مقـــاله تحقیقی

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

عالیه کریمی[1]، اکرم عیدی[2]، زهرا نادیا شریفی[3]، شبنم موثقی[3*]

[1] دانشجوی دکتری تخصصی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

[2] استاد، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

[3] دانشیار، گروه علوم تشریحی و علوم اعصاب شناختی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران.

[4] مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران.

* نشانی نویسنده مسئول:

خیابان دکتر شریعتی، خیابان خاقانی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی و علوم اعصاب شناختی، تهران، ایران.

نشانی الکترونیک:
shmovasaghi@iautmu.ac.ir

چکیده

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

روش کار: تحقیق حاضر به‌صورت تجربی- پژوهشی بر روی۲۴ 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 هماتوکسیلین-ائوزین، هیپوکامپ نمونه ها توسط میکروسکوپ نوری بررسی گردید. سلولهای هرمی ناحیه CA۱ هیپوکمپ توسط نرم افزار ۲ image tools شمارش شدند و میانگین آنها منظور گردید.

یافته ها: نتایج به دست آمده از آزمون آماری ANOVA یک‌طرفه و تست Tukey نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تعداد نورون های ناحیه CA۱ هیپوکمپ گروه کنترل و گروه آزمایشی جوجوبوزاید A وجود ندارد.

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

واژه های کلیدی: ایسکمی، هیپوکامپ، عناب، 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 سکته مغزی منجر می‌شود(۲). عوارض سکته مغزی بستگی به محل سکته 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 می نامند که یک علامت هشدار دهنده از یک سکته مغزی احتمالی در آینده است (۳). ایسکمی مغزی بعد از سرطان و سکته قلبی یکی از دلایل عمده مرگ و میر در جهان و اولین عامل از کار افتادگی افراد بالاتر از ۶۵ سال است (۵ و ۴).

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 واکنش 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 تقریبا 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 (۸ و ۷) 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 سکته مغزی و ایسکمی دچار آسیب می‌شود و به ایسکمی و هیپوکسی بسیار حساس می باشد . هیپوکسی در این ناحیه موجب مهار پتانسیل سیناپسی می‌گردد که مکانیسمی برای کاهش انرژی مصرفی سلول در هنگام بروز این عارضه است (۱۱و۱۰).

هسته‌ی خشک عناب (SZS) *Semen Ziziphi Spinosae* 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 به‌عنوان 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 به‌عنوان ضد تشنج و درمان اضطراب و بی‌خوابی در هند به‌صورت داروی عمومی مورد استفاده بوده است (۱۴). در سایر کشورهای آسیایی نیز به‌عنوان درمانگر افسردگی، بی‌خوابی و اضطراب به‌کار 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 (۱۷ و ۱۶). همچنین بهبود دهنده‌ی حملات و استرس اکسیداتیو، افزایش دهنده‌ی خواب القا شده توسط پنتوباربیتال، محافظت‌کننده از آسیب نورونی به‌وجود آمده توسط N-methyl-D-aspartate و کاهش دهنده‌ی آترو اسکلروز بوسیله‌ی مهار شکل‌گیری سلول‌های کفی است (۱۴ و ۲۰-۱۸). جوجوبوزاید A, B دو تری‌ترپن صابونی مهم از اجزای تشکیل دهنده SZS می‌باشند. به غیر از این دو، فلاونوییدها و آلکالوییدهای دیگری هم در عصاره SZS وجود دارند (۱۲).

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

روش کار

تحقیق حاضر به‌صورت تجربی-پژوهشی بر روی۲۴ 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. (۱۴۰۰,۱۸۲.PS.REC

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 ودر پایان مدت موردنظر(۳روز) کشته شدند.

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

گروه آزمایشی: دوز۰ mg/kg ۰/۰۲ ازجوجوبوزاید A (شرکت سیگما

آلدریچ 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 گروه ها ابتدا بیهوش شده و سپس مغز آنها پس از قطع سر توسط گیوتین از جمجمه 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 کرونال بصورت سریال و به ضخامت ۵ و۱۰ میکرون در فاصله ۲/۳ الی ۵ میلیمتر از خلف برگما تهیه شد. مقاطع با ضخامت ۵ میکرون برای رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین 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 هرمی 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 هرمی ناحیه CA۱ هیپوکمپ 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 P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها

رنگ آمیزی H&E

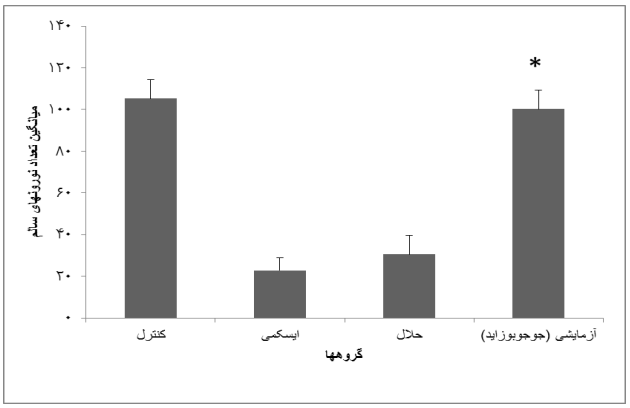
در بررسی نمونه‌های گروه کنترل که به روش H&E رنگ آمیزی شده بودند، مشاهده شد که نورونها در نواحی CA۱ به طور یکنواخت و منظم قرار گرفته اند و به ندرت سلولهای باریک و تیره رنگ با هسته‌های فشرده و تیره (نشانگر نورون‌هایی است که مراحل اضمحلال خود را طی می‌کنند) در لابلای سلولها دیده می‌شوند. بافت هیپوکمپ یکنواخت 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 دربعضی 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

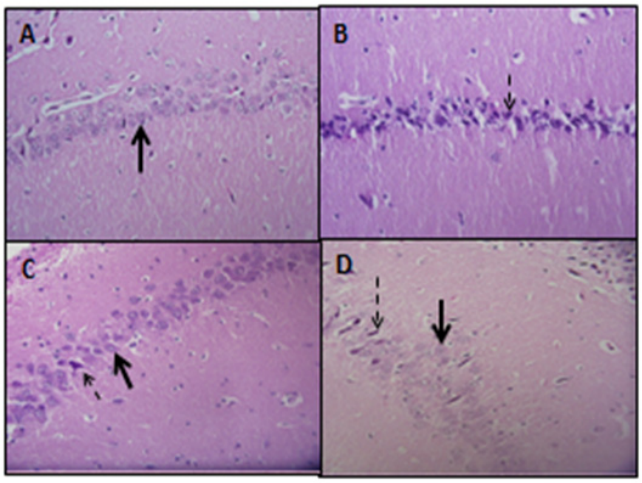
در بررسی برش‌های مورد مطالعه با استفاده از رنگ آمیزی نیسل, سلول هایی که دارای هسته گرد، روشن با ظاهری یوکروماتین و دارای چند هستک بودند به عنوان سلول‌های سالم در نظر گرفته شدند و سلول هایی که هسته آن‌ها متراکم، چند وجهی و هتروکروماتین بود به عنوان سلول‌های دژنره در نظر گرفته شدند (شکل ۲). بررسی داده‌های به دست آمده از تعداد سلولهای هرمی زنده در ناحیه CA۱ هیپوکمپ نشان داد که بستن شریانهای کاروتید مشترک به مدت ۲۰ دقیقه باعث کاهش شدید سلولهای زنده گردیده و میانگین تعداد این سلولها را از ۱۰۵عدد به ۲۲عدد کاهش داده است در صورتیکه این میانگین با تزریق جوجوبوزاید A به۱۰۰عدد 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 (P=۰/۷۶۲ معنی دار نبود (نمودار ۱).

بحث

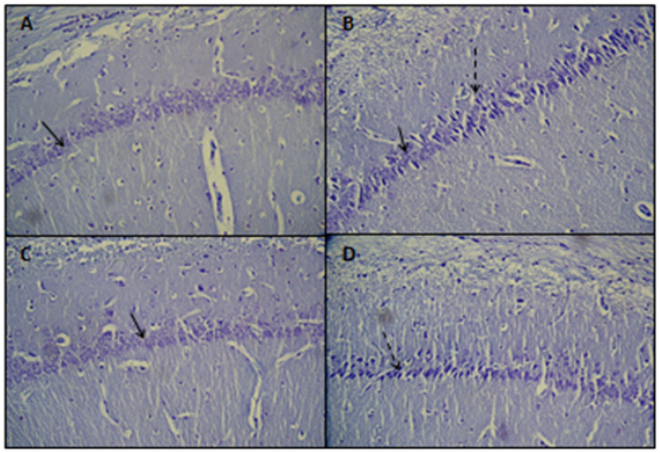
تا کنون مطالعه ای در مورد اثر نوروتروفیک هسته خشک عناب و اجزاء آن نظیر جوجوبوزاید بر روی ناحیه CA۱ هیپوکمپ متعاقب ایسکمی- رپرفیوژن فراگیرگذرا صورت نگرفته است ولی در سال‌های اخیر به نقش آنتی اکسیدان‌ها در جلوگیری از عوارض ناشی از آسیب‌های مغزی پس از بروز سکته‌های مغزی توجه خاصی شده است (۲۳ و ۲۲) همچنین 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 هرمی زنده در گروه ها.
* و + : نشان دهنده اختلاف معنی‌دار گروهها با یکدیگر است.



شکل ۱– فتومیکروگراف از ناحیه CA۱ هیپوکمپ گروههای آزمایشیA : گروه کنترل، B : گروه ایسکمی، C : گروه آزمایشی (جوجوبوزاید (D ، A : گروه حامل (نوک پیکانهای پیوسته سلولهای سالم و نوک پیکانهای 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 (جوجوبوزاید (D ، A : گروه حامل (نوک پیکانهای پیوسته سلولهای سالم و نوک پیکانهای منقطع، سلولهای پیکنوتیک را نشان می دهد). رنگ آمیزی نیسل ، بزرگ نمایی ۴۰۰×۴۰۰×

آزاد سازی و سطح نوروترانسمیترهای آمینه‌ای 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 عناب به علت اثرات آنتی‌اکسیدانی و نوروپروتکتیو خود می‌تواند 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 می‌رسد که حضور جوجوبوزاید A به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی از ایجاد رادیکال‌های آزاد جلوگیری کرده و به دلیل خاصیت آن در مقابله با استرس اکسیداتیو، اثرات محافظتی خود را بر روی سلول‌های هرمی ناحیه هیپوکمپ اعمال می‌نماید.

مطالعه حاضر نیز نشان داد که تزریق جوجوبوزاید A؛ قبل از ایسکمی- رپرفیوژن مغزی سبب بروز اثرات حفاظتی بر روی سلول‌های هرمی ناحیه CA۱ هیپوکمپ شد. رنگ آمیزی نیسل در این مطالعه نشان داد که ۲۰ دقیقه ایسکمی- رپرفیوژن مغزی سبب افزایش سلول‌های دژنره در ناحیه CA۱ هیپوکمپ شده و تزریق جوجوبوزاید A توانسته است از میزان شدت بروزآنها 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 کاملا روشن نیست اما انتظار می‌رود که به دلیل وجود خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی این ماده، جوجوبوزایدA بتواند از تشکیل رادیکال‌های آزاد در مغز متعاقب ایسکمی-رپرفیوژن فراگیرگذرا ممانعت به عمل آورد.

مکانیسم مهم دیگری که در ایسکمی مغزی سبب بروز ضایعات بیشتر می‌شود ایجاد التهاب پس از بروز ایسکمی مغزی می‌باشد و حضور عوامل التهابی می‌تواند برتشدید ضایعات تاثیر مستقیم بگذارد (۲۸). همچنین مطالعات نشان داده اند که به دلیل وجود اثرات ضد التهابی، جوجوبوزاید A می‌تواند با اثر مستقیم برروی التهاب منطقه دچار ایسکمی, نقش محافظتی خود را برسیستم عصبی پس از ایجاد ضایعه مغزی ناشی از ایسکمی- رپرفیوژن القا نماید (۲۱) چند دقیقه بعد از انسداد شریانی، عدم تعادل یونی با نشت غیر طبیعی Na^+ و خروج K^+ همراه می‌گردد که موجب دپلاریزه شدن آنوکسیک گسترده در غشاء نورون‌ها و سلول‌های عصبی هیپوکمپ می‌شود (۲۹) افزایش نفوذ Na^+ به نورون، موجب عدم تعادل در میزان افزایش غلظت Na^+ و توزیع K^+ در سلول میشود (۳۰). بنابراین کاهش تولید ATP که پس از عدم تعادل Na^+ / K^+ به علت (Na^+ / K^+ ATPase) اتفاق می‌افتد کمک می‌کند تا جذب گلوتامات که مهم‌ترین تحریک کننده است، کاهش یابد (۳۱)، این وضعیت ،گیرنده‌های گلوتامات را تحت تاثیر قرار می‌دهد و نفوذ Ca^{2+} افزایش می‌یابد. این مسئله موجب ایجاد یک سری از رویدادهای هسته‌ای و سیتوپلاسمی (تحریک پذیری) می‌شود که منجر به شکست میتوکندری و آپوپتوز میگردد (۳۲ و ۳۳). در همان زمان، نفوذ Ca^{2+} باعث فعال شدن آنزیم‌های کاتابولیک با تولید اسید آراشیدونیک می‌شود و تشکیل گونه‌های اکسیژن واکنشی ROS را به طور عمده در نورون‌ها افزایش می‌دهد که در نتیجه باعث انتقال اسموتیک آب به سلول‌ها شده و منجر به ادم سیتوتوکسیک، لیز سلول و نکروز می‌گردد (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 می‌کند(۳۶). مطالعات قبلی نشان داده اند که افزایش فعالیت و یا نقص فعالیت گیرنده‌های NMDA در بسیاری از بیماری‌های 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 احتمالا از طریق عمل آنتی کالمودولینی خود اعمال می‌کند (۳۸).

بنابراین احتمال می‌رود جوجوبوزاید A از طریق مهار فعالیت پروتئین‌های پیش آپوپتوزی و نیز اثر برروی فعالیت گیرنده‌های NMDA اعمال نماید و به واسطه اثر مهاری اش بر مسیر سیگنال دهی گلوتامات و نیز حذف ROS به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالقوه اش، مانع از آسیب بیشتر سلولی در ناحیه CA۱ هیپوکمپ متعاقب ایسکمی- رپرفیوژن گذرا گردد.

نتیجه گیری

از نتایج آنالیز آماری داده‌های حاصل از این مطالعه این طور استنباط می‌شودکه تزریق جوجوبوزاید A قبل از ایسکمی- رپرفیوژن مغزی با کاهش آسیب میتوکندری و کاهش عوامل و فاکتورهای التهابی سبب بروز اثرات نوروتروفیک بر روی سلول‌های هرمی ناحیه CA۱ هیپوکمپ می‌گردد.

منابع

1. Hadjinikolaou, L. Kotidis, K. Galinanes, M. Relationship between reduced elasticity of extracardiac vessels and left main 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. ActaNeurol Scand. 2011; 123(3):147-59.

3. Easton JD, Albers GW, Alberts 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 Intervation; 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 eurologists. Stroke. 2009; 40(6):2276-93. doi: 10.1161/strokeaha.108.192218

4. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-poore 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. Ca2+ 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 oretical 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 Suanzaorenhehuan 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-a-induced NF-κB activation and adhesion molecule expression in endothelial cells through inhibition of IkBalpha 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 Ziziphi Spinosae ameliorates behavioral disorders of the dementia mouse model induced by Aβ 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 Cε/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 Ziziphi 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 Ca2+ 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.