024
- Ürek RÖ, Tarhan L. Purification and characterization of superoxide dismutase from chicken liver. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 2001; 128(2):205-212. doi:10.1016/S1096-4959(00)00300-6
- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186:421-431. doi:10.1016/0076-6879(90)86135-1
- Waterborg JH. The Lowry method for protein quantitation. In *The protein protocols handbook*. Humana Press, Totowa, NJ. 2009; pp. 7-10.
- Jelimek M, Jurajda M, Duris K. Oxidative stress in the brain: Basic concepts and treatment strategies in stroke. *Antioxidants*. 2021; 10(12):1886. doi:10.3390/antiox10121886
- Oztanir MN, Ciftci O, Cetin A, Aladag MA. Hesperidin attenuates oxidative and neuronal damage caused by global cerebral ischemia/reperfusion in a C57BL/6J mouse model. *Neurol Sci.* 2014; 35(9):1393-1399. doi:10.1007/s10072-014-1725-5
- Raza SS, Khan MM, Ahmad A, Ashafaq M, Khuwaja G, Tabassum R, Javed H, Siddiqui MS, Safji MM, Islam F. Hesperidin ameliorates functional and histological outcome and reduces neuroinflammation in experimental stroke. *Brain Res.* 2011; 28(1420):93-105. doi:10.1016/j.brainres.2011.08.047
- Putteeraj M, Lim WL, Teoh SL, Yahaya MF. Flavonoids and its neuroprotective effects on brain ischemia and neurodegenerative diseases. *Current drug targets* 2018; 19(14):1710-1720. doi:10.2174/1389450119666180326125252
- Dimpfel W. Different anticonvulsive effects of hesperidin and its aglycone hesperetin on electrical activity in the rat hippocampus in vitro. *J. Pharm. Pharmacol* 2006; 58:375–379. doi:10.1211/jpp.58.3.0012
- Youdim KA, Dobbie MS, Kuhlme G, Proteggente AR, Abbott NJ, Rice-Evans C. Interactions between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. *J Neurochem* 2003; 85(1):180–192. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01652.x.PMID12641740
- Li X, Hu X, Wang J, Xu W, Yi C, Ma R, Jiang H. Inhibition of autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR pathway contributes to the protection of hesperidin against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Int J Mol Med* 2018; 42:1917e24. doi:10.3892/ijmm.2018.3794
- Celik E, Oguzturk H, Sahin N, Turtay MG, Oguz F, Ciftci O. Protective effects of hesperidin in experimental testicular ischemia/reperfusion injury in rats *Arch Med Sci* 2016;12(5):928–934. doi:https://doi.org/10.5114/aoms.2015.47697
- Chen M, Gu H, Ye Y, Lin B, Sun L, Deng W, Zhang J, Liu J. Protective effects of hesperidin against oxidative stress of tert-butyl hydroperoxide in human hepatocytes. *Food Chem. Toxicol* 2010; 48:2980–2987. doi:10.1016/j.fct.2010.07.037.
- Gaur V, Kumar A. Hesperidin pre-treatment attenuates NO-mediated cerebral ischemic reperfusion injury and memory dysfunction. *Pharmacol Rep* 2010; 62:635–648.
- Park HK, Kang SW, Park MS. Hesperidin Ameliorates Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Sprague-Dawley Rats. *Transplant Proc.* 2019; 51(8):2828-2832. doi:10.1016/j.transproceed.2019.02.059
- Park WS, Park MS, Kang SW, Jin SA, Jeon Y, Hwang J, Kim SK. Hesperidin Shows Protective Effects on Renal Function in Ischemia-induced Acute Kidney Injury (Sprague-Dawley Rats). *Transplant Proc.* 2019; 51(8):2838-2841. doi:10.1016/j.transproceed.2019.02.055.
- El-Sayed SM, Abo-Salem OM, Abd-Ellah MF, Abd-Alla GM. Hesperidin, an antioxidant flavonoid, prevents acrylonitrile-induced oxidative stress in rat brain. *J. Biochem. Mol. Toxicol* 2008; 22:268–273. doi:10.1002/jbt.20237
- Gaur V, Aggarwal A, Kumar A. Possible nitric oxide mechanism in the protective effect of hesperidin against ischemic reperfusion cerebral injury in rats. *Indian J Exp Biol.* 2011; 49(8):609-618.
- Kumar P, Kumar A. Protective effect of hesperidin and naringin against 3-nitropropionic acid induced Huntington's like symptoms in rats, Possible role of nitric oxide. *Behav. Brain Res* 2010; 206(1):38–46. doi:10.1016/j.bbr.2009.08.028
- Kumar BH, Kumar BD, Diwan PV. Hesperidin, a citrus flavonoid, protects against L-methionine-induced hyperhomocysteinemia by abrogation of oxidative stress, endothelial dysfunction and neurotoxicity in Wistar rats. *Pharmaceutical Biology* 2017; 55(1):146–155. doi:10.1080/13880209.2016.1231695
- Tsai YF, Chen YR, Chen JP, Tang Y, Yang KC. Effect of hesperidin on anti-inflammation and cellular antioxidant capacity in hydrogen peroxide-stimulated human articular chondrocytes. *Process Biochemistry* 2019; 85:175–184. doi:10.1016/j.procbio.2019.07.014
- Kumar M, Dahiya V, Kasala ER, Bodduluru LN, Lahkar M. The renoprotective activity of hesperetin in cisplatin induced nephrotoxicity in rats: Molecular and biochemical evidence. *Biomed Pharmacother.* 2017;89 :1207-1215. doi:10.1016/j.biopha.2017.03.008.
- Sahu BD, Kuncha M, Sindhura GJ, Sistla R. Hesperidin attenuate cisplatin-induced acute renal injury by decreasing oxidative stress, inflammation and DNA damage. *Phytomedicine* 2013; 20:453–460. doi:10.1016/j.phymed.2012.12.001.
- Zhang Y, Zhang Y. lncRNA ZFAS1 improves neuronal injury and inhibits inflammation, oxidative stress, and apoptosis by sponging miR-582 and upregulating NOS3 expression in cerebral ischemia/reperfusion injury. *Inflammation* 2020;43(4):337-1350. doi:10.1007/s10753-020-01212-1
- Kumar PP, Kumar KTS, Nainita MK, Tarun AS, Ramudu BGR, Deepika K, Pramoda A, Yasmeen C. Cerebroprotective Potential of Hesperidin Nanoparticles Against Bilateral Common Carotid Artery Occlusion Reperfusion Injury in Rats and In silico Approaches. *Neurotox Res* 2020; 37(2):264-274. doi:10.1007/s12640-019-00098-8.
- Meng C, Guo Z, Li D, Li H, He J, Wen D, Luo B. Preventive effect of hesperidin modulates inflammatory responses and antioxidant status following acute myocardial infarction through the expression of PPAR  $\gamma$  and Bcl 2 in model mice. *Mol Med Rep.* 2018; 17(1):1261-1268. doi:10.3892/mmr.2017.7981
- Rizza S, Muniyappa R, Iantorno M, Kim JA, Chen H, Pullikotil P, Senese N, et al. Citrus polyphenol hesperidin stimulates production of nitric oxide in endothelial cells while improving endothelial functions and reducing inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol Metab* 2011,96(5): E782–E792. doi:10.1210/jc.2010.2879
- Heo SD, Kim J, Choi Y, Ekanayake P, Ahn M, Shin T. Hesperidin improves motor disability

1. *in rat spinal cord injury through anti-inflammatory and antioxidant mechanism via Nrf-2/HO-1 pathway. Neuroscience Letters* 2019; 715:134619. doi:10.1016/j.neulet.2019.134619
2. Nasab MK, Shokouhi G, Ghorbanihaghjo A, Abbasi MM, Salari AA. Hesperidin attenuates depression-related symptoms in mice with mild traumatic brain injury. *Life Sciences* 2018; 213:198-205. doi:10.1016/j.lfs.2018.10.040
3. Herguido MJ, Carceller F, Roda JM, et al: Hippocampal cell loss in transient global cerebral ischemia in rats:a critical assesment. *Neuroscience* 1999; 93(1):71-80. doi:10.1016/S0306-4522(99)00163-3
4. Yonekura I, Kawahara N, Nakatomi H, Furuya K, Kirino T. A model of global cerebral ischemia in C57 BL/6 mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24(2):151-8. doi:10.1097/01.WCB.0000096063.84070.C1
5. Wang JJ, Cui P. Neohesperidin attenuates cerebral ischemia- reperfusion injury via inhibiting the apoptotic pathway and activating the Akt/Nrf2/HO-1 pathway. *J Asian Nat Prod Res* 2013; 15(9):1023–1037. doi:10.1080/10286020.2013.827176