

## بررسی اثر هسپرتین بر تغییرات بافتی و میزان بیان HSP70 در مغز متعاقب ایسکمی پرفیوژن مجدد عضلات اسکلتی موش صحرایی

- حامد اشرف‌زاده تخت فولادی  
گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- پژمان مرتضوی (نویسنده مسئول)  
گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- احمد اصغری  
گروه علوم درمانگاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- فریبرز معیر  
گروه پاتوبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، البرز، ایران



تاریخ دریافت: ۱۳۹۹-۰۸-۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹-۱۰-۱۵  
Email: pejman.mortazavi.99@gmail.com

### چکیده

هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثرات هسپرتین بر آسیب بافت مغز به عنوان ارگان دوردست به دنبال ایسکمی پرفیوژن مجدد عضلات اسکلتی در موش صحرایی می‌باشد. ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به صورت تصادفی در پنج گروه شش تایی، شامل: شم، ایسکمی پرفیوژن مجدد، هسپرتین (تزریق داخل صفاقی به میزان ۵۰ mg/kg)، گروه دی متیل سولفوکساید (۱/۵ mg/kg) و درمان مورد مطالعه قرار گرفت. جهت القای ایسکمی عضلات اسکلتی، شریان رانی به مدت دو ساعت مسدود شده و سپس ۲۴ ساعت جریان خون برقرار گردید. در انتها نمونه‌هایی از خون برای ارزیابی آنزیم‌های MDA و MPO اخذ شده و موش‌ها با رعایت اصول اخلاقی معدوم و از بافت مغز جهت بررسی هیستوپاتولوژی با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) و بررسی ایمونوهیستوشیمی HSP70 در فرمالین ۱۰٪ به آزمایشگاه ارسال شد. سطح سرمی آنزیم‌های MDA و MPO در گروه ایسکمی نسبت به گروه درمان، به طور معناداری افزایش پیدا کرده بود ( $P < 0/05$ ). در ارزیابی‌های هیستوپاتولوژی، آسیب شدید همراه با ادم مغزی، پرخونی، نفوذ سلول‌های آماسی و همچنین تخریب بافت مغز در گروه ایسکمی مشاهده شد اما در گروه درمان به میزان قابل توجهی بهبودی حاصل گردید ( $P < 0/05$ ). در بررسی ایمونوهیستوشیمی بیان داخل سیتوپلاسمی HSP70 تنها در گروه ایسکمی قابل مشاهده و معنادار گزارش گردید و در گروه‌های دیگر هیچ بیان معناداری در بافت مغز گزارش نگردید. نتایج این مطالعه حاکی از آن است که هسپرتین سبب کاهش میزان قابل توجهی از آسیب بافتی در مغز به عنوان ارگان دوردست به دنبال ایسکمی پرفیوژن مجدد عضلات اسکلتی خواهد شد.

کلمات کلیدی: هسپرتین، عضلات اسکلتی، ایسکمی پرفیوژن مجدد، آسیب مغزی، HSP70

- Veterinary Researches & Biological Products No 134 pp: 138-148

### The effect of hesperetin on tissue changes and HSP70 expression in the brain following ischemia-reperfusion of rat skeletal muscle

By: Ashrafzadeh Takhtfooladi, H., Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Mortazavi, P., (Corresponding Author) Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Asghari, A., Department of Clinical Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. and Moayer, F., Department of Pathobiology, School of veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Alborz, Iran.

Received: 2020-11-05 Accepted: 2021-01-04

Email: pejman.mortazavi.99@gmail.com

The aim of this study was to evaluate the effects of hesperetin on brain tissue damage as a distant organ following skeletal muscle Ischemia-reperfusion in rats. 30 male Wistar rats were randomly divided into five groups of six, including: sham, reperfusion ischemia, Hesperetin (intraperitoneal injection of 50 mg / kg), dimethyl sulfoxide group (1.5 mg / kg) and treatment were studied. To induce skeletal muscle ischemia, the femoral artery was occluded for two hours and then blood flow was established for 24 hours. Finally, blood samples were taken to evaluate MDA and MPO enzymes, and then rats were euthanized according to ethical principles. Brain tissue was sent to the laboratory for histopathological examination by staining with hematoxylin and eosin (H&E) and immunohistochemistry of HSP70 in 10% formalin. Serum levels of MDA and MPO enzymes in the ischemia group were significantly increased compared to the treatment group ( $P < 0.05$ ). In histopathological evaluations, severe injury with cerebral edema, congestion, infiltration of inflammatory cells, and destruction of brain tissue was observed in the ischemic group, but significantly improved in the treatment group ( $P < 0.05$ ). In immunohistochemical study, intracytoplasmic expression of HSP70 was reported only in the significant ischemia group and in the other groups no significant expression was reported in brain tissue. The results of this study suggest that hesperetin significantly reduces tissue damage in the brain as a distant organ following ischemia-reperfusion of skeletal muscle.

**Key words:** Hesperetin, Skeletal muscle, Ischemia-reperfusion, Brain injury, HSP70

یک آسیب عمومی می‌شود. (۳، ۹، ۱۳) آسیب‌های بالینی ناشی از پدیده ایسکمی پرفیوژن مجدد به دلیل اختلال در عملکرد عضو و یا اختلال در عملکرد سایر ارگان‌ها سبب افزایش میزان هزینه‌های درمانی و یا افزایش میزان مرگ و میر در بیماران می‌گردد. با توجه به این که در اکثر روش‌های جراحی به خصوص ارتوپدی‌ها و یا جراحی اصلاحی عروق احتمال برخورد با پدیده‌ی ایسکمی- پرفیوژن مجدد هست، به منظور کاهش اثرات بالینی این گونه آسیب‌دیدگی‌ها از داروهای آنتی‌اکسیدانی یا ضد التهابی و یا از روش‌های مختلف حمایتی استفاده می‌گردد. (۲، ۲۲) سلول‌های عصبی به دلیل تحمل کم در مقابل عدم وجود اکسیژن و همچنین به دلیل ارگان حیاتی بودن آن در زمان ایسکمی‌ها بسیار آسیب‌پذیر هستند و پس از ایسکمی- پرفیوژن مجدد عضلات اسکلتی در سیستم اعصاب مرکزی، تخریب سد خونی- مغزی و نفوذ سلول‌های آماسی به بافت مغز مشاهده می‌گردد. (۲۱، ۲۳) هسپرتین یک فلاوانوئید کاهش‌دهنده کلسترول است که به وفور در میوه خانواده مرکبات مثل پرتغال و نارنگی، گریپفروت و همچنین

#### مقدمه

از لحاظ پاتولوژی، عدم خون‌رسانی سبب ایجاد مشکلاتی نظیر انفارکتوس قلبی، عدم خون‌رسانی کافی به عروق محیطی، انفارکتوس مغزی و شوک ناشی از کاهش حجم خون خواهد شد. اگر چه برای جلوگیری از آسیب غیرقابل برگشت، خون‌رسانی به ارگان ایسکمیک امری لازم و ضروری هست اما آسیب به مراتب بیشتر پس از برقراری مجدد خون در انتظار بیمار است. (۷) پس از برقراری مجدد جریان خون و برطرف شدن آسیب یا انسداد رگ‌ها سبب فراهم‌آوری بیش از اندازه‌ی اکسیژن برای آن ارگان می‌شود. این افزایش غلظت اکسیژن سبب فعال‌سازی ماکروفاژها در دیواره‌ی عروق شده و به دنبال آن رادیکال‌های آزادی همچون سوپراکسیداز تولید می‌شود. این رادیکال‌های آزاد شکل گرفته علاوه بر آسیب به اندوتلیال دیواره عروق و آسیب‌های اکسیداتیو به بافت، منجر به آزادسازی سایتوکینین‌ها نیز می‌شوند. سایتوکینین‌ها پیش‌سازهای التهابی بوده و سبب فراخوانی نوتروفیل‌ها شده و در نهایت این فراخوانی سلول‌های چند هسته سبب

تکرار شد. به دنبال تجویز بیهوشی، از طریق سپاهرگ و داج هپارین با دوز ۲۵۰ واحد به عنوان اقدامی پیشگیرانه در برابر لخته شدن تجویز شد. (۲۴)

### روش جراحی

حیوان بیهوش شده به صورت خوابیده به پشت بر روی میز جراحی قرار داده شد. موضع جراحی (سطح داخلی ران پای چپ) تراشیده و با بتادین اسکراب و محلول بتادین و الکل شستشو و ضد عفونی گردید و موضع عمل شان‌گذاری شد. تحت بیهوشی عمومی در شرایط کاملا آسپسی برشی بر روی پوست ناحیه‌ی سطح داخلی پا در اندام حرکتی چپ ایجاد گردید. سپس، سرخرگ و سپاهرگ رانی از بافت‌های اطراف خود جدا شده و در معرض دید قرار گرفتند. سرخرگ رانی پس از جداسازی از بافت‌های اطراف توسط پنس‌های عروقی ظریف مسدود شد. پیش از مسدود نمودن سرخرگ رانی جهت جلوگیری از انعقاد داخل عروقی، ۲۵۰ واحد هپارین به صورت داخل رگی در ورید و داج تزریق گردید. پس از آن در گروه‌های ایسکمی و درمان سرخرگ رانی به مدت دو ساعت مسدود گردید، سپس پنس‌ها برداشته عضلات با استفاده از نخ بخیه ویکریل ۳-۰ به صورت سرتاسری و پوست بوسیله نخ بخیه نایلون ۳-۰ به صورت تک ساده بخیه شده و جهت پرفیوژن مجدد بافتی تمامی موش‌ها در شرایط یکسانی به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند.

### اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی

اندازه‌گیری MDA و MPO با استفاده از کیت شرکت ZellBio (ZellBio GmbH, Deutschland) انجام گرفت. مطابق با دستور شرکت سازنده کیت، رقت‌های سریالی محلول استاندارد تهیه شده و برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. با استفاده از این منحنی و معادله آن، میزان MDA (در طول موج ۵۴۰ نانومتر) و MPO (در طول موج ۶۵۰ نانومتر) پلاسما محاسبه گردید. (۱)

### ارزیابی‌های هیستوپاتولوژی

نمونه‌های بافت مغز در محلول ۱۰٪ فرمالین در بلوک‌های پارافین قرار داده شد و با برش ۴ میکرومتر آماده شد. بر اساس پروتکل استاندارد، نمونه‌ها با همتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. آسیب مغزی مطابق جدول ۱ به چهار دسته توسط پاتولوژیست طبقه‌بندی گردید و شدت آسیب در هر گروه با مشاهده ۱۰ فرم میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار گرفت. (۴)

### ارزیابی ایمونوهیستوشیمی

در این طرح از روش حرارتی (Heat induced epitop retrieval) که مبتنی بر حرارت دادن است استفاده گردید. (دمای ۹۵ سانتی‌گراد برای مدت ۲۰ دقیقه). از بافر سدیم سیترات و آنتی‌بادی مونوکلونال موش بهره گردید. آنتی‌بادی مذکور از شرکت آبکم (Anti-Hsp70-ab5442) antibody تهیه گردید.

نمونه‌های ایمونوهیستوشیمی بر دو اساس امتیازدهی شدند، اولی بر اساس میزان رنگ‌پذیری (Proportion score) و دیگری بر اساس

گوجه‌فرنگی و گیلان وجود دارد. (۸، ۱۲) مطالعات نشان داده‌اند که همپرتین یک ماده ضد التهاب، آنتی‌اکسیدان، ضد آپوپتوز، ضد میکروب، ضد قارچ و ضد ویروس با فعالیت‌های کاهش‌دهنده چربی و حساس به انسولین است. بنابراین، اثرات درمانی در برابر بیماری‌های مختلف دارد. (۱۶، ۱۹) علی‌رغم کاربردهای مختلف همپرتین، هیچ اطلاعاتی در مورد نقش بالقوه آن در کاهش آسیب به اندام‌های دور دست بدنال ایسکمی پرفیوژن مجدد در مغز وجود ندارد. نتایج مطالعه ما به روشن شدن اهمیت بالقوه همپرتین در این وضعیت کمک می‌کند. بر اساس بررسی منابع پیشین، فرضیه‌ما این بود که شاید همپرتین ممکن است اثر محافظتی در آسیب از راه دور بر بافت مغز در موش صحرایی داشته باشد. بنابراین، در مطالعه حاضر هدف اصلی ما بررسی تأثیر همپرتین بر آسیب مغز پس از ایسکمی پرفیوژن مجدد عضله اسکلتی با انجام تجزیه و تحلیل‌های سرولوژی، هیستوپاتولوژی، ایمونوهیستوشیمی و عملکردی در یک مدل حیوانی بود.

### مواد و روش کار

در این مطالعه از ۳۰ سر موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (۲۰۰-۳۰۰ گرم) که همه از لحاظ بالینی سالم بودن مورد استفاده قرار گرفت و در شرایط استاندارد با دسترسی آزاد به آب و غذا و چرخه روشنایی به مدت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای اتاق (۲ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی تحت نظر کمیته اخلاق دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی انجام گرفت.

همپرتین (شرکت شیمیایی سیگما-آلدریج، کد پستی: ۱۰۰۲۵۹۲۱۰۱، محصول چین) تازه با حل شدن پودر در دی متیل سولفوکساید (DMSO)؛ سیگما-آلدریج، ایالات متحده آمریکا) برای تجویز داخل صفاقی تهیه شد.

### گروه‌های آزمایش

موش‌ها به طور تصادفی به پنج گروه شش تایی تقسیم شدند. (۱) گروه شم، تحت تمام مراحل جراحی، به استثنای انسداد شریانی و پرفیوژن مجدد قرار گرفتند. (۲) گروه ایسکمی پرفیوژن مجدد، القای ایسکمی و پرفیوژن مجدد انجام گرفت. (۳) گروه همپرتین دوز ۵۰ mg/kg همپرتین به صورت داخل صفاقی دریافت کردند (۱۲). (۴) گروه دی متیل سولفوکساید، دی متیل سولفوکساید حلال همپرتین است. به منظور بررسی تداخل آن در این مطالعه و تأثیر حلال بر بافت مغز، یک گروه فقط دی متیل سولفوکساید دریافت کردند (۱/۵ mg/kg) به صورت داخل صفاقی (۱۲)؛ و سرانجام (۵) گروه درمان، در معرض ایسکمی و پرفیوژن مجدد قرار گرفتند و قبل از پرفیوژن مجدد، همپرتین mg/kg ۵۰ به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

### القای بیهوشی

برای بیهوشی از ترکیب کتامین هیدروکلراید (۵۰ mg/kg) با زایلانین هیدروکلراید (۲ mg/kg) (۱۰) به صورت تزریق عضلانی استفاده شد. در صورت نیاز جهت حفظ بیهوشی در طی دوره ایسکمی، دوز بیهوشی

MDA و MPO در گروه ایسکمی نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معناداری داشته و در گروه درمان با هسپرتین این میزان به صورت معناداری کاهش یافته است. ( $P < 0/05$ ).

### نتایج هیستوپاتولوژی

آسیب به بافت مغز در گروه ایسکمی با شدت بیشتری رخ داده است و ادم مغزی، پرخونی و نفوذ سلول‌های آماسی به بافت مغز و همچنین تغییرات بافتی و سلولی و از بین رفتن ساختارهای مغز به خوبی قابل مشاهده است ولی در گروه‌های دیگر به خصوص در گروه درمان آسیب به طرز قابل توجهی کاهش و بهبود یافته است. (شکل ۱-۵).

### نتایج ایمونوهیستوشیمی

بیان سیتوپلاسمی HSPV۰ تنها در گروه ایسکمی با درجه متوسط گزارش گردید. بیان در گروه درمان منفی گزارش شده است و همین نشان‌دهنده تاثیر درمان با هسپرتین و بهبودی بافت مغز پس از دریافت درمان است. (شکل ۶-۱۰)

شدت آن (Intensity score) درجه‌بندی شده و مجموع این دو عدد جواب بررسی آزمایش ایمونوهیستوشیمی می‌باشد. (Modified All-Red scoring system)

### ارزیابی‌های آماری

تحلیل آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ انجام گرفت. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان گردید. از تست Kolmogorov-Smirnov/ Mann-Whitney U-test /ANOVA برای مقایسه گروه‌ها با یکدیگر استفاده گردید.  $P < 0/05$  به عنوان اختلاف معنادار در نظر گرفته شد.

### نتایج

در طی آزمایش در هیچ یک از گروه‌ها تلفاتی نداشتیم و نتایج به شرح ذیل می‌باشد:

### نتایج ارزیابی سرمی آنزیم‌ها

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌کنید غلظت سرمی آنزیم‌های

جدول ۱ - درجه بندی آسیب بافتی مغز.

درجه بندی	شرح
صفر	(عدم آسیب) تغییراتی در بافت مغز مشاهده نمی‌شود.
یک	(ملایم) ارتشاح ملایم سلول‌های نوتروفیل به پارانشیم مغز، ادم بینابینی بافت مغز، تغییرات هسته‌ای و سیتوپلاسمی سلول‌های گلیال و آستروسیت‌ها.
دو	(متوسط) ارتشاح بیشتر سلول‌های نوتروفیل به بافت مغز، ادم اطراف عروقی و بینابینی بیشتر در مغز و تغییر ساختاری در بخش‌هایی از بافت مغز.
سه	(شدید) نفوذ و تراکم شدید سلول‌های نوتروفیلی و از بین رفتن کامل ساختارهای بافت مغز.

جدول ۲ - تاثیر هسپرتین بر روی مقادیر سرمی مالون دی آلدئید و میلوپراکسیداز.

گروه	MPO (U/mg)	MDA (MMOL/L)
شم	۵۳/۳۰ $\pm$ ۱۳/۲۵	۱۷/۹۰ $\pm$ ۰/۶۵
ایسکمی	۸۷/۴۵ $\pm$ ۱۳/۰۵*	۲۶/۳۲ $\pm$ ۰/۵۰*
هسپرتین	۵۴/۱۵ $\pm$ ۹/۱۵	۱۷/۷۲ $\pm$ ۰/۰۹
DMSO	۷۷/۶۵ $\pm$ ۱۰/۰۵	۱۹/۰۱ $\pm$ ۰/۵۰
درمان	۶۱/۶۰ $\pm$ ۸/۳۳	۱۸/۳۱ $\pm$ ۰/۳۳

\*تغییرات معنادار نسبت به سایر گروه‌ها.

## بحث

نسبت به گروه درمان بسیار وسیع‌تر بود که از علل آن می‌توان به حساس بودن مغز نسبت به ایسکمی در گروه ایسکمی و از آن مهم‌تر نقش محافظتی خوب هسپرئین در گروه درمان را نتیجه گرفت، افزایش آنزیم‌های استرس اکسیداتیو MPO+MDA و همچنین افزایش بیان HSP70 در گروه ایسکمی نیز تاییدی بر موثر بودن درمان در مواجهه با پدیده ایسکمی پرفیوژن می‌باشد. یک محدودیت اصلی در تحقیقات ما این است که فقط یک دوز هسپرئین مورد مطالعه قرار گرفت. از این رو، مطالعات بیشتری برای ارزیابی اثرات این دارو در دوزهای مختلف مورد نیاز است. همچنین پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی از دوزهای متفاوت هسپرئین به صورت پیش درمانی (قبل از ایجاد ایسکمی) به تنهایی و یا همراه با آنتی‌اکسیدان‌های مناسب جهت بررسی اثر سینرژیستی آنها با عوارض ناشی از استرس اکسیداتیو و یا به شیوه تجویز متفاوت مثلا به جای تزریق صفاقی به صورت خوراکی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین توصیه می‌شود با ارزیابی سم‌شناسی، عوارض جانبی احتمالی هسپرئین بر روی بافت‌ها بررسی شود. علاوه بر این، غلظت هسپرئین سرم در این مطالعه اندازه‌گیری نشده است. از آنجا که بخشی از اثر هسپرئین ممکن است به دلیل متابولیت‌های آن باشد، لازم است که در مطالعات بعدی چنین اندازه‌گیری‌هایی انجام شود. در نتایج تحقیق ما توانایی محافظتی هسپرئین در برابر آسیب به مغز را به عنوان ارگان دور دست نشان داده شد و نتیجه‌ی درمان با هسپرئین بسیار رضایت بخش بوده و اثرات زیانبار آسیب ایسکمی پرفیوژن بافت به طور معناداری در گروه درمان کاهش یافته است.

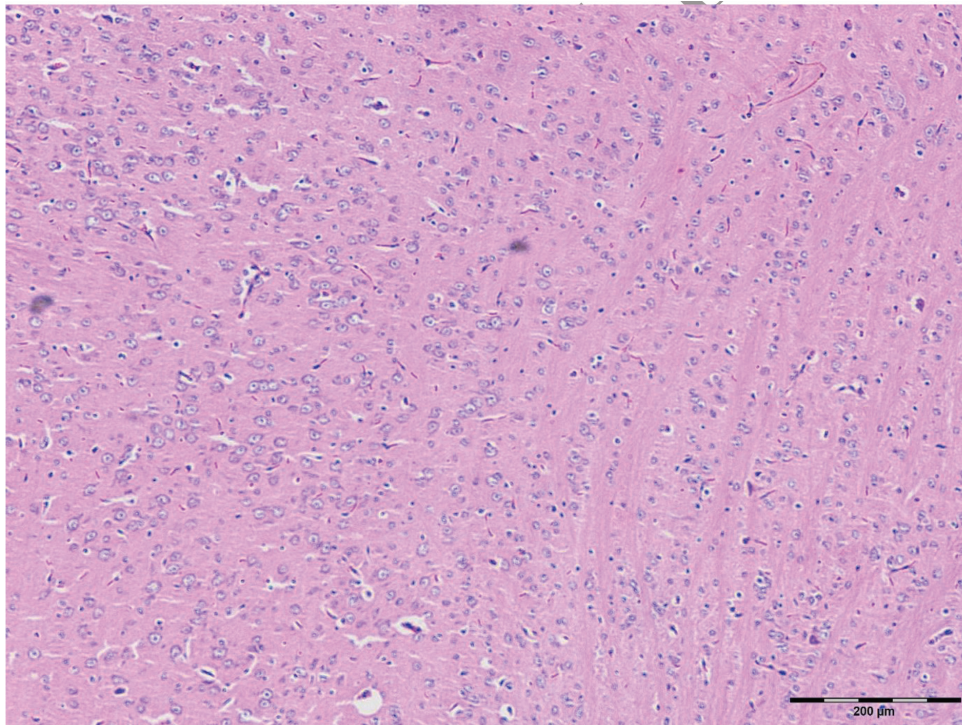
## منابع مورد استفاده

- 1- Amri, J., Sadegh, M., Mohammadi, B., Soliemani, H., Farahani, H. 2016. Assessing total antioxidant and malondialdehyde capacity in blood and brain of newborn rats following chronic exposure to 50 Hz and 900 MHz electromagnetic fields during the embryonic period. *KAUMS Journal (FEYZ)* 20: 33-40.
- 2- Avci, G., Kadioglu, H., Sehirlili, AO, Bozkurt, S, Guclu, O, Arslan, E, et al. 2012. Curcumin protects against ischemia/reperfusion injury in rat skeletal muscle. *Journal of Surgical Research* 172: e39-e46.
- 3- Carden, DL., Granger, DN. 2000. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *The Journal of pathology* 190: 255-266.
- 4- Chatterjee, PK., Patel, NS, Kvale, EO, Cuzzocrea, S, Brown, PA, Stewart, KN, et al. 2002. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney international* 61: 862-871.
- 5- Chen, Y., Wu, X, Yu, S, Lin, X, Wu, J, Li, L, et al. 2012. Neuroprotection of tanshinone IIA against cerebral ischemia/reperfusion injury through inhibition of macrophage migration inhibitory factor in rats. *PloS one* 7: e40165.
- 6- Cojocar, IM., Cojocar, M, Ilescu, I, Botnaru, L, Gurban, CV, Sfrijan, F, et al. 2010. Plasma myeloperoxidase levels in patients

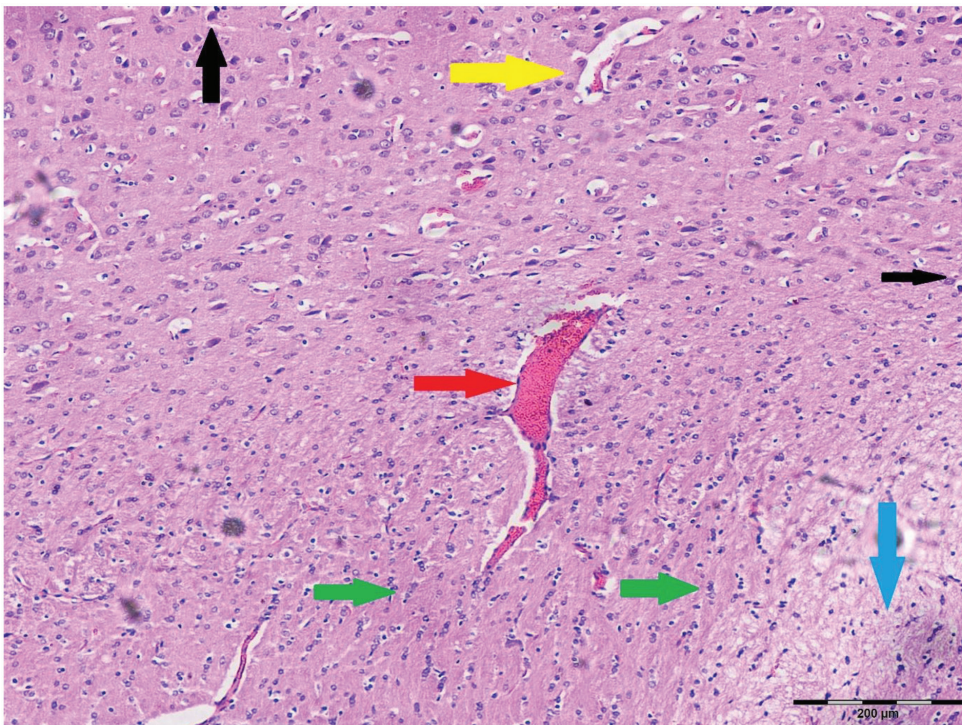
رادیکال‌های اکسیژن، از عوامل مهم آسیب ایسکمی پرفیوژن مجدد در مرحله‌ی زودرس هستند، تحقیقات وسیعی پیرامون نقش حفاظتی عوامل آنتی‌اکسیدانی در پیشگیری و درمان پدیده ایسکمی پرفیوژن مجدد انجام پذیرفته است. (۱۱، ۱۴، ۱۵) رادیکال‌های آزاد اکسیژن سبب پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود. مالون دی‌آلدئید یک ترکیب سه کربنه و دارای دو گروه کتون‌ی است. این ترکیب در گروه ترکیبات ثانویه پراکسیداسیون لیپیدها قرار می‌گیرد و در مرحله نهایی پراکسیداسیون لیپیدها تشکیل می‌شود. همچنین میلوپراکسیداز آنزیمی مشتق شده از لکوسیت‌ها می‌باشد که منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن شده و به همین دلیل می‌تواند با اکسیداسیون لیپوپروتئین‌های با چگالی کم (LDL) سبب آسیب گردد این ترکیبات بیومارکر مناسبی جهت مطالعه استرس اکسیداتیو است و اندازه‌گیری غلظت آن به طور گسترده‌ای برای تشخیص برخی بیماری‌ها در مراحل ابتدایی صورت می‌گیرد. بنابراین از مارکرهای مناسب جهت بررسی می‌باشند. (۶، ۱۸) هسپرئین جزء خانواده فلاونوئیدها می‌باشد. فلاونوئیدها ترکیبات پلی‌فنلی هستند که به طور عمده در گیاهان یافت می‌شوند و به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدان و ضد رادیکال قوی ظاهر می‌شوند قدرت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات وابسته به موقعیت گروه‌های هیدروکسیل بر روی اسکلت فلاونوئید است و عوامل متفاوتی بر روی خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها موثر است. (۱۶) هسپرئین به دلیل ارزان و بی‌ضرر بودن (حتی در دوران بارداری) آن مورد توجه هست و اثرات مثبت آن در نقاط مختلف بدن نشان داده شده است. از خواص آن می‌توان به خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد تومور و ضد التهابی آن نام برد. (۱۲، ۱۹، ۲۱) مطالعات قبلی شواهدی ارائه داده‌اند که هسپرئین علاوه بر جلوگیری از آسیب ایسکمیک، می‌تواند گونه‌های واکنش دهنده اکسیژن (ROS) در ایسکمی پرفیوژن مجدد را کاهش دهد. (۱۰، ۱۹) آن‌ها اثرات مفید آن را بر روی مدل‌های مغزی (۱۰)، قلبی (۲۰)، تخمدان (۱۲) و روده (۱۷) نشان داده‌اند.

ایسکمی می‌تواند درجات مختلفی از آسیب را ایجاد کند، که میزان آن می‌تواند به نوع سلول، حساسیت به ضربه، متابولیسم و خون‌رسانی بستگی داشته باشد. بافت عضلات اسکلتی بسیار در معرض آسیب‌های ایسکمیک است. در حقیقت، مشاهده ایسکمی پرفیوژن مجدد عضله اسکلتی به دنبال سوختگی، ضربه و اقدامات جراحی معمول است. حتی در مواردی که ایسکمی حاد از بین برود و خون‌رسانی مجدد برقرار شود، به دلیل اختلال عملکرد ارگان دور دست، احتمال بیماری و مرگ و میر همچنان باقی است. بافت مغز نسبت به ایسکمی پرفیوژن مجدد، که می‌تواند سبب اختلالات حاد عصبی، معلولیت و مرگ شود، بسیار حساس است. (۲۳) اهمیت ایسکمی پرفیوژن مجدد عضله اسکلتی در تغییرات بافت مغز در سایر مطالعات نیز برجسته شده است (۵، ۲۳) در مطالعه حاضر، ما انتظار داریم که اختلالات و ضایعات بافت‌شناسی را در مغز و متعاقب آن در عملکرد مشاهده کنیم. در مطالعه حاضر متعاقب دو ساعت ایسکمی و ۲۴ ساعت پرفیوژن مجدد عضلات اسکلتی، تغییرات بافت‌شناسی در بافت مغز به عنوان یک عضو دور دست مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان آسیب بافتی در گروه ایسکمی

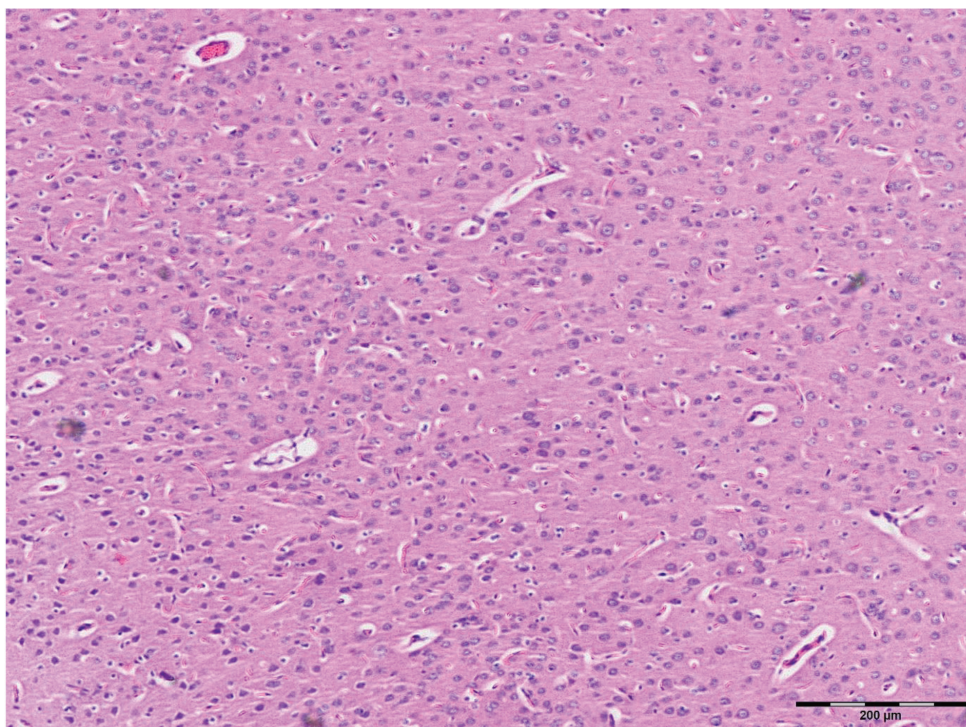
- with acute ischemic stroke. *Rom J Intern Med* 48: 101-104.
- 7- Collard, C., Lekowski, R., Jordan, J., Agah, A., Stahl, G. 1999. Complement activation following oxidative stress. *Molecular immunology* 36: 941-948.
- 8- Duran, Y., Karaboğa, İ. 2020. Effect of hesperetin on systemic inflammation and hepatic injury after blunt chest trauma in rats. *Biotechnic & Histochemistry* 95:297-304.
- 9- Eltzschig, HK., Eckle, T. 2011. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nature medicine* 17: 1391-1401.
- 10- Gaur, V., Kumar, A. 2010. Hesperidin pre-treatment attenuates NO-mediated cerebral ischemic reperfusion injury and memory dysfunction. *Pharmacological Reports* 62: 635-648.
- 11- Glantzounis, GK., Salacinski, HJ, Yang, W, Davidson, BR, Seifalian, AM. 2005. The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury: A review. *Liver Transplantation* 11: 1031-1047
- 12- Gungor, ANC., Gencer, M, Karaca, T, Hacivelioglu, S, Uysal, A, Korkmaz, F, et al. 2014. The effect of hesperetin on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Archives of gynecology and obstetrics* 290: 763-769.
- 13- Gyurkovics, E., Aranyi, P, Stangl, R, Onody, P, Ferreira, G, Lotz, G, et al. 2011. Postconditioning of the lower limb—protection against the reperfusion syndrome. *Journal of Surgical Research* 169: 139-147.
- 14- Matkovics, B. 1988. Determination of enzyme activity in lipid peroxidation and glutathione pathways. *Laboratoriumi Diagnostika* 15: 248-250.
- 15- Mikaeili, S., Kadkhodae, M, Golab, F, Zahmatkesh, M, Mahdavi-Mazdeh, M, Seifi, B, et al. 2009. Effects of liver ischemia-reperfusion on renal functional and oxidative stress indices. *Physiology and Pharmacology* 13: 254-262.
- 16- Panche, A., Diwan, A, Chandra, S. 2016. Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science* 5.
- 17- Pehlivan, M., Hazinedaroglu, S, Kayaoglu, H, Erkek, A, Keklik, T, Canbolat, O, et al. 2004. The effect of diosmin hesperidin on intestinal ischaemia—reperfusion injury. *Acta Chirurgica Belgica* 104: 715-718.
- 18- Qiao, H., Dong, L, Zhang, X, Zhu, C, Zhang, X, Wang, L, et al. 2012. Protective effect of luteolin in experimental ischemic stroke: upregulated SOD1, CAT, Bcl-2 and claudin-5, down-regulated MDA and Bax expression. *Neurochemical research* 37: 2014-2024.
- 19- Roohbakhsh, A., Parhiz, H, Soltani, F, Rezaee, R, Iranshahi, M. 2015. Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Life sciences* 124: 64-74.
- 20- Selvaraj, P., Pugalendi, KV. 2010. Hesperidin, a flavanone glycoside, on lipid peroxidation and antioxidant status in experimental myocardial ischemic rats. *Redox Report* 15: 217-223.
- 21- Shimouchi, A., Yokota, H, Ono, S, Matsumoto, C, Tamai, T, Takumi, H, et al. 2016. Neuroprotective effect of water-dispersible hesperetin in retinal ischemia reperfusion injury. *Japanese journal of ophthalmology* 60: 51-61.
- 22- Takhtfooladi, HA., Moayer, F, Abarkar, M. 2015. Effects of pentoxifylline on skeletal muscle injury induced by acute hindlimb ischaemia—reperfusion: a histopathological study in a rat model. *Comparative Clinical Pathology* 24: 545-548.
- 23- Takhtfooladi, MA., Jahanshahi, A, Sotoudeh, A, Daneshi, MH, Aslani, K, Takhtfooladi, HA. 2014. Neuroprotective effects of tramadol on cerebral injuries caused by hind limb ischaemia/reperfusion in rats. *Comparative Clinical Pathology* 23: 1141-1146.
- 24- Takhtfooladi, MA., Jahanshahi, A, Sotoudeh, A, Jahanshahi, G, Takhtfooladi, HA, Aslani, K. 2013. Effect of tramadol on lung injury induced by skeletal muscle ischemia-reperfusion: an experimental study. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 39: 434-439.



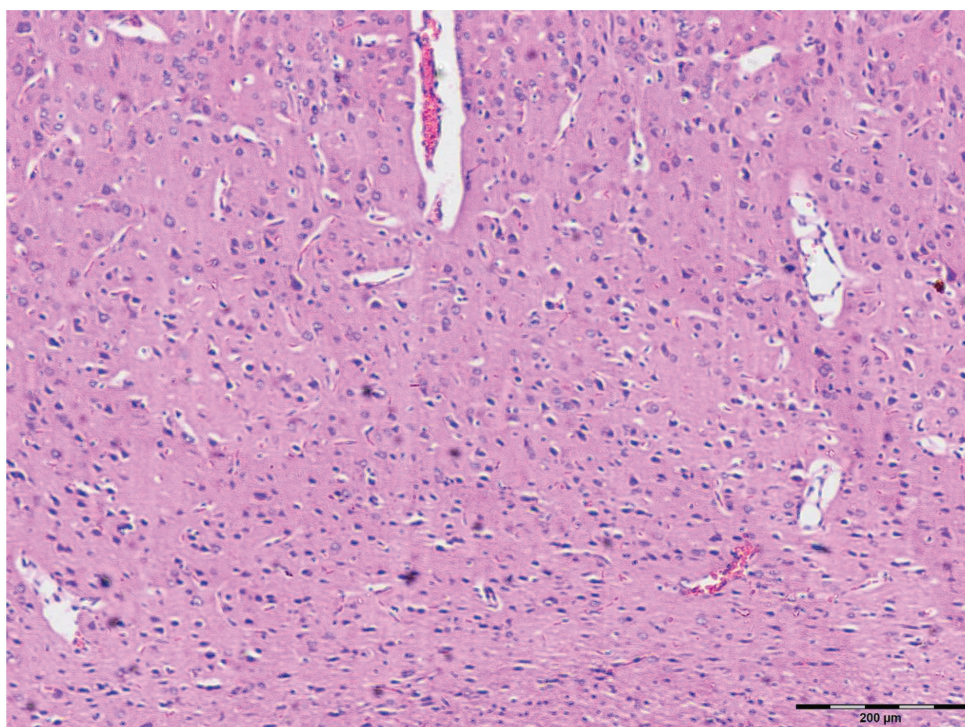
شکل ۱- های ریزبینی از بافت مغز موش از گروه شم (رنگ آمیزی همانوکسیلین و اتوزین، بزرگنمایی) ۱۰۰.



شکل ۲- های ریزبینی از بافت مغز موش از گروه ایسکمی، پرخونی و احتقان (پیکان قرمز)، تغییرات سیتوپلاسمی و هسته (پیکان سیاه)، نفوذ سلول های آماس.

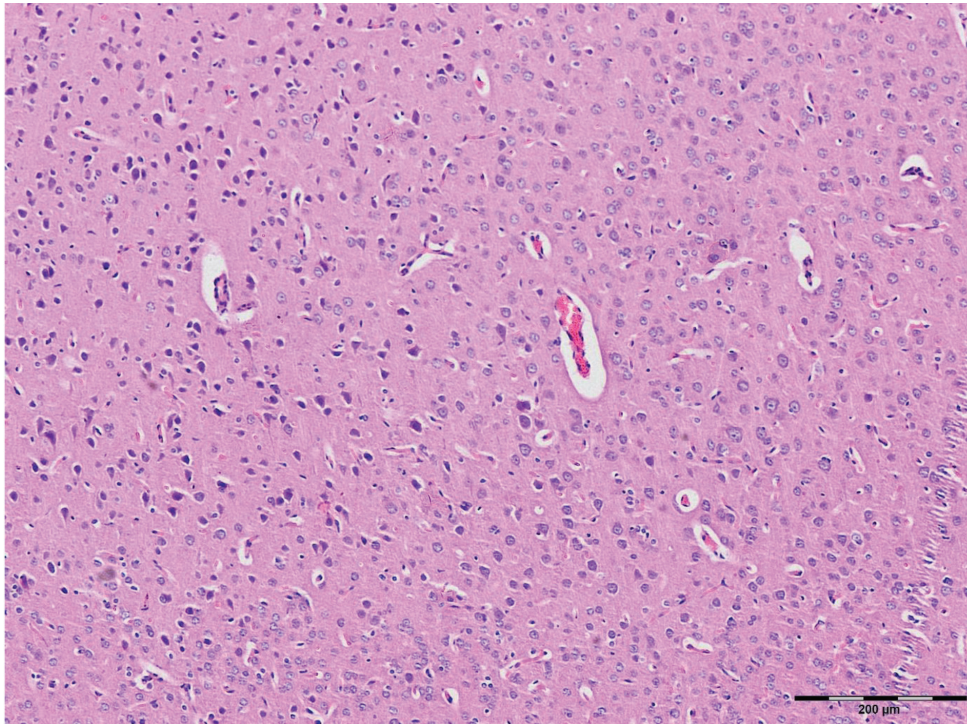


شکل ۳ - نمای ریزبینی از بافت مغز موش از گروه هسپرتین (رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی ۱۰۰).

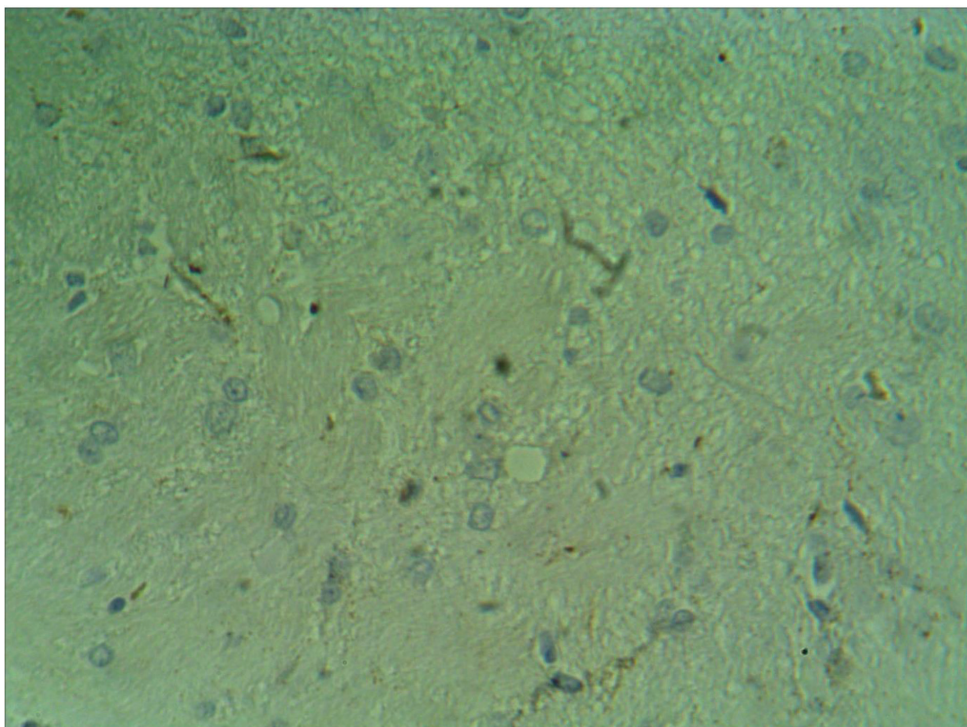


شکل ۴ - نمای ریزبینی از بافت مغز موش از گروه (رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی ۱۰۰) DSMO.

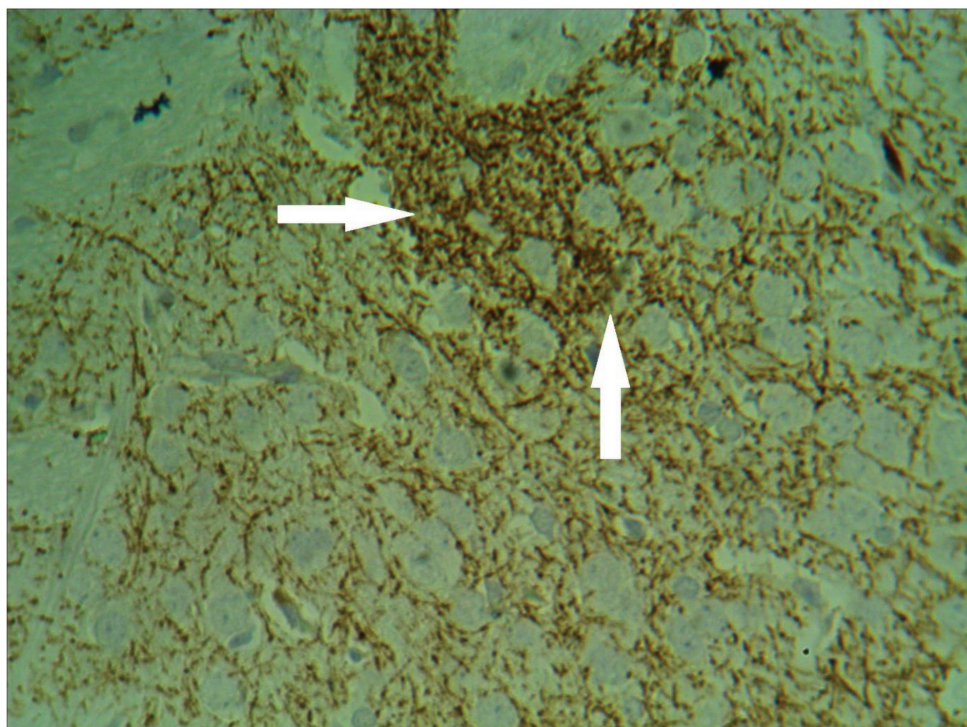




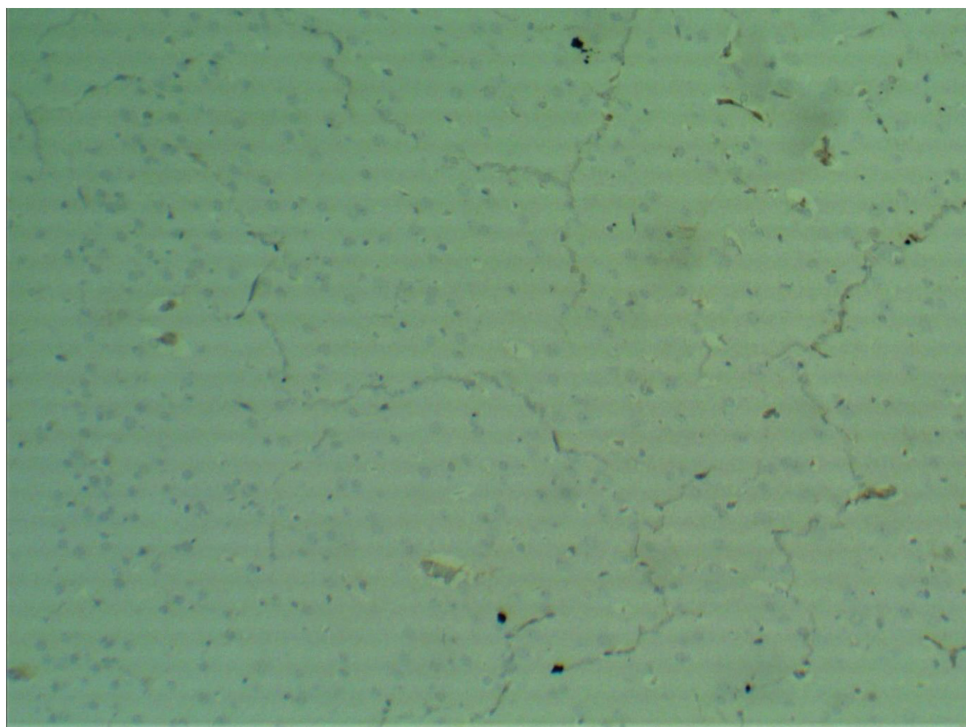
شکل ۵ - های ریزی بی‌ای از بافت مغز موش از گروه درمان (رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی ۱۰۰).



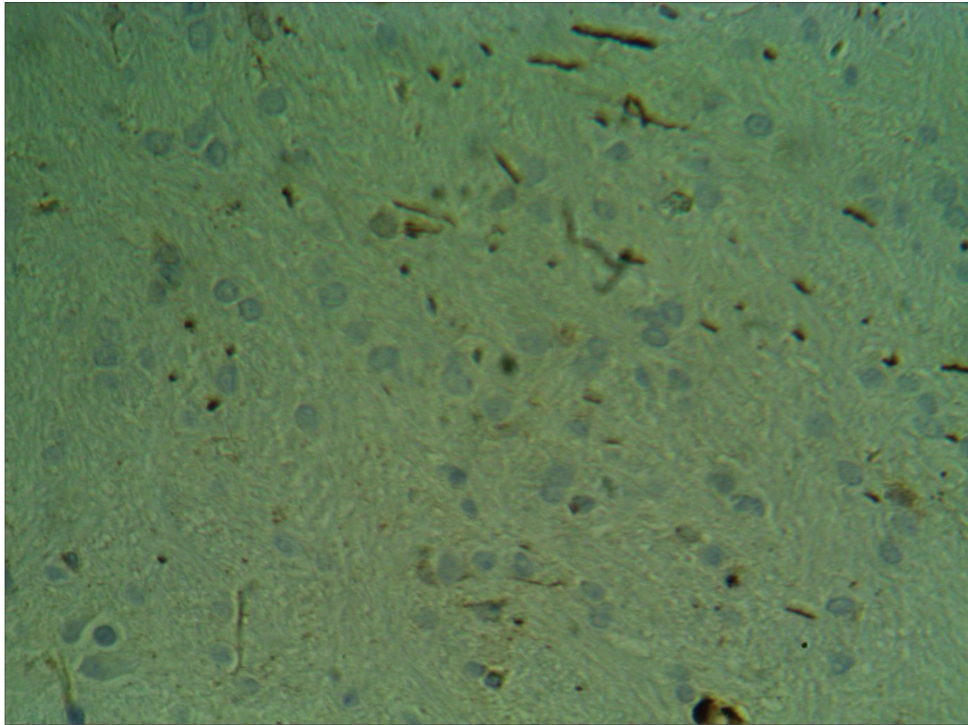
شکل ۶ - های ریزی بی‌ای ایمونوهیستوشیمی بافت مغز موش از گروه شم ( بزرگنمایی ۴۰۰).



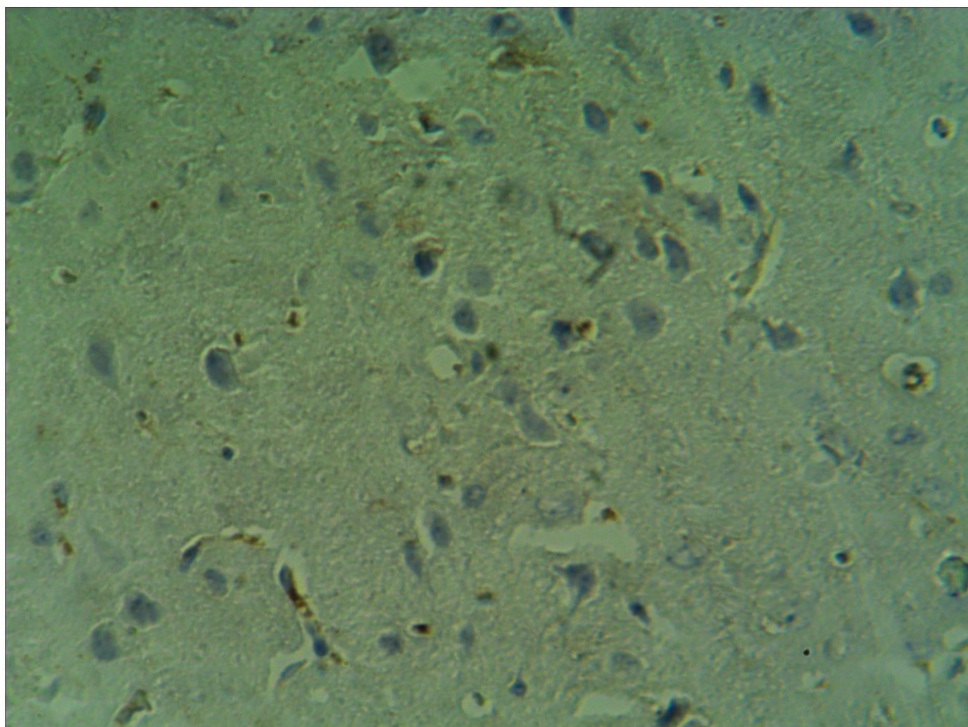
شکل ۷ - نمای ریزبینی ایمونوهیستوشیمی بافت مغز موش از گروه ایسکمی، بیان سیتوپلاسمی پروتئین های شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتون (پیکان سفید). (بزرگن).



شکل ۸ - نمای ریزبینی ایمونوهیستوشیمی بافت مغز موش از گروه هسپرتین (بزرگنمایی ۴۰۰).



شکل ۹ - نمای ریزبینی ایمونوهیستوشیمی بافت مغز موش از گروه (بزرگنمایی ۴۰۰)DSMO.



شکل ۱۰ - نمای ریزبینی ایمونوهیستوشیمی بافت مغز موش از گروه درمان ( بزرگنمایی ۴۰۰).

