فصلنامه (علمی – پژوهشی)
زیست شناسی تکوینی
سال دهم، شماره ۴، پاییز ۱۳۹۷

بررسی اثر نوروتروفیک آنتاگونیست گیرنده Neurokinin 1 بر روی سلول‌های هرمی ناحیه CA1 موش صحرایی نر نژاد ویستار متعاقب ضابعات ناشی از ایسکمی /رپرفیوژن

شروین افتخاری[۱]، شبنم موثقی[۲]، امیر قاسمی[۱]، زهرا نادیا شریفی[۲*]

[۱] دانشکده پزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲] گروه علوم تشریحی و علوم اعصاب شناختی، دانشکده پزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[*] Email: Zsharifi@iautmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۳/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۳۱

چکیده

ایسکمی /رپرفیوژن (I/R) مغزی یک عامل بحرانی است که منجر به پیش آگهی ضعیف بیماران مبتلا به سکته مغزی ایسکمیک می‌شود. التهاب ناشی از ماده P بعنوان عامل تضعیف کننده ای بر اثر نوروپروتکتیو-Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR-γ) گزارش شده است. این مطالعه، به بررسی اثر اپرپیتانت، آنتاگونیست گیرنده نوروکینین ۱ در آسیب (I/R) مغزی ناشی از انسداد دوطرفه شریان‌های مشترک کاروتید پرداخته است.۲۴ راس موش صحرایی نر نژاد ویستار به ۴ گروه کنترل، ایسکمی، حامل و آزمایشی تقسیم شدند. القاء ایسکمی توسط بستن دو طرفه شریان کاروتید مشترک صورت گرفت. تزریق داروی اپرپیتانت (۴۰ میلی گرم/ کیلوگرم) ۲ بار، ۱ ساعت پیش ویک ساعت بعد از رپرفیوژن انجام شد.۷۲ ساعت بعد از القائ ایسکمی، مغز موش‌ها خارج و جهت رنگ آمیزی نیسل آماده گردید. نتایج نشان داد که تعداد سلول‌های هرمی زنده ناحیه CA1 هیپوکامپ گروه ایسکمی تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل دارد در صورتی‌که این تفاوت بین گروه‌های آزمایشی و کنترل معنی‌دار نبود. می‌توان چنین نتیجه گرفت که اپرپیتانت می‌تواند موجب کاهش ضایعات بافتی متعاقب ایسکمی گردد بنابراین می‌تواند جزء درمان‌های آسیب (I/R) مغزی قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: آپوپتوز، ایسکمی، اپرپیتانت، نوروپروتکتیو.

مقدمه

سکته مغزی،شایع ترین بیماری نورولوژیک تهدید کننده زندگی و سومین علت مرگ و میر در سراسر جهان است [۴,۲۶]. ایسکمی حالتی است که مغز یا بخش‌هایی از آن جریان خون کافی برای حفظ عملکرد نورولوژیکی دریافت نمی‌کنند. در ایسکمی مغزی که ۸۵ تا ۹۰ درصد از موارد سکته مغزی را شامل می‌گردد [۱۸]، جریان خون مغزی به دلیل

انسداد عروق خونی قطع و یک پروسه بسیار پیچیده در سطح سلولی و بافتی شروع می‌شود که اصطلاحاً آبشار ایسکمی نامیده می‌شود [۶,۵]. عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و توانایی سلول‌ها برای دفاع در مقابل آنها استرس اکسیداتیو نامیده می‌شود که نهایتاً منجر به آسیب بافتی و بروز سکته ایسکمیک می‌شود [۲۶].

با توجه به شدت ایسکمی در بافت مغز، سلول‌های عصبی توسط دو مکانیسم آپوپتوز و نکروز دچار مرگ سلولی می‌شوند به طوری که در نواحی دچار ایسکمی شدید سلول‌ها نکروتیک می‌شوند که همراه است با از دست دادن هوموستازی کلسیم و گلوتامات در سلول و در نواحی با ایسکمی خفیف سلول‌ها دچار آپوپتوز می‌شوند که به فعال شدن توالی‌های ژنی خاصی وابسته است [۱۲, ۲۴, ۲۳].

هیپوکامپ به ایسکمی و هیپوکسی بسیار حساس است. این ناحیه از مغز توسط شریان کروئیدی قدامی که شاخه‌ای از کاروتید داخلی می‌باشد، خونرسانی می‌شود. شریان فوق به علت بلند و نازک بودن مستعد ترومبوز است. بنابراین هیپوکامپ جزو اولین مناطقی از مغز است که در بیماری‌های مغزی مثل ایسکمی، ترومای مغزی و آلزایمر دچار آسیب می‌شود [۸]. هیپوکسی در این قسمت باعث مهار پتانسیل سیناپسی می‌شود که مکانیسمی برای کاهش انرژی مصرفی سلول در حالت هیپوکسی است. صدمه به هیپوکامپ بعد از ایسکمی – ریپرفیوژن باعث اختلالات فراوانی در عملکرد این عضو می‌شود. با توجه به این که ناحیه هیپوکامپ منطقه‌ای کلیدی در فرآیند یادگیری و حافظه است، مطالعه این ناحیه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد، درعین حال ناحیه CA1 هیپوکامپ حساسترین ناحیه هیپوکامپ به ا یسکمی می‌باشد[۱].

اخیرا استفاده از آنتاگونیست‌های گیرنده‌های نوروکنین و ماده P بعنوان یکی از استراتژی‌های مناسب و جدید بعنوان نروپروتکتور (حفاظت کننده عصب) مورد ملاحظه قرار گرفته است. این خانواده از داروها بصورت بالقوه دارای اندیکاسیون های درمانی متنوعی مانند درمان درد، التهاب، تهوع و استفراغ است.

اهمیت آنها در پیشرفت و تکامل پروتکتورها از آنجا ناشی شد که ملاحظه گردید بعضی از گروه‌های داروهای فوق الذکر مانند اپرپیتانت (Aprepitant) دارای خاصیت حفاظتی می‌باشند. نقش‌های عملکردی وسیعی در ارتباط با این دارو و خاصیت ضد التهابی آن شناخته شده است [۱۵,۲۵]. اپرپیتنت که قادر است از سد خونی – مغزی عبور کند ، اثر خود را از طریق مهار کردن گیرنده نوروکینین ۱ اعمال می‌کند [۹] از آنجایی‌که تاکنون ، تحقیقات اندکی در رابطه با اثر نوروتروفیک این ماده انجام شده، در این تحقیق به بررسی اثر نوروتروفیک اپرپیتانت بر روی ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ موش صحرایی نر نژاد ویستار، متعاقب ایسکمی/رپرفیوژن فراگیرگذرا می‌پردازیم.

مواد و روش انجام کار

حیوانات آزمایشگاهی:

این مطالعه تجربی بر روی ۲٤ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم خریداری شده از انستیتو پاستور تهران در دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران انجام شد. حیوانات تحت شرایط استاندارد با دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و دمای ۳ ±۲۱ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و دسترسی کامل به آب آشامیدنی و غذای کافی داشتند. این مطالعه با تصویب کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه

علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران و رعایت اصول کنوانسیون هلسینکی در مورد کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شده است.

گروه‌بندی حیوانات:

۲٤ سر موش‌های صحرایی به صورت تصادفی در چهار گروه شش تایی به شرح زیر قرار گرفتند:

الف) گروه کنترل : حیوانات توسط کتامین – زیلازین بیهوش و تحت استرس جراحی بدون مسدود کردن شریان‌های کاروتید مشترک قرار گرفتند.

ب) گروه ایسکمی: در این گروه به منظور القای ایسکمی، شریان‌های کاروتید مشترک هر دو طرف به طور همزمان به مدت ۲۰ دقیقه مسدود شده و سپس مجدداً جریان خون برقرار گردید.

ج) گروه آزمایشی: در این گروه تزریق داروی آپرپیتانت Aprepitant (شرکت داروسازی دکتر عبیدی – ایران) با دوز 40 mg/kg بصورت داخل صفاقی (IP=intraperitoneal) یک ساعت قبل و یک ساعت بعد از ایسکمی انجام شد.

د) گروه حامل یا vehicle: تزریق ماده CMC (Carboxymethylcellulose) بعنوان حلال دارو بصورت داخل صفاقی یک ساعت قبل و یک ساعت بعد از ایسکمی انجام شد.

به منظور ایجاد مدل ایسکمی – ریپرفیوژن، ابتدا با استفاده از مخلوط ۱۰۰ mg/kg کتامین (شرکت دارو پخش، ایران) و ۱۰ mg/kg گزیلازین (شرکت دارو پخش، ایران)، حیوانات بیهوش شده بر روی تخت جراحی فیکس شدند و تحت شرایط استریل در قسمت قدامی گردن برشی به اندازه ۱/۵ –۱ سانتی‌متر داده شد. شریان‌های کاروتید مشترک هر دو طرف در معرض دید قرار گرفتند و با استفاده از کلمپ‌های مخصوص میکروسرجری به مدت ۲۰ دقیقه مسدود گردیدند سپس کلمپ‌ها برداشته شد تا مجدداً جریان خون برقرار گردد.

٤ روز پس از القاء ایسکمی، مغز موش‌های صحرایی از طریق پرفیوژن قلبی بصورت اولیه فیکس شدند و پس از قطع سر توسط گیوتین ،از جمجمه خارج و بدرون محلول فیکساتیو پارافرمالدئید ٤٪ منتقل شدند.

رنگ‌آمیزی نیسل

این رنگ آمیزی برای نشان دادن اجسام نیسل در سیتوپلاسم نورون‌ها به کار می‌رود. در این روش، اجسام نیسل به رنگ بنفش – آبی دیده می‌شوند. رنگ آمیزی نیسل برای شناسایی ساختار پایه‌ای نورون‌های سالم از نورون‌های دژنره در بافت مغز و طناب نخاعی استفاده می‌شود [۱۶].

پس از ثبوت و آماده سازی بلوک های پارافینی، مقاطع کورونال با استفاده از دستگاه میکروتوم به ضخامت ۱۰µ در فاصله ۲/۳ الی ۵ میلی‌متر از خلف برگما تهیه و بر روی لام‌های ژلاتینه شده منتقل و توسط روش نیسل رنگ آمیزی شدند.

نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ٤۰۰× بررسی شدند و فقط نورون‌های هرمی شکل که هسته و هستک واضح و مشخص داشتند، به عنوان سلول های سالم در نظر گرفته شدند. از هر نمونه ۸ فتومیکروگراف تهیه شد که سه فتومیکروگراف بطور تصادفی انتخاب و سلول‌های هرمی توسط نرم‌افزار image tools 2 شمارش شدند و میانگین آنها محاسبه گردید.

روش تحلیل داده‌ها:

داده‌های گروه‌های مختلف، جمع‌آوری و مرتب شده و با استفاده از نرم‌افزار۲۲ SPSS موردبررسی قرار گرفتند. جهت آنالیز آماری از روش) Way-One ANOVA آنالیز واریانس یکطرفه استفاده شد و از آزمون Tukey جهت مقایسه بین گروه‌ها استفاده شد. در تمامی محاسبات P ≥ ۰,۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. همهٔ اطلاعات بر اساس SEM±Mean نشان داده شدند. نمودارها توسط برنامه نرم‌افزاری Excel رسم گردید.

یافته‌ها

رنگ‌آمیزی نیسل

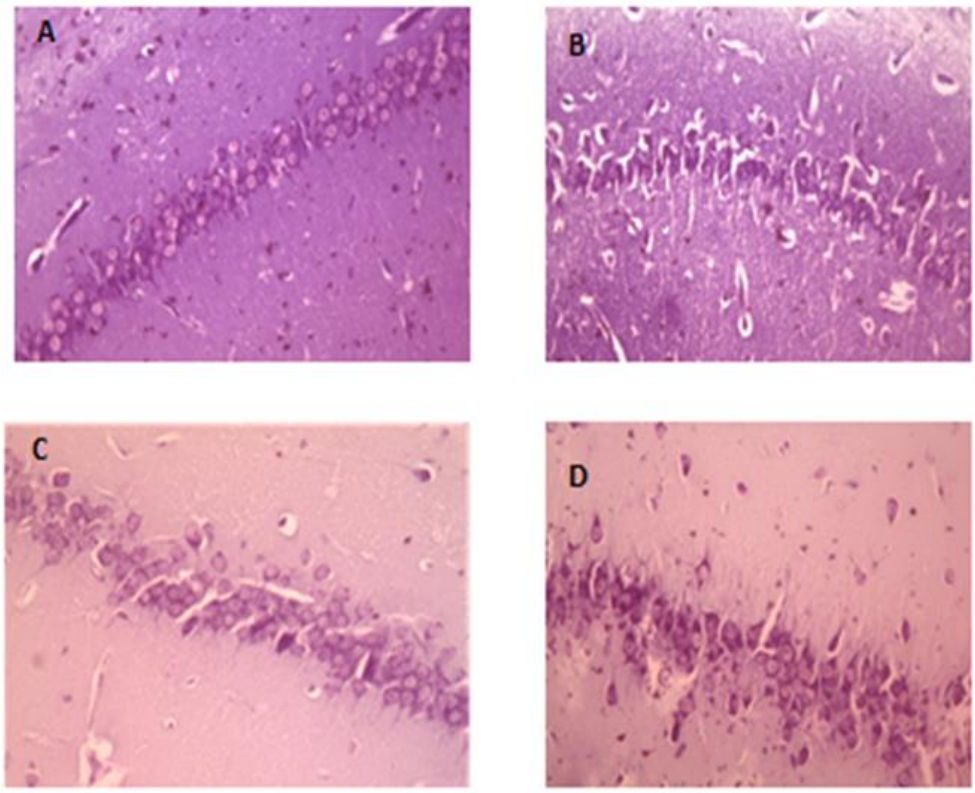
از رنگ آمیزی کرزیل ویوله (نیسل) برای شمارش سلول‌های هرمی ناحیه تحت بررسی استفاده شد. این بررسی‌ها نشان داد که بستن شریان‌های کاروتید مشترک به مدت ۲۰ دقیقه باعث کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ گردیده بطوریکه میانگین تعداد این سلول‌ها در گروه کنترل (۹۰ عدد) و در گروه ایسکمی (۲٤ عدد) بود. در صورتیکه درحیوانات درمان شده با اپرپیتانت، مرگ سلولی کمتر و تراکم سلولی بیشتری در مقایسه با گروه ایسکمی دیده شد (۷۵ عدد). از لحاظ تعداد سلول‌های هرمی سالم بین گروه کنترل و ایسکمی تفاوت معنی‌دار (P≤0/05) و بین گروه کنترل و آزمایشی تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید (P=0. 089). این تفاوت بین گروه ایسکمی و گروه حامل نیز معنی‌دار نبود. (P= 0.242) (شکل ۱ و نمودار ۱)

بحث

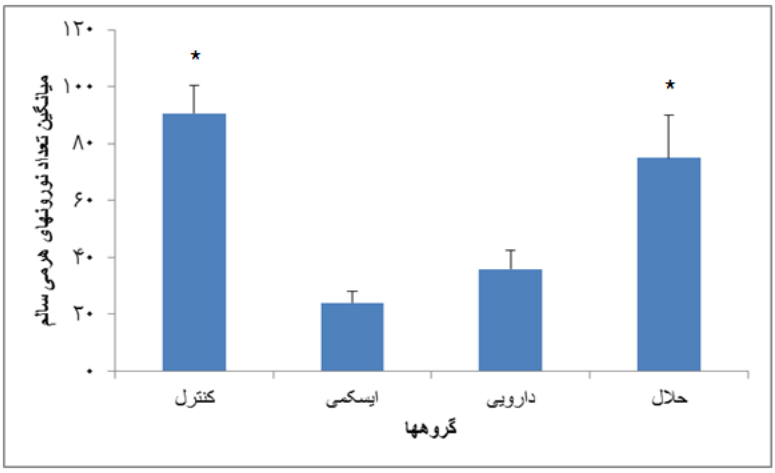
بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه مشخص شد که انسداد دو طرفه شریان کاروتید مشترک به مدت ۲۰ دقیقه منجر به آسیب سلولی گسترده در نورون‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ شده و تعداد آنها کاهش قابل‌ملاحظه‌ای را متعاقب مرگ تأخیری نورون‌ها نشان دادند. این انسداد موجب کاهش جریان خون مغز بدلیل اختلال عملکرد عروق و ایسکمی گردیده و متعاقبا موجب افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و در نتیجه فعال شدن مسیرهایی میشود که منجر به مرگ سلولی در نواحی حساس دستگاه عصبی مانند ناحیه CA1 هیپوکامپ می‌شود [۲,۱۹]. رادیکال‌های آزاد تولیدشده در جریان فرآیند ایسکمی/ خونرسانی مجدد (رپرفیوژن) با آسیب رساندن به نورون‌های ناحیه‌ی هیپوکامپ باعث اختلال در یادگیری و حافظه‌ی احترازی و کوتاه مدت می‌شوند [۲۸]. ضایعات بافتی که در اثر ایسکمی به وقوع میپیوندند، نتیجه یک سری وقایع پاتوفیزیولوژی هستند که موجب افزایش غلظت گلوتامات وتحریک گیرنده‌های گلوتامات به خصوص NMDA می‌شود که بنوبه خود منجر به افزایش کلسیم داخل سلولی و در نتیجه مرگ سلولی می‌گردد [۱۱]. سلول‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ بسیار حساس بوده و به سرعت نسبت به ایسکمی واکنش نشان میدهند [۲۲]. این سلول‌های هرمی در یادگیری و حافظه نقش کلیدی داشته و تخریب آنها می‌تواند باعث اختلالاتی در این زمینه شود [۱۷]. در تحقیق حاضر به نظر می‌رسد عملکردی مشابه با آنچه که شرح داده شد میتواند باعث مرگ سلول‌های هرمی ناحیه CA1 شود.

ارزیابی تعداد سلول‌های زنده و سالم ناحیه CA1 هیپوکامپ توسط رنگ‌آمیزی نیسل که روش رنگ‌آمیزی اختصاصی بافت‌های عصبی است، انجام شد. بستن شریان‌های کاروتید مشترک به مدت ۲۰

دقیقه موجب کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد نورون‌های سالم در ناحیه CA1 هیپوکامپ گردید که با نتایج Duan و همکاران در سال ۲۰۱۱ که اختلال و ضایعات هیپوکامپ را ناشی از انسداد شریان کاروتید ذکر کرد، همخوانی دارد [۷]. این یافته‌ها همچنین همسو با نتایج مطالعات قبلی است که که افزایش مرگ سلولی را متعاقب القای ایسکمی در موش‌های صحرایی عنوان می‌کند [۱۴].



شکل ۱ – فتومیکروگراف از مقاطع کرونال از ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرایی.
گروه A: گروه کنترل گروه B: گروه ایسکمی گروه C: گروه آزمایشی (اپرپیتانت) گروه D: گروه حلال
رنگ آمیزی نیسل (کرزیل ویوله) بزرگنمایی x400



نمودار –۱ تعداد سلول های سالم ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه های مختلف آزمایشی.
*** اختلاف معنی دار با سایر گروه ها ($P \leq ۰,۰۵$)**

اخیرا استفاده ازآنتاگونیست‌های گیرنده‌های نوروکنین و ماده P بعنوان یکی از استراتژی‌های مناسب و جدید بعنوان نروپروتکتور (حفاظت کننده عصب) مورد ملاحظه قرار گرفته است [۱۳,۱۵].

تداخل عمل ماده P (substance P) با گیرنده گامای فعال کننده تکثیر پراکسی زوم‌ها (PPAR) ثابت شده است. ماده P احتمالا قادر است سطح این گیرنده را کاهش داده و این امر به نوبه خود موجب کاهش اثر حفاظتی بر روی نورون‌های زنده از طریق کاهش سطح واسطه‌های پیش التهابی و افزایش سطح بیان کولین استیل ترانسفراز می‌گردد [۳۰,۳۱].

همچنین گزارش شده است که آگونیست‌های PPAR قادراند از طریق مهار سنتز سیتوکین‌های التهابی ، نیتریک اوکساید و پروستاگلاندین‌ها موجب تنظیم التهاب شوند[۳].

این مطالعه نشان داد که تزریق داخل صفاقی اپرپیتانت یک ساعت قبل و یکساعت بعد از ایسکمی موجب کاهش سلول‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ نمی‌گردد.

ماده P توسط گیرنده نوروکینین ۱ از طریق راه‌های مختلف مانند استرس اکسیداتیو و ضایعات میتوکندری موجب ضایعات سلولی می‌گردد [27]. بنابراین استفاده از داروی اپرپیتانت بعنوان آنتاگونیست گیرنده NK1 می‌تواند موجب بهبود ضایعات بافتی گردد.

در بررسی فوق ، تجویز اپرپیتانت یکساعت قبل و بعد ایسکمی توانست از میزان ضایعات بافتی بکاهد. بر طبق فرضیه کولینرژیک، اختلال حافظه که در نتیجه ضایعات هیپوکامپ بوقوع می‌پیوندد در نتیجه اختلال در عملکرد سیستم کولینرژیک مغز است. استیل کولین استراز آنزیمی است که باعث تجزیه استیل کولین می‌گردد [۲۱].

ایسکمی ناشی از انسداد دو طرفه شریان‌های کاروتید مشترک سطح TBARS (واکنش پذیری اسید باربیتوریک) را در مغز و شریان کاروتید افزایش داده [۱۰] و موجب کاهش قابل ملاحظه‌ای در میزان آنتی‌اکسیدان می‌گردد که در نتیجه عملکرد ماده P می‌باشد. احتمالا تجویز اپرپیتانت می‌تواند موجب کاهش سطح TBARS در مغز و شریان کاروتید شده و سطح گلوتاتیون مغز را افزایش دهد.

ایسکمی همچنین می‌تواند موجب افزایش سطح نیتریت و افزایش نفوذپذیری عروق خونی و نتیجتاً التهاب گردد [۲۹] . در ضایعات سیستم عصبی تجویز اپرپیتانت بعنوان یک ماده ضد التهاب می‌تواند بطور قابل ملاحظه‌ای ازطریق کاهش میزان نیتریت موجب کاهش التهاب گردد [۲۰]. بنابر این با توجه به تحقیقات انجام شده توسط دانشمندان مختلف و مقایسه‌ی نتایج به دست آمده با مطالعه حاضر چنین نتیجه گیری میشود که اپرپیتانت از طریق مهار ماده P می‌تواند بعنوان یک گزینه در درمان ضایعات ایسکمی مغزی مورد استفاده قرار گیرد گرچه مطالعات بیشتری برای تأیید این فرضیه مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی:

بدین وسیله از تمامی کسانی که در انجام این پایان نامه تحقیقاتی یاری رسان بوده‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

[1] Butler TL, Cheryl A, Kassed PR, Alison EW, Keith R. 2002. Neurodegeneration in the rat hippocampus and striatum after middle cerebral artery occlusion. J Brain Research; 929(2): 252–60.

[2] Carod-Artal FJ, Egido JA. 2009. Quality of life after stroke: the importance of a good recovery. Cerebrovasc Dis; 27:204-14
[3] Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, Ianaro A, Maffia P, Patel NS, Di Rosa M.2004. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisomeproliferator-activated receptor-c, reduces acute inflammation. Eur j pharmacol; 483 (1):79–93.
[4] Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM.2008. Stroke. Lancet; 371:1612- 23.
[5] Douglas L, Tayseer C, Hamid R. 2009. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. Transplant Rev (Orlando); 23:1-10
[6] Duan W, Chun-Qing Z, Zheng J, Gui L, Huang HQ, Chen KN. 2011. Relief of carotid stenosis improves impaired cognition in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. Acta Neurobiol Exp (Wars); 71 (2): 233-43.
[7] Durai PJ. 2009. Re-canalization in acute ischemic stroke: The strategies. Neurol India; 57:20-7.
[8] Eichenbaum H. 2004. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. Neuron; 44(1):109–20.
[9] Garcia-Recio S, Gascón P. 2015. Biological and Pharmacological Aspects of the NK1-Receptor. Biomed Res Int; 495704.
[10] Ghoneim AI, Abdel-Naim AB, Khalifa AE, El-Denshary ES. 2002. Protective effects of curcumin against ischaemia/reperfusion insult in rat forebrain. Pharmacol Res; 46: 273– 9.
[11] Grasshoff C, Gillessen T. 2005. Effects of propofol on N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium increase in cultured rat cerebrocortical neurons. Eur J Anaesthesiol; 22: 467-70.
[12] Hakim A. 1999. Physiology and pathology of cerebral ischemia. Rev Neurol (Paris); 155: 631-7.
[13] Harford-Wright E, Lewis KM, Ghabriel MN, Vink R. 2014. Treatment with the NK1 antagonist emend reduces blood brain barrier dysfunction and edema formation in an experimental model of brain tumors. PloS one; 9(5): e 97002.
[14] Hong JT, Ryu SR, Kim HJ, Lee JK, Lee SH, Kim DB et al. 2000. Neuroprotective effect of green tea extract in experimental ischemia-reperfusion brain injury. Brain Res Bull; 53(6):743-9.
[15] 15- Kaur J, Sharma S, Sandhu M, Sharma S. 2016. Neurokinin-1 receptor inhibition reverses ischaemic brain injury and dementia in bilateral common carotid artery occluded rats: possible mechanisms. Inflammopharmacology; 24 (4): 133-43.
[16] 16- Kiernan JA, 1999. Histological and histochemical methods: Theory and Practice. 2nd edition. New York: Pergamon press.
[17] Movassaghi S, Nadia Sharifi Z, Soleimani M, Joghataii MT, Hashemi M, Shafaroodi H et al. 2012. Effect of Pentoxifylline on Ischemia induced Brain Damage and Spatial memory Impairment in Rat. Iran J Basic Med Sci; 15(5): 1083-90.
[18] Prabal D, Suash S, Hassan KM. 2010. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. Pathophysiol; 17: 197-218.
[19] Rabiei Z, Bigdeli MR and Asadi M. 2013. The Effect of dietary virgin olive oil on brain lipid levels and brain edema in rat stroke models. J. Zanjan Univ. Med. Sci; 21: 56-64.
[20] Rosso M, Munoz M, Berger M .2012. The role of neurokinin-1 receptor in the microenvironment of inflammation and cancer. Sci World J; 381434.
[21] Saxena A, Fedorko JM, Vinayaka CR, Medhekar R, Radic´ Z, Taylor P et al. 2003. Aromatic amino-acid residues at the active and peripheral anionic sites control the binding of E 2020 (Aricept_) to cholinesterases. Eur J Biochem; 270: 4447–58.
[22] Sharifi ZN, Abolhassani F, Zarrindast MR, Movassaghi S, Rahimian N, Hassanzadeh G. 2012. Effects of FK506 on Hippocampal CA1 Cells Following Transient Global Ischemia/Reperfusion in Wistar Rat. Stroke Res Treat; 809417.
[23] Steven H, Robert W. 2009. Molecular pathophysiology of stroke. Neuropsychopharmacol; 5: 132-9.
[24] Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A. 1999. Intrathecal expression of proteins

regulating apoptosis in acute stroke. Stroke; 30: 321-7.

[25] Tebas P, Spitsin S, Barrett JS, Tuluc F, Elci O, Korelitz JJ et al. 2015. Reduction of soluble CD163, substance P, programmed death and inflammatory markers: phase 1B trial of aprepitant in HIV-1-infected adults. AIDS; 15; 29(8): 931-39.

[26] Toole JF. 1999. Brain infarction: Pathophysiology, clinical feature and management cerebrovascular disorders. 5 th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.

[27] Wang Q, Simonyi A, Li W, Sisk BA, Miller RL, Macdonald RS et al. 2005. Dietary grape supplement ameliorates cerebral ischemia-induced neuronal death in gerbils. Mol Nutr Food Res; 49: 443-51

[28] Warner DS, Sheng H , Batinic-Haberle .2004. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. J. Exp. Biol; 207 (18): 3221-31.

[29] Wu WC, Chai CY. 2004. Nitric oxide release in the nucleus tractus solitarius during and after bilateral common carotid artery occlusion. Clin Exp Pharmacol Physiol; 31: 152–8.

[30] Xiang GQ, Tang SS, Jiang LY, Hong H, Li Q, Wang C et al .2012. PPARc agonist pioglitazone improves scopolamine-inducedmemory impairment in mice. J Pharm Pharmacol 6: 589–96.

[31] yagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S. 2011. The peroxisome proliferator-activated receptor: a family of nuclear receptors role in various diseases. J Adv Pharm Technol Res; 2(4): 236–40.