Arshive of SID

فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال نهم، شماره ۳، تابستان ۱۳۹۶

بررسی تأثیر زمان‌های مختلف ایسکمی/ریپرفیوژن بر روی سلول‌های گیروس دندانه‌ای هیپوکامپ موش صحرایی نر نژاد ویستار

زهرا نادیا شریفی*، شبنم موثقی، زهرا کرمانیها، فهیمه عرفاتی، امیر قاسمی

گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* Email: Zsharifi@iautmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۱۸

چکیده

سکته مغزی مهمترین نتیجه ایسکمی مغزی است و ریپرفیوژن متعاقب آن موجب تولید رادیکال‌های آزاد شده که می‌تواند موجب آپوپتوز گردد. سلول‌های گیروس دندانه‌ای از مناطق حساس به ایسکمی است. هرچه زمان بین ایسکمی و ریپرفیوژن بیشتر باشد، مراحل حفظ سلول از آسیب اکسیداتیو و آپوپتوز کارایی کمتری خواهد داشت. از آنجائیکه تعیین درصد و میزان تخریب بافتی نقش مهمی در بررسی اثر حفاظتی داروهای حفاظت کننده عصبی دارد، لذا ما در این مطالعه به بررسی مدت زمان مناسب ایسکمی جهت استفاده از داروهای حفاظت کننده عصب در مدل‌های ایسکمی حیوانی پرداختیم. در این مطالعه تجربی، ۳۰ رأس رت نر نژاد ویستار در ۶ گروه در فاصله های زمانی۳۰-۲۰-۱۵-۱۰-۵ دقیقه ایسکمی مورد ارزیابی قرار گرفتند. مدل ایسکمی توسط بستن دو طرفه شریان‌های کاروتید مشترک القا شد و سپس ریرفیوژن صورت گرفت. پس از ۴ روز مغز موش‌ها بیرون آورده شده و به منطور رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین و نیسل آماده گردید. یافته‌های ما نشان داد که تعداد سلول‌های دژنره با هسته‌های پیکنوتیک بخصوص در گروه ایسکمی ۳۰ دقیقه افزایش یافته و تعداد سلول‌های گرانولار سالم گیروس دندانه‌ای بطور معنی‌داری درگروه‌هایی که تحت ایسکمی ۱۵، ۲۰ و ۳۰ دقیقه قرار گرفته بودند، کاهش یافته بود. به نظر می‌رسد مناسب‌ترین زمان برای بررسی اثر داروها در مدل ایسکمی، زمان بیش از ۱۰ دقیقه می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: ایسکمی/ریپرفیوژن، گیروس دندانه‌ای، موش صحرایی، هیپوکامپ.

مقدمه

امروزه ایسکمی مغزی، معضلی جهانی است که بعد از انفارکتوس قلبی و سرطان در رتبه سوم عمده‌ترین علل مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته محسوب می‌شود [۳] و همچنین جزء شایع‌ترین دلایل مرگ و میر در بیماران مغز و اعصاب می‌باشد [۱]. سکته مغزی ناشی از نرسیدن موقت یا دائم جریان خون به بخشی از مغز است که سبب تولید مقادیر بالایی ازROS و RNS می‌شود [۲]. این امر می‌تواند برروی Signaling تأثیر گذاشته و باعث مرگ برنامه

www.SID.ir

Arshive of SID

ریزی شده سلولی (آپوپتوز) گردد [۲۰]. نواحی مشخصی از مغز و انواع خاصی از نورون‌ها مانند نورون‌های مناطق مختلف هیپوکامپ نسبت به ایسکمی مغزی حساس‌تراند که البته علت آن نیز بیشتر بودن پروتئین‌های دخیل در فرآیند آپوپتوز در این ناحیه می‌باشد [۱۰, ۶].

امروزه در ایجاد مدل ایسکمی مغزی به دلیل مزیت‌های فراوانش مانند: کنترل شرایط استاندارد و متغییرهایی چون زمان و موقعیت ایسکمی از مدل‌های حیوانی جهت مطالعات پاتوفیزیولوژی این بیماری استفاده می‌شود [۱۷].

با این وجود هرچه زمانی که از ایسکمی می‌گذرد طولانی‌تر باشد و ریپرفیوژن با تأخیر بیشتری آغاز شود، میزان تأثیر برسلول‌های ایسکمیک بیشتر می‌گردد و اقدامات حفاظتی کارایی کمتری خواهند داشت [۱۳].

از آنجائیکه مطالعات فراوانی در زمینه‌هایی مانند مدت زمان‌های مختلف بین ایسکمی و ریپرفیوژن، میزان تخریب بافتی در این مدت و همچنین زمان مناسب استفاده از داروهای محافظت کننده سیستم عصبی صورت گرفته اما نیاز به مطالعات فراوان دارد، لذا برآن شدیم تا در این مطالعه به بررسی تأثیر زمان‌های مختلف ایسکمی /ریپرفیوژن برروی سلول‌های گیروس دندانه‌ای هیپوکامپ موش صحرایی بپردازیم.

مواد و روش ها

حیوانات

در این مطالعه تجربی، ۳۰ رأس موش صحرایی ویستار نر به وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. حیوانات در شرایط استاندارد آزمایشگاهی (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و درجه حرارت ۲۴°-۲۲ نگهداری شدند. آب و غذا به مقدار کافی در دسترس موش‌ها قرار گرفت و نکات اخلاقی در بررسی‌های حیوانی رعایت شد.

گروه‌های آزمایشی

حیوانات به شکل تصادفی به شش گروه مساوی تقسیم‌بندی شدند و در فاصله‌های زمانی مختلف (۵-۱۰-۱۵-۲۰-۳۰) دقیقه ایسکمی بترتیب زیر مورد ارزیابی قرار گرفتند

گروه شاهد: رت‌ها توسط پنتوباربیتال سدیم بیهوش شدند. (۴۰ mg/kg)

گروه‌های آزمایشی ۵-۱: بعد از بیهوشی، شریان‌های کاروتید مشترک دو طرف به مدت ۵ و۱۰و۱۵,۲۰و۳۰ دقیقه بسته شدند و سپس ریپرفیوژن انجام شد.

پس از ٤ روز حیوانات تحت بیهوشی ذبح شده و به منظور بررسی بافتی با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین و نیسل، مغز تمامی آن‌ها از جمجمه خارج شد.

روش جراحی

به منظور ایسکمی مغزی، در ابتدا رت‌ها توسط تزریق داخل صفاقی پنتوباربیتال سدیم (۴۰ mg/kg) بیهوش شدند. یک برش عمودی در ناحیه قدامی گردن حیوان ایجاد شد. با کنار زدن عضله جناغی-چنبری- پستانی، شریان‌های کاروتید مشترک در هر دو سمت در معرض دید قرار گرفت و پس از جدا کردن عصب واگ، شریان‌ها توسط کلامپ میکروسرجری به مدت ۳۰-۲۰-۱۵-۱۰-۵ دقیقه) بسته شدند. سپس

www.SID.ir

Arshive of SID

کلامپ‌ها برداشته شده و گردش خون مجدداً برقرار گردید. در طول مدت جراحی درجه حرارت مقعدی حیوان مرتباً توسط ترمومتر اندازه گیری و با استفاده از لامپ گرمایی درجه حرارت در ۳۷± ۰,۵°C تثبیت شد. برش ایجاد شده توسط نخ بخیه دوخته شد و حیوانات تا موقع بهوش آمدن و تثبیت وضعیت، تحت نظر قرار گرفته و بعد از جراحی بمدت ۲٤ ساعت در قفس‌های جداگانه نگهداری شدند.

بررسی بافتی

٤ روز پس از ایسکمی ریپرفیوژن، حیوانات توسط دوز بالای کتامین و زایلازین به طور عمیق بیهوش شدند و مغز آنها به روش پرفیوژن توسط پارافرمالدئید ٤٪ فیکس و سپس از جمجمه خارج شد و برای ثبوت بهتر در محلول پارافرمالدئید ٤٪ به مدت سه روز قرار داده شد و پس از آماده سازی بافتی بلوک‌های پارافینی در مقاطع کرونال و بصورت سریال و به ضخامت ۵ (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین) و ۱۰ (رنگ‌آمیزی نیسل) میکرون در فاصله 2.3-5mm از خلف برگما برش داده و رنگ‌آمیزی شدند. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ٤۰۰× بررسی شدند. از هر نمونه ۸ فتومیکروگراف تهیه شد که سه فتومیکروگراف بطور تصادفی انتخاب و سلول‌های گرانولار گیروس دندانه‌ای هیپوکامپ توسط نرم‌افزار image tools2 شمارش شدند.

تحلیل آماری داده‌ها

داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ١٦ و آزمون آنالیز واریانس یکطرفه مورد بررسی قرار گرفتند. مقایسه بین گروه‌ها با استفاده از آزمون tukey انجام شد و سطح معنی‌داری $P<0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین

بررسی مقاطع با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین نشان داد که در گروه‌های شاهد و آزمایشی ۵ و ۱۰ دقیقه ایسکمی، سلول‌های پر رنگ و پیکنوتیک به ندرت در لایلای نورون‌ها دیده می‌شد، بافت حالت یکنواخت و نرمال داشت و ضایعه خاصی مشاهده نشد. ولی در گروه آزمایشی ۱۵ دقیقه ایسکمی، سلول‌های فشرده و پیکنوتیک بتدریج افزایش یافته در عین حال احتقان عروق نیز در ناحیه گیروس دندانه‌ای هیپوکامپ به چشم می‌خورد. با افزایش زمان ایسکمی به ۲۰ و ۳۰ دقیقه، تعداد سلول‌های تیره و فشرده افزایش یافته بود و تعداد سلول‌های سالم بشدت کاهش یافته و بندرت در لایلای سلول‌های پیکنوتیک مشاهده گردید(شکل ۱).

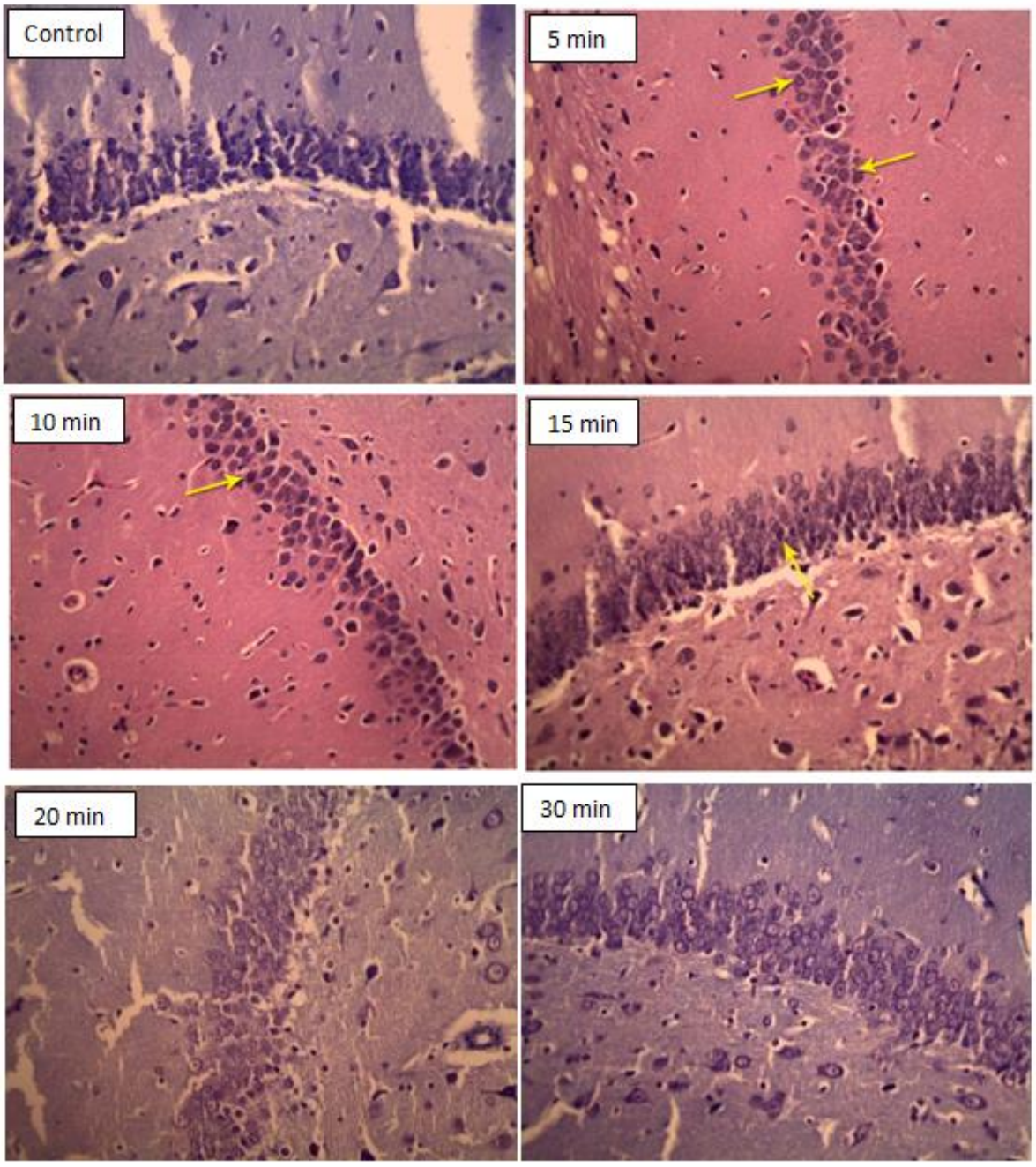
رنگ آمیزی نیسل (Nissl)

بررسی داده‌ها با رنگ آمیزی نیسل نشان داد که بستن شریان‌های کاروتید مشترک به مدت ۵ و ۱۰ دقیقه باعث کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌های گرانولار گیروس دندانه‌ای هیپوکامپ نمیگردد ولی با افزایش مدت زمان ایسکمی، تعداد سلول‌های سالم این ناحیه کاهش و به تعداد سلول‌های ضایعه دیده افزوده شده است به این صورت که از لحاظ تعداد سلول‌های گرانولار گیروس دندانه ای سالم بین گروه شاهد و آزمایشی ۱ (P=0/812) و آزمایشی ۲ (P=0/818) تفاوت معنی‌داری وجود نداشت، درحالیکه از لحاظ

www.SID.ir

Arshive of SID

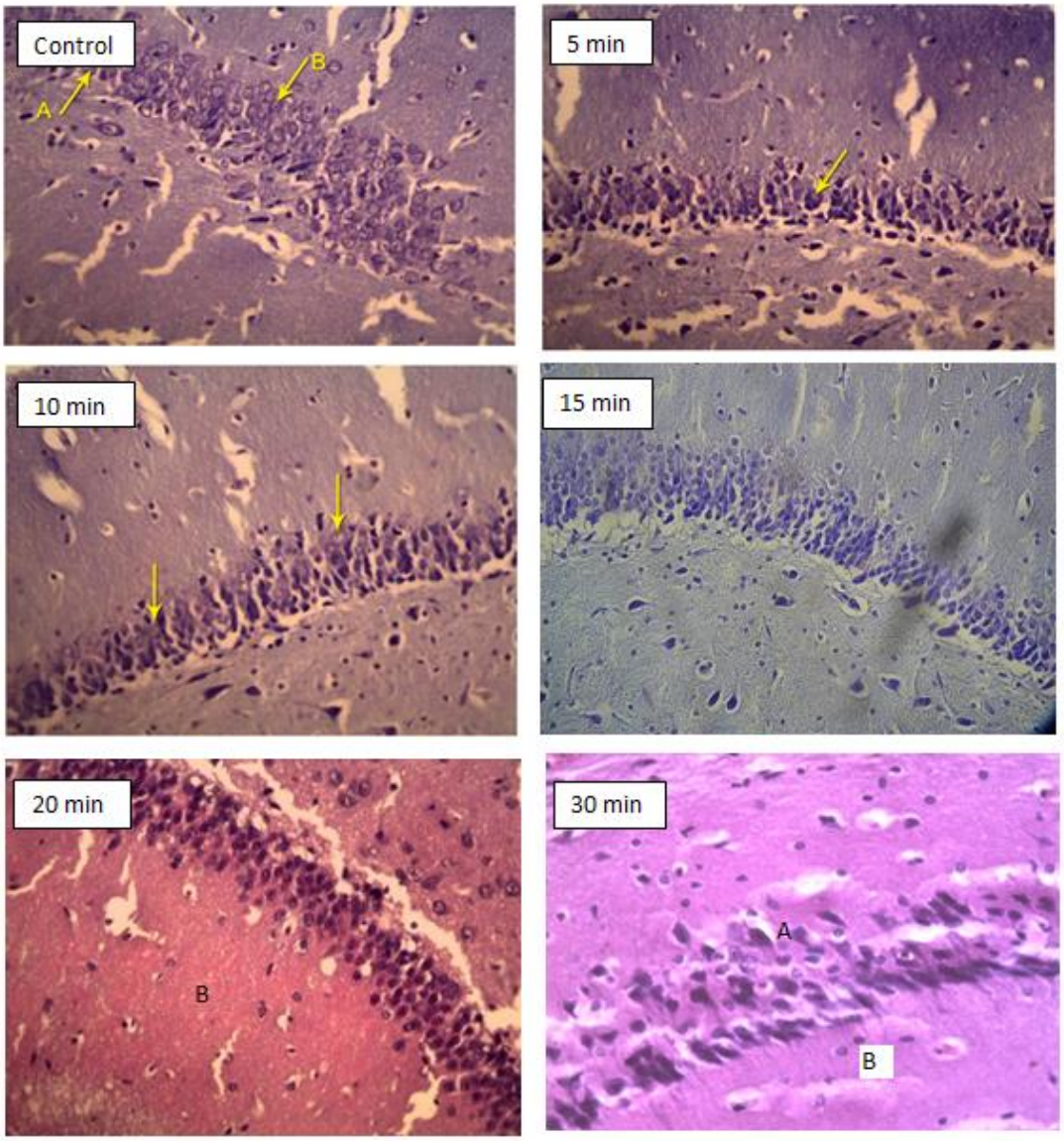
تعداد سلول‌های گرانول سالم گیروس دندانه‌ای بین گروه شاهد و سایر گروه‌ها (غیر از گروه آزمایشی ۱ و۲) تفاوت معنی‌دار وجود داشت. تعداد سلول‌های گرانولار سالم گیروس دندانه‌ای در گروه آزمایشی ۱و ۲ نیز بطور معنی‌داری از سایر گروه‌ها (غیر از گروه شاهد) بیشتر بود (شکل ۲ و نمودار ۱).



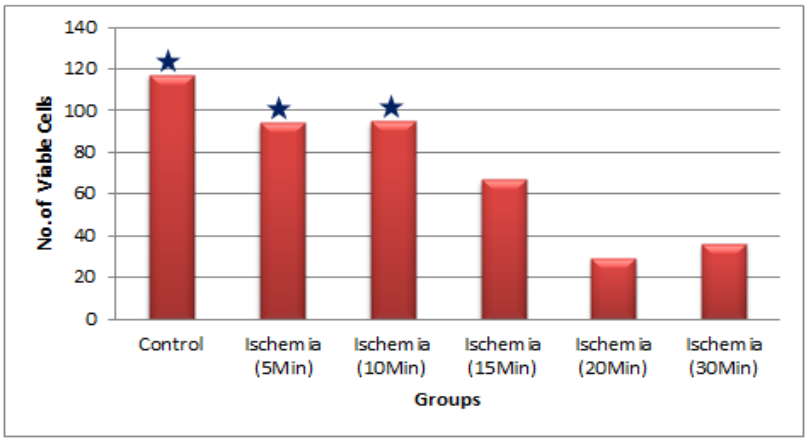
شکل۱- فتومیکروگراف از مقاطع کرونال ناحیه‌ی گیروس دندانه ای هیپوکامپ گروه‌های مختلف آزمایشی. رنگ‌آمیزی H&E. بزرگنمایی 400 × (نوک فلش‌ها یک سلول دژنره را نشان می‌دهد.)

www.SID.ir

Arshive of SID



شکل۲- فتومیکروگراف از مقاطع کرونال گیروس دندانه‌ای هیپوکامپ گروه‌های مختلف آزمایشی. رنگ‌آمیزی nissl. بزرگنمایی 400 × (نوک فلش A یک سلول دژنره و نوک فلش B یک سلول سالم را نشان می‌دهد.



نمودار ۱: ارتباط بین تعداد سلول گرانولار گیروس دندانه‌ای هیپوکامپ را در گروه‌های مختلف آزمایشی نشان می‌دهد.

www.SID.ir

Arshive of SID

بحث ونتیجه‌گیری

گزارشات مختلف حاکی از این است که ایسکمی حاد و رِیپرفیوژن متعاقب آن باعث مرگ سلولی قابل ملاحظه‌ای در پستانداران می‌شود. این ضایعات سلولی بخصوص در ناحیه هیپوکامپ و قشر حرکتی مغز بیشتر خود را نشان می‌دهند [۹-۱۶]. سلول‌های عصبی مغز نیاز به مقدار زیادی اکسیژن دارند بنابراین نورون‌های بالغ نسبت به ایسکمی آسیب‌پذیرتر می‌باشند [۸]. سلول‌های گرانولار گیروس دندانه‌ای هیپوکامپ بسیار حساس بوده و سریعاً نسبت به ایسکمی و کاهش جریان خون عکس‌العمل نشان می‌دهند [۲۱, ۲]. این سلول‌ها در یادگیری و حافظه فضایی نقش کلیدی داشته و تخریب آنها می‌تواند باعث اختلالاتی در این زمینه گردد [۱۸]. ضایعات بافتی که در اثر ایسکمی به وقوع می‌پیوندند، نتیجه یکسری وقایع پاتوفیزیولوژی است که افزایش غلظت گلوتامات را به همراه داشته و متعاقباً گیرنده‌های گلوتامات بخصوص NMDA را تحریک کرده که این امر می‌تواند منجر به افزایش کلسیم داخل سلولی و نتیجتاً مرگ سلولی گردد [۵].

مرگ تأخیری سلول عصبی در هیپوکامپ بعد از ایسکمی فراگیر، ثابت شده است [۷]. تصاویری که از نردبان‌های DNA هسته‌ای بر روی ژل الکتروفورز بدست آمده یک یافته مهم در سلول‌های آپوپتوتیک می‌باشدکه ۱۲ یا ۲۰ دقیقه در رت و ۵ یا ۲۰ دقیقه در gerbil دیده می‌شود [۱۹,۱۲]. امروزه مطالعات وسیعی در جهت شناسایی عوامل موثر در توسعه آسیب ایسکمی مغزی و معرفی روش‌های درمانی جدید صورت می‌گیرد. همانند خیلی از بیماری‌ها، مدل‌های حیوانی سکته مغزی و همچنین مدت زمان‌های مختلفی که ایسکمی ایجاد می‌شود اهمیت بسیاری در شناسایی مکانیزم‌های پاتوفیزیولوژیک و ارائه استراتژی‌های درمانی موثر دارد.

در تحقیق حاضر ما نشان دادیم که ایسکمی/ریپرفیوژن مغزی گذرا به مدت ۱۰ دقیقه ضایعات خاصی را در گیروس دندانه‌ای هیپوکامپ نشان نمی‌دهد و سلول‌های پیکنوتیک بندرت در میان سلول‌های سالم این ناحیه دیده می‌شوند. این یافته‌ها مطابق با یافته‌های Katsuta و همکاران است که عنوان نمودند ایسکمی ۵ دقیقه‌ای باعث افزایش فعالیت‌های لوکوموتور در رت‌های نوع gerbil می‌گردد. او این افزایش را در اثر کاهش حاد نورون‌های هیپوکامپ نسبت به گروه نرمال در اثر مرگ تاخیری سلول‌های عصبی بعد از ٤ روز متعاقب ایسکمی ذکر می کند [۱۴]. همچنین این نتایج با نتایج ما که نشان داد ایسکمی ۱۰دقیقه کاهش معنی‌داری را در این ناحیه بخصوص در هیپوکامپ نشان نمی‌دهد، مغایرت دارد. یافته‌های ما نشان داد که در گروه‌های آزمایشی با مدت زمان بیشتر از ۱۰ دقیقه تعداد سلول‌های فشرده و پیکنوتیک بیشتر شده همچنین احتقان عروقی نیز در این ناحیه خاص از هیپوکامپ نیز دیده می‌شود. با افزایش مدت زمان ایسکمی، بترتیب تعداد سلول‌های سالم این ناحیه کاهش و به تعداد سلول‌های ضایعه دیده افزوده شده است و به این ترتیب این گروه کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان دادند.

یافته‌های ما در ارتباط با بررسی سلول‌های گیروس دندانه‌ای هیپوکامپ بعد از ۱۰ دقیقه ایسکمی نشان داد که تغییرات دژنراتیو سلول‌های گیروس دندانه‌ای در این ناحیه بیشتر شده و تعداد سلول‌های سالم این ناحیه نیز بطور معنی‌داری کاهش یافته است. این یافته‌ها مطابق با یافته‌های Radenovic در سال ۲۰۱۱ است. او با القاء ایسکمی/رپرفیوژن به مدت ۵- ۱۰ و

www.SID.ir

Arshive of SID

۱۵دقیقه و بلاک کردن گیرنده NMDA عنوان می‌کند که ضایعات نورونی ۲۸ روز بعد از القاء ایسکمی به مدت ۱۰ دقیقه بخصوص در نواحی CA3 و استریاتوم بسیار جدی می‌باشد [۴]. نتایج ما همچنین با نتایج Wang همخوانی دارد. او گزارش نمود ۱۰ دقیقه ایسکمی باعث تخریب نورون‌های هیپوکامپ به میزان ۸۵/۸٪ گردیده و عنوان می‌نماید که این میزان تخریب موجب اختلال در یاد گیری و حافظه فضایی می‌گردد [۱۱]. در مطالعه‌ای که Sun و همکاران در چین انجام دادند و نتایج آن در سال ۲۰۱۱ منتشر شد، اعلام گردید که هرچه زمان ایسکمی /رپرفیوژن طولانی‌تر شود، میزان تأثیر داروهای نوروپروتکتیو کاهش می‌یابد و بهترین زمان کمتر از ۲ ساعت می‌باشد.

یافته‌های ما در ارتباط با رت‌هایی که به ۳۰ دقیقه ایسکمی دچار شده بودند نیز مطابق با یافته‌های Walker و همکاران است که عنوان می‌کنند، ۳۰ دقیقه ایسکمی و ریپرفیوژن متعاقب آن باعث ضایعات معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل می‌شود، بود [۱۵].

نتایج این تحقیق نشان داد که ایجاد ایسکمی موجب دژنره شدن و کاهش سلول‌های گرانولار گیروس دندانه‌ای سالم هیپوکامپ می‌گردد و در ایسکمی ۳۰ دقیقه ای این میزان به بیش از ۹۰ درصد می‌رسد. از آنجایی که هر چه زمانی که از ایسکمی بافتی می‌گذرد طولانی‌تر باشد و ریپرفیوژن با تاخیر بیشتری آغاز شود میزان تاثیر بر سلول‌های ایسکمیک بیشتر شده و مراحل حفظ کننده سلول از آسیب اکسیداتیو و آپوپتوز کارایی کمتری خواهند داشت. بنابر این برای بررسی میزان اثر حفاظتی و نورون زایی مواد و داروهای خاص، مدل ایسکمی بیش از ۱۰ دقیقه و ریپرفیوژن متعاقب آن پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی و سپاس خود را از همکاران مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران ابراز می‌دارند.

منابع

[۱]. خضری پ، شریفی ن، شفارودی، انصاریان، غزل، موثقی. ۲۰۱٤. بررسی اثر داروی پنتوکسی فیلین بر روی اختلالات حافظه فضایی ناشی از ایسکمی/ریپرفیوژن فراگیر گذرا در فاز استروس موش‌های صحرایی ویستار ماده. فصلنامه علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران؛ ۱(۲٤) : ۱٤-۲۱.

[۲]. زمانی، شاهی ح، سلیمانی، زمانی، چوبین. ۲۰۱۲. تأثیر مصرف روغن زیتون بر کاهش عوارض سکته مغزی با تمرکز بر ناحیه هیپوکامپ. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران؛ ۷(۲): ۱-۸.

[۳]. فرهاد ا، محمد ص، حمید ب، رعنا ع. عوامل خطر سکته مغزی خاموش در مبتلایان به سکته مغزی ایسکمیک.

[4]. Bancroft JD, Gamble M. 2008.Theory and practice of histological techniques: Elsevier Health Sciences

[5]. Bendel O, Bueters T, von Euler M, Ögren SO, Sandin J, von Euler G. 2005. Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism; 25 (12): 1586-95.

[6]. Davis JN, Antonawich FJ. 1997. Role of apoptotic proteins in ischemic hippocampal damage. Annals of the New York Academy of Sciences; 835 (1): 309-20.

www.SID.ir

Arshive of SID

[7]. de Souza Pagnussat A, Faccioni-Heuser MC, Netto CA, Achaval M. 2007. An ultrastructural study of cell death in the CA1 pyramidal field of the hippocapmus in rats submitted to transient global ischemia followed by reperfusion. Journal of anatomy; 211 (5): 589-99.

[8]. Lee P, Sata M, Lefer DJ, Factor SM, Walsh K, Kitsis RN. 2003. Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology; 284 (2): H456-H63.

[9]. Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S-i, Hatano O, Kawahara N, et al. 2002. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. Cell; 110 (4): 429-41.

[10].Roberts GG, Di Loreto MJ, Marshall M, Wang J, Degracia DJ. 2007. Hippocampal cellular stress responses after global brain ischemia and reperfusion. Antioxidants & redox signaling; 9 (12): 2265-76.

[11].Sasaki T, Kitagawa K, Sugiura S, Omura-Matsuoka E, Tanaka S, Yagita Y, et al . 2003. Implication of cyclooxygenase-2 on enhanced proliferation of neural progenitor cells in the adult mouse hippocampus after ischemia. Journal of neuroscience research; 72 (4): 461-71.

[12].Shimizu H, Ohgoh M, Ikeda M, Nishizawa Y, Ogura H. 2007. Caspase-3-like protease activity-independent apoptosis at the onset of neuronal cell death in the gerbil hippocampus after global ischemia. Biological and Pharmaceutical Bulletin; 30 (10): 1950-3.

[13].Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Kim GW, Saito A, Hayashi T, et al. 2004. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. NeuroRx; 1 (1): 17-25.

[14].Sun J, Li Y, Fang W, Mao L. 2011. Therapeutic time window for treatment of focal cerebral ischemia reperfusion injury with xq-1h in rats. European journal of pharmacology; 666 (1): 105-10.

[15].Volpe BT, Wessel TC, Mukherjee B, Federoff HJ. 1995. Temporal pattern of internucleosomal DNA fragmentation in the striatum and hippocampus after transient forebrain ischemia. Neuroscience letters; 186 (2): 157-60.

[16].Wang J, Liu S, Fu Y, Wang JH, Lu Y. 2003. Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors. Nature neuroscience; 6 (10): 1039-47.

[17].White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, et al. 2000. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. Journal of the neurological sciences; 179 (1): 1-33.

[18].Xu Z, Xu R, Liu B, Jiang X, Huang T, Ding L, et al. 2005. Time window characteristics of cultured rat hippocampal neurons subjected to ischemia and reperfusion. Chinese journal of traumatology= Zhonghua chuang shang za zhi/Chinese Medical Association; 8 (3): 179-82.

[19].Yang J-P, Liu H-J, Yang H, Feng P-Y. 2011. Therapeutic time window for the neuroprotective effects of NGF when administered after focal cerebral ischemia. Neurological Sciences; 32 (3): 433-41

[20].Zhang Y, Zhang X, Park TS, Gidday JM. 2005. Cerebral Endothelial Cell Apoptosis after Ischemia—Reperfusion: Role of PARP Activation and AIF Translocation. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism; 25 (7): 868-77.

[21].Zhao K, Zhao G-M, Wu D, Soong Y, Birk AV, Schiller PW, et al. 2004. Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. Journal of Biological Chemistry; 279 (33): 34682-90.

www.SID.ir