

## اثر هسته خشک عنب بر روی هیستومورفولوژی هیپوکامپ در مدل تجربی ایسکمی مغزی

### چکیده

**زمینه:** ایسکمی مغزی یکی از دلایل عمده مرگ و میر در جهان است. تشکیلات هیپوکامپ جزء اولین مناطق مغز است که در اثر سکتة مغزی و ایسکمی دچار آسیب می‌شود. هسته‌ی عنب دارای اثرات حفاظت نورونی بر روی سیستم عصبی مرکزی می‌باشد لذا این تحقیق به بررسی اثر نوروتروفیک یکی از اجزاء هسته عنب بنام جوجوبوزاید A بر روی هیپوکامپ موش صحرایی نر ویستار که تحت ایسکمی-رپرفیوژن فراگیر گذرا قرار گرفته اند می‌پردازد.

**روش کار:** تحقیق حاضر به صورت تجربی- پژوهشی بر روی ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار انجام شد. حیوانات به ۴ گروه شش تایی شامل گروه‌های کنترل، ایسکمی، حامل و آزمایشی (جوجوبوزاید A) تقسیم شدند. در پایان آزمایش، مغز حیوانات خارج و پس از آماده سازی بافتی و رنگ آمیزی با دو روش نیسل و همتاکسیلین-اوتوزین، هیپوکامپ نمونه ها توسط میکروسکوپ نوری بررسی گردید. سلولهای هرمی ناحیه CA۱ هیپوکامپ توسط نرم افزار ۲ image tools شمارش شدند و میانگین آنها منظور گردید.

**یافته ها:** نتایج به دست آمده از آزمون آماری ANOVA یک طرفه و تست Tukey نشان داد که اختلاف معنی داری بین تعداد نورون های ناحیه CA۱ هیپوکامپ گروه کنترل و گروه آزمایشی جوجوبوزاید A وجود ندارد.

**نتیجه گیری:** بنظر میرسد استفاده از هسته خشک عنب سبب بروز اثرات نوروتروفیک بر روی سلولهای هرمی ناحیه CA۱ هیپوکامپ متعاقب ایسکمی مغزی میگردد.

**واژه های کلیدی:** ایسکمی، هیپوکامپ، عنب، نوروتروفیک

## مقدمه

ایسکمی به معنای قطع خونرسانی به اندام یا ناحیه‌ای از بدن است که موجب کاهش انتقال اکسیژن و مواد مغذی به بافت‌ها و در نتیجه اختلال عملکرد آن اندام می‌گردد (۱) و ایسکمی مغزی عبارت است از کاهش میزان متابولیت‌های مغزی در اثر قطع جریان خون که به افت ذخیره اکسیژن و در نتیجه مرگ بافت مغزی یا سکتة مغزی منجر می‌شود (۲). عوارض سکتة مغزی بستگی به محل سکتة و وسعت بافت‌های گرفتار شده مغز دارد که از خفیف و گذرا مثل تاری دید، تا شدید و مانند فلج دائمی و یا حتی مرگ را شامل می‌شود. اگر این علائم در طول ۲۴ ساعت از بین بروند این وضعیت را حمله ایسکمی گذرا می‌نامند که یک علامت هشدار دهنده از یک سکتة مغزی احتمالی در آینده است (۳). ایسکمی مغزی بعد از سرطان و سکتة قلبی یکی از دلایل عمده مرگ و میر در جهان و اولین عامل از کار افتادگی افراد بالاتر از ۶۵ سال است (۴ و ۵).

در طی ایسکمی سطح اکسیژن و ATP (adenosine triphosphate) مغز کم شده و به دنبال آن میزان برداشت رادیکال‌های آزاد کاهش می‌یابد، در نتیجه رادیکال‌های آزاد و لاکتات ناشی از تنفس بی هوازی افزایش می‌یابد که موجب مرگ سلولی می‌شود. در نتیجه فرآیند ایسکمی/رپرفیوژن، رادیکال‌های آزاد اکسیژن و اکشن دهنده از قبیل پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل تولید می‌شوند که در بافت هدف، آسیب شدیدی ایجاد می‌کنند که این آسیب به مراتب بیشتر از شرایط ایسکمی است (۶).

تشکیلات هیپوکمپ در کف بطن طرفی در لوب تمپورال مغز قرار دارد و تقریباً هر گونه تجربه حسی باعث فعال شدن حداقل بخشی از این تشکیلات می‌شود و در عین حال سیگنال‌های خروجی فراوانی به قسمت‌های مختلف دستگاه لیمبیک ارسال می‌کند (۷ و ۸) که نقش مهمی در تشکیل حافظه جدید و تجزیه و تحلیل اطلاعات فضایی ایفا می‌کند (۹). هیپوکمپ توسط شریان کوروئیدی قدامی که شاخه‌ای از کاروتید داخلی می‌باشد، خونرسانی می‌شود. این شریان به دلیل بلند و نازک بودن مستعد ترومبوز است، بنابراین تشکیلات هیپوکمپ جزء اولین مناطقی از مغز است که در بیماری‌های مغزی مثل سکتة مغزی و ایسکمی دچار آسیب می‌شود و به ایسکمی و هیپوکسی بسیار حساس می‌باشد. هیپوکسی در این ناحیه موجب مهار پتانسیل سیناپسی می‌گردد که مکانیسمی برای کاهش انرژی مصرفی سلول در هنگام بروز این عارضه است (۱۰ و ۱۱).

هسته‌ی خشک عناب (*Semen Ziziphi Spinosae* (SZS) از دانه‌های *Ziziphus jujuba* Mill var *spinosa* در داروشناسی کره و چین بوده و متعلق به خانواده *Rhamnacea* می‌باشد (۱۲). این دانه در مناطق استوایی و گرمسیری جهان پراکنده است و به عنوان تخفیف دهنده‌ی درد، مسکن و ضد تشنج برای بیش از ۲۵۰۰ سال در

کشورهای آسیای شرقی مانند کره و چین استفاده می‌شده است (۱۳). همچنین به عنوان ضد تشنج و درمان اضطراب و بی‌خوابی در هند به صورت داروی عمومی مورد استفاده بوده است (۱۴). در سایر کشورهای آسیایی نیز به عنوان درمانگر افسردگی، بی‌خوابی و اضطراب به کار می‌رفته است (۱۵). مطالعات نشان می‌دهند که هسته‌ی عناب دارای اثرات مفیدی بر روی سیستم قلبی عروقی، مانند اثرات ضد آریتمی، ضد فشار خون و ضد اضطرابی می‌باشد (۱۶ و ۱۷). همچنین بهبود دهنده‌ی حملات و استرس اکسیداتیو، افزایش دهنده‌ی خواب القا شده توسط پنتوباریتال، محافظت‌کننده از آسیب نورونی به وجود آمده توسط N-methyl-D-aspartate و کاهش دهنده‌ی آترو اسکلروز بوسیله‌ی مهار شکل‌گیری سلول‌های کفی است (۱۴ و ۲۰-۱۸). جوجوبزاید A, B دو تری‌ترین صابونی مهم از اجزای تشکیل دهنده SZS می‌باشند. به غیر از این دو، فلاونوئیدها و آلکالوئیدهای دیگری هم در عصاره SZS وجود دارند (۱۲).

از آنجاکه ایسکمی مغزی بعد از سرطان و سکتة قلبی از دلایل عمده مرگ و میر در جهان است و از طرفی برخی اجزاء هسته عناب نظیر جوجوبزاید A از جهات مختلف بر روی سیستم عصبی مرکزی به ویژه هیپوکمپ موثر می‌باشد، این تحقیق به بررسی اثر نوروتروفیک جوجوبزاید A بر روی سلول‌های هرمی هیپوکمپ موش صحرایی نر ویستار که تحت ایسکمی-رپرفیوژن فراگیر گذرا قرار گرفته اند می‌پردازد.

## روش کار

تحقیق حاضر به صورت تجربی-پژوهشی بر روی ۲۴ سر موش صحرایی (رت) نر نژاد ویستار (تهیه شده از بیمارستان بقیة‌الله) با سن ۸ هفته و وزن ۲۵۰ گرم در مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران انجام شد. حیوانات در دمای ۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۰ درصد و با ۱۲ ساعت سیکل روشنایی-تاریکی و دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. تمامی اصول اخلاقی مطالعه، مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی و مطالعات انسانی مصوب دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران انجام شد. (کد اخلاق: IR.IAU.PS.REC.۱۴۰۰، ۱۸۲)

## گروه‌ها

حیوانات بطور تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی به شرح زیر تقسیم شدند: گروه کنترل: رت‌ها در شرایط استاندارد آزمایشگاهی نگهداری شده و فقط تحت بیهوشی قرار گرفتند و در پایان مدت مورد نظر (۳ روز) کشته شدند.

گروه ایسکمی: رت‌ها بعد از بیهوشی ۲۰ دقیقه تحت ایسکمی/رپرفیوژن فراگیر گذرا قرار گرفتند.

گروه آزمایشی: دوز ۰/۰۲ mg/kg از جوجوبزاید A (شرکت سیگما

الدريج آلمان) انتخاب گردید (۲۱) و ۲۰ دقیقه قبل از ایسکمی، به طریق داخل صفاقی یا IP (intraperitoneal) به رت‌ها تزریق شد.

گروه حامل: ۰/۵ ml از حلال جوجوبوزاید A یعنی DMSO (دی متیل سولفوکساید) به طریق IP به رت‌ها تزریق شد.

بعد از ۳ روز حیوانات تمامی گروه‌ها ابتدا بیهوش شده و سپس مغز آنها پس از قطع سر توسط گیوتین از مجسمه خارج و هیپوکامپ آنها متعاقب آماده سازی بافتی مورد بررسی قرار گرفت.

### روش ایجاد ایسکمی

حیوانات با استفاده از کتامین و زایلازین (۱۰ mg/kg زایلازین و ۱۰۰ mg/kg کتامین) بیهوش شده و با ایجاد یک برش عمودی در ناحیه گردن شریانهای کاروتیدی مشترک در معرض دید قرار گرفته و به وسیله دو کلامپ میکروسرجری استریل به مدت ۲۰ دقیقه مسدود گردیدند. سپس کلامپ‌ها جدا شده و ناحیه برش خورده بخیه زده شد.

### بررسی بافتی

پس از ثبوت و آماده سازی بافتی و تهیه بلوک پارافینی، با استفاده از دستگاه میکروتوم مقاطع کروئال بصورت سریال و به ضخامت ۵ و ۱۰ میکرون در فاصله ۲/۳ الی ۵ میلیمتر از خلف برگما تهیه شد. مقاطع با ضخامت ۵ میکرون برای رنگ آمیزی هماتوکسیلین-آئوزین H&E جهت بررسی کیفی بافت و مقاطع با ضخامت ۱۰ میکرون برای رنگ آمیزی نیسل جهت شناسایی و شمارش نورونهای سالم و افتراق آنها از نورونهای دژنره تهیه شد.

لامها توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰× بررسی شدند و در روش نیسل فقط نورونهای هر می شکلی که هسته و هستک واضح و مشخص داشتند بعنوان سلولهای زنده و سالم در نظر گرفته شدند. از هر نمونه ۸ فتومیکروگراف تهیه شد که سه فتومیکروگراف با حداقل فاصله ۴۰ میکرون بطور تصادفی انتخاب و سلولهای هر می ناحیه CA۱ هیپوکامپ توسط نرم افزار image tools ۲ شمارش شدند و میانگین آنها منظور گردید.

### تحلیل آماری داده ها

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ۲۳ و به وسیله آزمون آماری ANOVA یک‌طرفه و تست Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ < P در نظر گرفته شد.

### یافته ها

#### رنگ آمیزی H&E

در بررسی نمونه‌های گروه کنترل که به روش H&E رنگ آمیزی شده بودند، مشاهده شد که نورونها در نواحی CA۱ به طور یکنواخت و منظم

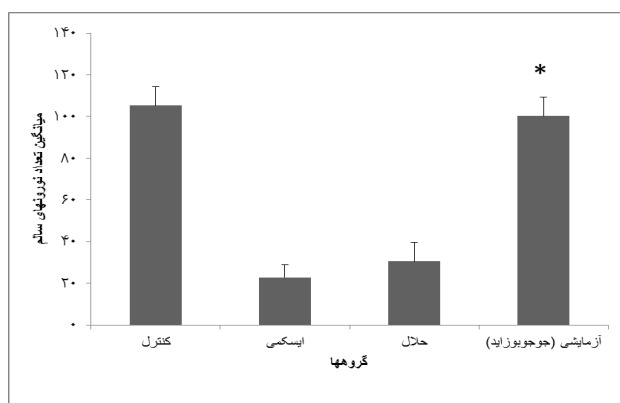
قرار گرفته اند و به ندرت سلولهای باریک و تیره رنگ با هسته‌های فشرده و تیره (نشانگر نورون‌هایی است که مراحل اضمحلال خود را طی می‌کنند) در لابلای سلولها دیده می‌شوند. بافت هیپوکامپ یکنواخت بوده و به ندرت رگ خونی در اطراف بافت دیده می‌شود (شکل A-۱). در گروه ایسکمی که فقط تحت بیهوشی و سپس جراحی قرار گرفته بودند در نواحی CA۱، سلولهای سالم به ندرت دیده می‌شوند ولی سلولهای فشرده با هسته‌های تیره و پیکنوتیک به وفور در فواصل سلولهای سالم وجود دارند (شکل B-۱). در گروه آزمایشی جوجوبوزاید A نیز مشاهدات تقریباً نظیر نمونه کنترل بود. به این ترتیب که از تعداد سلولهای پیکنوتیک کم شده و به تعداد سلولهای سالم افزوده شده است. اما در بعضی نقاط، عروق متسع نیز در لابه لای بافت هیپو کمپ دیده می‌شوند (شکل C-۱). در گروه حامل نیز در ناحیه CA۱ سلولهای فشرده به تعداد زیاد در مقایسه با کنترل دیده می‌شوند و تعداد سلولهای سالم نیز نسبت به گروه کنترل کمتر به چشم می‌خورد (شکل D-۱).

### رنگ آمیزی نیسل

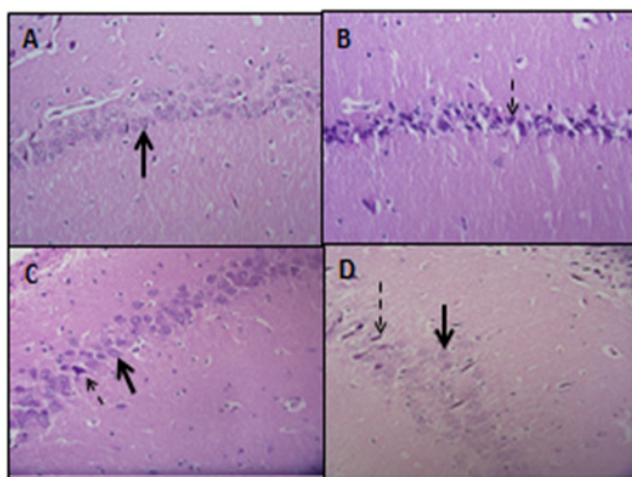
در بررسی برش‌های مورد مطالعه با استفاده از رنگ آمیزی نیسل، سلول‌هایی که دارای هسته گرد، روشن با ظاهری یوکروماتین و دارای چند هستک بودند به عنوان سلولهای سالم در نظر گرفته شدند و سلول‌هایی که هسته آن‌ها متراکم، چند وجهی و هتروکروماتین بود به عنوان سلولهای دژنره در نظر گرفته شدند (شکل ۲). بررسی داده‌های به دست آمده از تعداد سلولهای هر می زنده در ناحیه CA۱ هیپوکامپ نشان داد که بستن شریانهای کاروتید مشترک به مدت ۲۰ دقیقه باعث کاهش شدید سلولهای زنده گردیده و میانگین تعداد این سلولها را از ۱۰۵ عدد به ۲۲ عدد کاهش داده است در صورتیکه این میانگین با تزریق جوجوبوزاید A به ۱۰۰ عدد افزایش یافت. همچنین نتایج به دست آمده از آزمون آماری ANOVA یک‌طرفه و تست Tukey، اختلاف معنی‌داری را بین گروه کنترل با گروه ایسکمی و حامل نشان داد در حالیکه این اختلاف با گروه جوجوبوزاید A (۰/۷۶۲ = P) معنی دار نبود (نمودار ۱).

### بحث

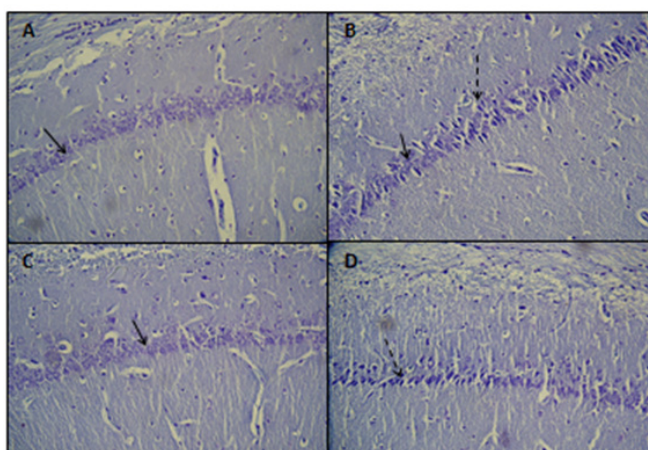
تا کنون مطالعه ای در مورد اثر نوروتروفیک هسته خشک عنب و اجزاء آن نظیر جوجوبوزاید بر روی ناحیه CA۱ هیپوکامپ متعاقب ایسکمی-رپرفیوژن فراگیرگذا صورت نگرفته است ولی در سال‌های اخیر به نقش آنتی اکسیدان‌ها در جلوگیری از عوارض ناشی از آسیب‌های مغزی پس از بروز سکت‌های مغزی توجه خاصی شده است (۲۳) و (۲۲) همچنین برخی مطالعات نیز به نقش جوجوبوزاید A به عنوان یک ماده آنتی اکسیدان قوی اشاره داشته اند (۲۵ و ۲۴) به طور مثال Wu در سال ۲۰۰۹ نشان داد که جوجوبوزاید A می‌تواند به طور موثری



نمودار ۱: مقایسه میانگین تعداد نورونهای هر می زنده در گروه ها.  
\* و + : نشان دهنده اختلاف معنی دار گروهها با یکدیگر است.



شکل ۱- فتومیکروگراف از ناحیه CA۱ هیپوکمپ گروههای آزمایشی: A: گروه کنترل، B: گروه ایسکمی، C: گروه آزمایشی (جوجویوزاید) (D، A: گروه حامل (نوک پیکانه‌های پیوسته سلولهای سالم و نوک پیکانه‌های منقطع، سلولهای پیکنوتیک را نشان می دهد). رنگ آمیزی H&E، بزرگ نمایی ۴۰۰×



شکل ۲: فتومیکروگراف از ناحیه CA۱ هیپوکمپ گروههای آزمایشی. A: گروه کنترل، B: گروه ایسکمی، C: گروه آزمایشی (جوجویوزاید) (D، A: گروه حامل (نوک پیکانه‌های پیوسته سلولهای سالم و نوک پیکانه‌های منقطع، سلولهای پیکنوتیک را نشان می دهد). رنگ آمیزی نیسل، بزرگ نمایی ۴۰۰×۴۰۰



و توزیع  $K^+$  در سلول میشود (۳۰). بنابراین کاهش تولید ATP که پس از عدم تعادل  $Na^+ / K^+$  به علت ( $Na^+ / K^+ ATPase$ ) اتفاق می افتد کمک می کند تا جذب گلوتامات که مهم ترین محرک کننده است، کاهش یابد (۳۱)، این وضعیت، گیرنده های گلوتامات را تحت تاثیر قرار می دهد و نفوذ  $Ca^{2+}$  افزایش می یابد. این مسئله موجب ایجاد یک سری از رویدادهای هسته ای و سیتوپلاسمی (تحریک پذیری) می شود که منجر به شکست میتوکندری و آپوپتوز میگردد (۳۲ و ۳۳). در همان زمان، نفوذ  $Ca^{2+}$  باعث فعال شدن آنزیم های کاتابولیک با تولید اسید آراشیدونیک می شود و تشکیل گونه های اکسیژن واکنشی ROS را به طور عمده در نورون ها افزایش می دهد که در نتیجه باعث انتقال اسموتیک آب به سلول ها شده و منجر به ادم سیتوتوکسیک، لیز سلول و نکروز می گردد (۳۴).

برخی مطالعات نشان داده که جوجوبوزاید A بر مسیر سیگنال دهی به واسطه گلوتامات اثر مهاری دارد (۳۵) گیرنده NMDA یک نوع گیرنده گلوتامات است که در شرایط فیزیولوژیک، در توسعه سیستم عصبی، یادگیری و حافظه و در نوروتوکسیسیتی در شرایط هایپوکسی نقشی کلیدی ایفا می کند (۳۶). مطالعات قبلی نشان داده اند که افزایش فعالیت و یا نقص فعالیت گیرنده های NMDA در بسیاری از بیماری های حاد و مزمن سیستم عصبی مرکزی نظیر ایسکمی مغزی و آسیب ترومای مغزی دخالت دارند (۳۷) و جوجوبوزاید A اثر مهاری خود بر مسیر سیگنال دهی تحریکی با واسطه گلوتامات در ناحیه هیپوکمپ را احتمالاً از طریق عمل آنتی کالمودولینی خود اعمال می کند (۳۸). بنابراین احتمال می رود جوجوبوزاید A از طریق مهار فعالیت پروتئین های پیش آپوپتوزی و نیز اثر بر روی فعالیت گیرنده های NMDA اعمال نماید و به واسطه اثر مهاری اش بر مسیر سیگنال دهی گلوتامات و نیز حذف ROS به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی بالقوه اش، مانع از آسیب بیشتر سلولی در ناحیه CA۱ هیپوکمپ متعاقب ایسکمی - رپرفیوژن گردد.

### نتیجه گیری

از نتایج آنالیز آماری داده های حاصل از این مطالعه این طور استنباط می شود که تزریق جوجوبوزاید A قبل از ایسکمی - رپرفیوژن مغزی با کاهش آسیب میتوکندری و کاهش عوامل و فاکتورهای التهابی سبب بروز اثرات نوروتروفیک بر روی سلول های هرمی ناحیه CA۱ هیپوکمپ می گردد.

آزاد سازی و سطح نوروترانسمیترهای آمینه ای را تنظیم نموده و نیز آپوپتوز را متعاقب ایسکمی مغزی موضعی در هیپوکمپ موش صحرایی کاهش دهد (۲۶).

Ki-Yeon و همکاران (۲۰۱۰) نیز نشان دادند که عصاره به دست آمده از هسته عنب به علت اثرات آنتی اکسیدانی و نوروپروتکتیو خود می تواند با فعال سازی بیان SOD۱ و کاهش اکسیداسیون لیپید، نورونها را از آسیب ایسکمیک در ناحیه CA۱ هیپوکمپ محافظت نماید (۲۷). بنابر این این طور به نظر می رسد که حضور جوجوبوزاید A به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی از ایجاد رادیکال های آزاد جلوگیری کرده و به دلیل خاصیت آن در مقابله با استرس اکسیداتیو، اثرات محافظتی خود را بر روی سلول های هرمی ناحیه هیپوکمپ اعمال می نماید.

مطالعه حاضر نیز نشان داد که تزریق جوجوبوزاید A؛ قبل از ایسکمی - رپرفیوژن مغزی سبب بروز اثرات محافظتی بر روی سلول های هرمی ناحیه CA۱ هیپوکمپ شد. رنگ آمیزی نیسل در این مطالعه نشان داد که ۲۰ دقیقه ایسکمی - رپرفیوژن مغزی سبب افزایش سلول های دژنره در ناحیه CA۱ هیپوکمپ شده و تزریق جوجوبوزاید A توانسته است از میزان شدت بروز آنها بکاهد.

می توان گفت در این مطالعه پیش درمانی با جوجوبوزاید A، سبب کاهش اثرات نوروتوکسیسیتی ناشی از القای ایسکمی - رپرفیوژن گذرا شده است. اگر چه هنوز مکانیسم دقیق این فرایند کاملاً روشن نیست اما انتظار می رود که به دلیل وجود خاصیت آنتی اکسیدانی قوی این ماده، جوجوبوزاید A بتواند از تشکیل رادیکال های آزاد در مغز متعاقب ایسکمی - رپرفیوژن فراگیر گذرا ممانعت به عمل آورد.

مکانیسم مهم دیگری که در ایسکمی مغزی سبب بروز ضایعات بیشتر می شود ایجاد التهاب پس از بروز ایسکمی مغزی می باشد و حضور عوامل التهابی می تواند بر تشدید ضایعات تاثیر مستقیم بگذارد (۲۸). همچنین مطالعات نشان داده اند که به دلیل وجود اثرات ضد التهابی، جوجوبوزاید A می تواند با اثر مستقیم بر روی التهاب منطقه دچار ایسکمی، نقش محافظتی خود را بر سیستم عصبی پس از ایجاد ضایعه مغزی ناشی از ایسکمی - رپرفیوژن القا نماید (۲۱) چند دقیقه بعد از انسداد شریانی، عدم تعادل یونی با نشأت غیر طبیعی  $Na^+$  و خروج  $K^+$  همراه می گردد که موجب دپلاریزه شدن آنوکسیک گسترده در غشاء نورون ها و سلول های عصبی هیپوکمپ می شود (۲۹) افزایش نفوذ  $Na^+$  به نورون، موجب عدم تعادل در میزان افزایش غلظت  $Na^+$

### منابع

1. Hadjinikolaou, L. Kotidis, K. Galinanes, M. Relationship between reduced elasticity of extracardiac vessels and left stem coronary artery disease. Eur Heart J. 2004; 25: 508-13.
2. Johansson, BB. Current trends in stroke rehabilitation. A

review with focus on brain plasticity. Acta Neurol Scand. 2011; 123(3):147-59.

3. Easton JD, Albers GW, Albers MJ, Chaturvedi S, Feldmann E, Hatsukami TS, et al. Definition and evaluation of transient isch-

- emic attach: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. The American Academy of Neurology affirms the value of this statement as an educational tool for neurologists. *Stroke*. 2009; 40(6):2276-93. doi: 10.1161/strokeaha.108.192218
4. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-poor MP. Mechanism of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 2008; 55:310-8. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.01.005.
5. Huang, L. Chen, N. Ge, M. Zhu, Y. Guan, S. Wang, JH. Ca<sup>2+</sup> and acidosis synergistically lead to the dysfunction of cortical GABAergic neurons during ischemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 394(3):709-14.
6. Zini, I. Tomasi, A. Grimaldi, R. Vannini, V. Agnati, LF. Detection of free radicals during brain ischemia and reperfusion by spin-trapping and microdialysis. *Neurosci Lett*. 1992; 138(2): 279-82.
7. Barrett EK, Barman SM, Brooks HL, Yuan J. Ganong's Review of Medical Physiology. 26th ed. California Mc Graw Hill. 2019; pp: 643-5.
8. Paul CM, Magda G, Abel S. Spatial memory: the orethical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res*. 2009; 203(2): 151-64.
9. Taupin P. The Hippocampus: Neurotransmission and plasticity in the nervous system. New York. Nova Biomedical Books. 2007; pp:20-5.
10. Eichenbaum, H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron*. 2004; 44(1):109-20.
11. Simonová Z, Sterbová K, Brozek G, Komárek V, Syková E. Postnatal hypobaric hypoxia in rats impairs water maze learning and morphology of neurones and macroglia in cortex and hippocampus. *Behav. Brain Res*. 2003;141: 195-205.
12. Kim WI, Zhao BT, Zhang HY, Lee JH, Son JK, Woo MH. Quantitative and pattern recognition analyses of magnoflorine, spinosin, 6000-feruloyl spinosin and jujuboside A by HPLC in Zizyphi Semen. *Arch. Pharm. Res*. 2014;37:1139-1147.
13. Han D, Wan C, Liu F, Xu X, Jiang L, Xu J. Jujuboside A protects H9C2 cells from isoproterenol-induced injury via activating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016;2016:9593716. doi: 10.1155/2016/9593716.
14. Pahuja M, Kleekal T, Reeta KH, Tripathi M, Gupta YK. Interaction profile of Zizyphus jujuba with phenytoin, phenobarbitone, and carbamazepine in maximal electro shock induced seizures in rats. *Epilepsy Behav*. 2012;25(3):368-73. doi: 10.1016/j.yebeh.2012.08.014.
15. Liu J, Qiao W, Yang Y, Ren L, Sun Y, Wang S. Antidepressant-like effect of the ethanolic extract from Suanzaorenhehu-an formula in mice models of depression. *J Ethnopharmacol*. 2012;141(1):257-64. doi: 10.1016/j.jep.2012.02.026.
16. Fu JY, Qian LB, Zhu LG, Liang HT, Tan YN, Lu HT, et al. Betulinic acid ameliorates endothelium-dependent relaxation in L-NAME-induced hypertensive rats by reducing oxidative stress. *Eur J Pharm Sci*. 2011;44(3):385-91. doi: 10.1016/j.ejps.2011.08.025.
17. Peng WH, Hsieh MT, Lee YS, Lin YC, Liao J. Anxiolytic effect of seed of Zizyphus jujuba in mouse models of anxiety. *J Ethnopharmacol*. 2000;72(3):435-41. doi: 10.1016/s0378-8741(00)00255-5.
18. Ma Y, Han H, Nam SY, Kim YB, Hong JT, Yun YP, et al. Cyclopeptide alkaloid fraction from Zizyphi Spinosi Semen enhances pentobarbital-induced sleeping behaviors. *J Ethnopharmacol*. 2008;117(2):318-24. doi: 10.1016/j.jep.2008.02.006.
19. Mo SJ, Son EW, Lee SR, Lee SM, Shin DH, Pyo S. CML-1 inhibits TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation and adhesion molecule expression in endothelial cells through inhibition of I $\kappa$ B $\alpha$  kinase. *J Ethnopharmacol*. 2007;109(1):78-86. doi: 10.1016/j.jep.2006.07.006.
20. Fujiwara Y, Hayashida A, Tsurushima K, Nagai R, Yoshitomi M, Daiguji N, et al. Triterpenoids isolated from Zizyphus jujuba inhibit foam cell formation in macrophages. *J Agric Food Chem*. 2011;59(9):4544-52. doi: 10.1021/jf200193r.
21. Liu Z, Zhao X, Liu B, Liu AJ, Li H, Mao X, et al. Jujuboside A, a neuroprotective agent from semen Zizyphi Spinosae ameliorates behavioral disorders of the dementia mouse model induced by A $\beta$  1-42. *Eur J Pharmacol*. 2014;738:206-13. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.05.041.
22. Xue F, Huang JW, Ding PY, Zang HG, Kou ZJ, Li T, et al. Nrf2/antioxidant defense pathway is involved in the neuroprotective effects of Sirt1 against focal cerebral ischemia in rats after hyperbaric oxygen preconditioning. *Behav Brain Res*. 2016;309:1-8. doi: 10.1016/j.bbr.2016.04.045..
23. Guo C, Wang S, Duan J, Jia N, Zhu Y, Ding Y, et al. Protocatechualdehyde protects against cerebral ischemia-reperfusion-induced oxidative injury via protein kinase C $\epsilon$ /Nrf2/HO-1 pathway. *Mol Neurobiol*. 2017;54(2):833-45. doi: 10.1007/s12035-016-9690-z.
24. He SR, Zhao CB, Zhang JX, Wang J, Wu B, Wu CJ. Botanical and Traditional Uses and Phytochemical, Pharmacological, Pharmacokinetic, and Toxicological Characteristics of Zizyphi Spinosae Semen: A Review. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2020; 2020:5861821. doi: 10.1155/2020/5861821.
25. Koley TK, Kaur C, Nagal S, Walia S, Jaggi S. Antioxidant activity and phenolic content in genotypes of Indian jujube (Zizyphus mauritiana Lamk.). *Arab. J. Chem*. 2016; 9(2):S1044-S52. doi: 10.1016/j.arabjc.2011.11.005
26. Wu YH. Effects of Jujuboside A on amino acid levels of neurotransmitters and apoptosis in hippocampus cerebral ischemia in rats. *Zhejiang journal of integrated traditional Chinese and western medicine*. 2009; 7:403-405
27. Yoo KY, Li H, Hwang IK, Choi JH, Lee CH, Kwon DY, et al. Zizyphus attenuates ischemic damage in the gerbil hippocampus via its antioxidant effect. *J Med Food*. 2010;13(3):557-63. doi: 10.1089/jmf.2009.1254.
28. Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol*. 2006;66(3):232-45. doi: 10.1016/j.surneu.2005.12.028.
29. Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*. 2009;40(5):e331-9. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.531632
30. Karmazyn M. The 1990 Merck Frost Award. Ischemic and reperfusion injury in the heart. Cellular mechanisms and pharmacological interventions. *Can J Physiol Pharmacol*. 1991;69(6):719-30. doi: 10.1139/y91-108.
31. Hunter AJ, Green AR, Cross AJ. Animal models of acute ischemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs? *Trends Pharmacol Sci*. 1995;16(4):123-8. doi: 10.1016/s0165-6147(00)88999-3.
32. Zhang QG, Xu YL, Li HC, Han D, Zhang GY. NMDA receptor/L-VGCC-dependent expression and AMPA/KA receptor-dependent activation of c-Jun induced by cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurosci Lett*. 2006;398(3):268-73. doi: 10.1016/j.neulet.2006.01.005.
33. Li XM, Yang JM, Hu DH, Hou FQ, Zhao M, Zhu XH, et al. Contribution of downregulation of L-type calcium currents to delayed neuronal death in rat hippocampus after global cerebral ischemia and reperfusion. *J Neurosci*. 2007;27(19):5249-59. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0802-07.2007.

34. Kahlert S, Zündorf G, Reiser G. Glutamate-mediated influx of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is coupled with reactive oxygen species generation in cultured hippocampal neurons but not in astrocytes. *J Neurosci Res*. 2005;79(1-2):262-71. doi: 10.1002/jnr.20322.
35. Zhang M, Ning G, Shou C, Lu Y, Hong D, Zheng X. Inhibitory effect of jujuboside A on glutamate-mediated excitatory signal pathway in hippocampus. *Planta Med*. 2003;69(8):692-5. doi: 10.1055/s-2003-42786.
36. Savignon T, Costa E, Tenorio F, Manhães AC, Barradas PC. Prenatal hypoxic-ischemic insult changes the distribution and number of NADPH-diaphorase cells in the cerebellum. *PLoS One*. 2012;7(4):e35786. doi: 10.1371/journal.pone.0035786.
37. Olney JW. Excitotoxicity, apoptosis and neuropsychiatric disorders. *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3(1):101-9.
38. Jia J, Hu Y-S, Wu Y, Liu G, Yu H-X, Zheng Q-P, et al. (2009); Pre-ischemic treadmill training affects glutamate and gamma aminobutyric acid levels in the striatal dialysate of a rat model of cerebral ischemia. *Life Sci*. 2009;84(15-16):505-11. doi: 10.1016/j.lfs.2009.01.015.