Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 29, No.4, Winter 2019 ORIGINAL ARTICLE

Bad gene expression following effect of coenzyme Q10 on Wistar rat hippocampus with cerebral ischemia

Farnoosh Kazemi Asafeh[1], Maliheh Entezari[2], Maryam Shirvani Shahenayati[1]
[1]MSc in Molecular Genetics, Department of Biology, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran
[2]Associate Professor, Department of genetics, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background: Q10 coenzyme is a potent antioxidant in the mitochondrial membrane. Releasing the oxygen free radicals occurs in the cerebral ischemia. Using Q10 coenzyme causes strength against oxidative after injury of cerebral ischemia during reperfusion. Also CoQ10 plays an important anti-apoptotic role to reduce Caspase 3 as a key enzyme neuroprotective in apoptosis. According to the sensitive nature of CA1-Hypocampus pyramidal neurons against the cerebral ischemia, we studied the effects of CoQ10 in this area of rat`s brain after transient general ischemia/ reperfusion.
Materials and methods: We selected randomly 24 heads of Wistar rats under 250-300 g weights that divided into 4 groups, including control, experiment (ischemia, Q10), ischemia and Q10 coenzyme groups. Then we separated the hippocampus from the brain expression of pro-apoptosis genes was studied. After extraction of RNA and synthesis of cDNA, we used real time RCR methods to express this gene.
Results: The expression of Bad gene in experiment group (Q10, 10mg/Kg) significantly decreased compared to ischemia group ($p<0.05$).
Conclusion: It seems that ischemia caused to increase the expression of Bad pro-apoptic gene, and CoQ10 with dose of 10mg/Kg has effects on the expression of Bad gene and prevent the severity of lesions.
Keywords: *CoQ10, Apoptosis, Hippocampus, Real Time PCR.*

Cited as: Kazemi Asafeh F, Entezari M, Shirvani Shahenayati M. Investigation of Bad Gene Expression Following Coenzyme Q10 Effect with Ischemia in Wistar Rat Hippocampus. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2019; 29(4): **296-302.**

Correspondence to: Maliheh Entezari
Tel: *+98 9127796007*
E-mail: mentezari@iautmu.ac.ir
ORCID ID: 0000-0003-4191-3351
Received: 3 Dec 2018; **Accepted:** 26 Feb 2019

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۹، شماره ۴، زمستان ۹۸، صفحات ۲۹۶ تا ۳۰۲

Original Article

بررسی تغییر بیان ژن Bad متعاقب تاثیر کوآنزیم Q10 پس از ایسکمی مغزی در هیپوکامپ موش صحرایی ویستار نر

فرنوش کاظمی اسفه[1]، ملیحه انتظاری[2]، مریم شیروانی شاه عنایتی[1]

[1] کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران
[2] دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی ، علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *کوآنزیم کیوتن، آنتی اکسیدانی قوی در غشاء داخلی میتوکندری است. پس از ایسکمی مغزی، آزاد سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن اتفاق می‌افتد. استفاده از کوآنزیم کیوتن باعث مقاومت در برابر اکسیداتیو در زمان رپرفیوژن بعد از آسیب مغزی ایسکمیک می‌شود و همچنین با کاهش آپوپتوز نقش آنزیمی حفاظتی عصبی را دارد. از آنجایی که از حساس‌ترین نواحی نسبت به ایسکمی، ناحیه CA_1 هیپوکامپ است. در این مطالعه، اثر حفاظتی کوآنزیم کیوتن بر روی ناحیه CA_1 هیپوکامپ موش صحرایی نر ویستار متعاقب ایسکمی/ رپرفیوژن فراگیر گذرا بررسی شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه، ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم به طور تصادفی انتخاب و به ۴ گروه، شامل گروه کنترل، گروه آزمایشی (ایسکمی/ کیوتن)، گروه ایسکمی، گروه و کنترل کوآنزیم کیوتن تقسیم شدند. در پایان مطالعه هیپوکامپ از مغز جدا شد و تغییرات بیان ژن پیش آپوپتوزی بررسی شد. پس از مراحل استخراج RNA و سنتز cDNA از روش Real time PCR بیان ژن مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *بیان ژن Bad در گروه آزمایشی کوآنزیم کیوتن با دوز ۱۰میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کاهش معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$).*

نتیجه‌گیری: *به نظر می‌رسد ایسکمی باعث افزایش بیان ژن پیش آپوپتوزی Bad می‌شود و کوآنزیم کیوتن با دوز ۱۰میلی گرم بر کیلوگرم با تاثیر بر روی بیان ژن Bad باعث جلوگیری از شدت ضایعات می‌شود.*

واژگان کلیدی: *کوآنزیم Q10، ژن Bax، ایسکمی، هیپوکامپ.*

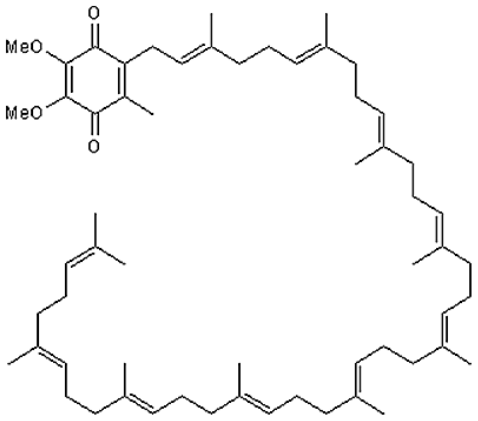
مقدمه

ایسکمی/ رپرفیوژن آسیب بافتی است که پس از یک دو راه ایسکمی یا عدم اکسیژن جریان خون را به بافت بر می‌گرداند. ایسکمی/ رپرفیوژن باعث مرگ سلولی می‌شود که یکی از مشکلات بالینی مهم همراه با نارسایی حاد کلیوی و پیوند کلیه است. مهمترین وقایع آسیب شناسی در جریان ایسکمی عبارتند از عکس‌العمل التهابی بیش از اندازه، تخلیه ذخایر انرژی، آپوپتوز، کاهش جریان خون مغز که منجر به تخلیه ذخایر انرژی سلولی و سایر ترکیبات حاوی اتصالات فسفات پر انرژی می گردد، اختلال در فعالیت پمپ‌های یونی، دپلاریزاسیون‌هایپوکسیک و اسیدوز داخل سلولی به علت متابولیسم بی هوازی، افزایش سدیم، کلسیم و آزاد سازی اسیدهای آمینه، فعال شدن آنزیم‌های کاتالیتیک، تحریک تولید نیتریک اکساید (NO) و آزادسازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن (۱، ۲). لذا تحقیقات در زمینه توسعه درمان‌های

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، گروه ژنتیک، ملیحه انتظاری (email: mentezari@iautmu.ac.ir)
ORCID ID: 0000-000۳-۴۱۹۱-۳۳۵۱
تاریخ دریافت مقاله: ۹۷/۹/۱۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۷/۱۲/۷

حفاظتی عصبی (Neuroprotective) ضروری هستند تا بتوانند به تنهایی یا در ترکیب با درمان‌های دیگر برای پیشگیری و یا بهبود عوارض ناشی از سکته ایسکمیک مورد استفاده قرار گیرند (۳).

کوآنزیم Q۱۰ (یک آنتی اکسیدان لیپوفیل ویژه) یکی از اجزای ضروری زنجیره انتقال الکترون میتوکندری است که به عنوان یک روبنده کننده قوی رادیکال‌های آزاد، در غشاهای لیپیدی و میتوکندریایی مطرح است. فرمول مولکولی CoQ10 $C_{59}H_{90}O_4$، و وزن مولکولی آن ۸۶۳/۳۴ g/mol است (شکل ۱) (۵، ۶).



شکل ۱. ساختار شیمیایی کوآنزیم کیوتن

از آن جایی که به دنبال ایسکمی مغزی، آزادسازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن اتفاق می‌افتد، لذا با ترمیم پیامدهای نامرغوب نورولوژیکی باید آسیب نورونی کاهش یابد (۷) که استفاده از کوآنزیم Q10، مقاومت در برابر اکسیداتیو استرس را باعث می‌شود و انرژی زیستی مغز را در زمان رپرفیوژن بعد از آسیب مغزی ایسکمیک بهبود می‌دهد (۸). استفاده از coQ10 به عنوان یک نوروپروتکتیو با کاهش کاسپاز ۳ نقش یک آنتی آپوپتوز را در سلول ایفا می‌کند (۹). آنتی اکسیدان‌ها نظیر کوآنزیم Q10 می‌توانند درکاهش فعالیت سیتوزولی LDH و سطح +Ca2 که در پی ایسکمی/رپرفیوژن افزایش می‌یابند مؤثر باشند (۱۰). بر این اساس و با توجه به حساس‌تر بودن نورون‌های پیرامیدال ناحیه CA1 هیپوکامپ در برابر ایسکمی مغزی، در این تحقیق به بررسی اثر یوبیکینون بر تغییر بیان ژن Bad مسیر میتوکندریایی آپوپتوزدر ناحیه هیپوکمپ موش صحرایی نر نژاد ویستار،متعاقب ایسکمی/رپرفیوژن فراگیرگذرا پرداخته شد.

مواد و روشها

گروه‌های حیوانات

گروه های حیوانی با رعایت کردن کلیه ا صول اخلاقی کار با حیوانات انتخاب و رت‌ها به وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم به طور تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند: .

۱. گروه کنترل : رت‌ها در شرایط استاندارد آزمایشگاهی نگهداری شده و در پایان مدت موردنظر (۹روز) کشته شدند.

۲. گروه ایسکمی: رت‌ها در روز پنجم، پس از بیهوشی و جراحی، شریان کاروتید آنها به صورت دو طرفه بسته شده تا ایسکمی به مدت ۲۰ دقیقه ایجاد و برقراری مجدد جریان خون متعاقب آن القا شد و بعد از مدت۴روز، رت ها کشته شدند.

۳. از رت‌ها که به مدت ۵ روز، فقط روغن سویا (حلال کوآنزیم Q_{10}) را دریافت کرده بودند، بیهوش شده و با عمل جراحی، شریان کاروتید آنها به صورت دو طرفه بسته شده و ایسکمی به مدت ۲۰ دقیقه و برقراری مجدد جریان خون متعاقب آن، القا شد و به مدت ۳ روز دوباره روغن سویا را دریافت کرده و در روز چهارم بعد از ایسکمی (روز نهم) کشته شدند.

۴. در گروه های آزمایشی تحت درمان با یوبیکینون با دوز ۱۰میلی گرم بر کیلوگرم و دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به مدت ۵ روز کوآنزیم Q_{10} را دریافت کرده و پس از بیهوشی و جراحی، شریان کاروتید آنها به صورت دو طرفه بسته شده و ایسکمی به مدت ۲۰ دقیقه و برقراری مجدد جریان خون متعاقب آن القا شد و به مدت ۳ روز، دوباره کوآنزیم Q_{10} را با دوزهای ذکر شده دریافت و در روز چهارم بعد از ایسکمی (روز نهم)، کشته شدند و هیپوکامپ آنها مورد بررسی قرارگرفت.

استخراج RNA و سنتز cDNA.

پس از برداشت بافت موردنظر از هیپوکامپ رت و نگهداری در ۷۰- درجه سانتی‌گراد، ابتدا اجزای سلولی از محاصره غشایی خارج شد و سپس به روش ترایزول RNA استخراج و برای صحت استخراج RNA از طریق اسپکتروسکوپی کمیت RNA مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت RNA توسط دستگاه Nanodrop در طول موج ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر اندازه گیری شد.

طیف جذبی A 260/280 خلوص (عدم آلودگی با پروتئین) و A 260/230 خلوص (عدم آلودگی با فنل و کلروفرم) بررسی و نمونه‌هایی که ۱/۸≤۲۶۰/۲۸۰ بود برای سنتز cDNA انتخاب و به فریزر ۸۰- انتقال داده شدند. برای ساخت مستر جهت سنتز cDNA طبق دستور کیت شرکت سیناکلوناز استفاده شد.

پرایمرها بـه کمـک نـرم افـزار Generunner و Primer 3 طراحـی شده و در Ncbi، BLAST شـد و از نظـر اختصاصـی بـودن چـک شدند (جدول ۱).

جدول ۱. توالی پرایمر طراحی شده Bad و Gapdh

ژن	توالی پرایمر	دمای ذوب	طول bp	درصد CG
Bad F	GGAGCATCGTTCAGCAGCAG	۵۸/۰	۲۰	۶۰
Bad R	CCATCCCTTCATCTTCCTCAGTC	۵۷/۶	۲۳	۵۲/۲
Gapdh F	AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG	۵۷/۸	۲۲	۵۰
Gapdh R	CATACTCAGCACCAGCATCACC	۵۶/۷	۲۲	۵۴/۶

Real time PCR

ابتـدا cDNA بـا DDW بـه غلظـت ۰/۲ Pmol/µL رقیـق و بـه Master mix، cDNA و پرایمرها اضافه شدند. پلیـت مـورد نظـر را در دسـتگاه Step one plus Real Time قـرار داده و عملکـرد و اختصاصت پرایمرها چک شـدند. ژن Bad بـه عنـوان ژن هـدف و Gapdh به عنـوان ژن مرجـع انتخـاب شـدند. واکـنش RT-PCR برای ژن هدف و مرجع در نمونه‌های کنترل و تست به صورت سـه تایی در پلیت ۹۶ خانه‌ای انجام شد. برنامه زمانی و دمایی واکـنش PCR در دسـتگاه RT PCR مـدل ABI step one plus Real Time PCR مطابق جدول۲ انجام گرفت.

جدول ۲. برنامه زمانی و دمایی PCR

دما	زمان	چرخه
۹۵°	۱۵′	۱
۹۵°	۱۵″	۴۰ تا ۲
۶۴	۶۰″	

در مرحله دوم منحنی ذوب تشکیل شد .مراحل فـوق بـرای عـدم آلودگی و سنجش عملکرد صحیح پرایمرهـا انجـام شـد و پـس از اطمینان از مواد مذکور هر کدام از نمونه‌ها به صـورت جداگانـه بـا پرایمر جهت بررسی بیان ژن در چاهک‌ها در دستگاه قرار گرفتنـد. از NTC (کنترل منفی) برای تائیـد عـدم آلـودگی درحـین انجـام آزمایش استفاده شد. کنترل منفی فاقد cDNA بود.

جدول ۳ برنامه زمانی ودمایی PCR در مرحله دوم برای سـنجش پرایمرها هر کدام از آنها با یک نمونـه کنتـرل مـورد بررسـی قـرار گرفتند و پس از اتمام واکنش Real Time PCR برای اطمینـان از اختصاصی بودن پرایمرهـا و نمـایش طـول قطعـات تکثیـر شـده، نمونه‌ها به ژل پلی آکریل آمید منتقل شدند.

جدول ۳. برنامه زمانی ودمایی PCR در مرحله دوم

دما	زمان (ثانیه)
۹۵	۱۵
۶۰	۶۰
۹۵	۱۵

تحلیل آماری

تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار آمـاری rest جهـت مقایسـه بیـان و نسبت‌ها انجام شد.

یافته‌ها

تایید صحت پرایمر

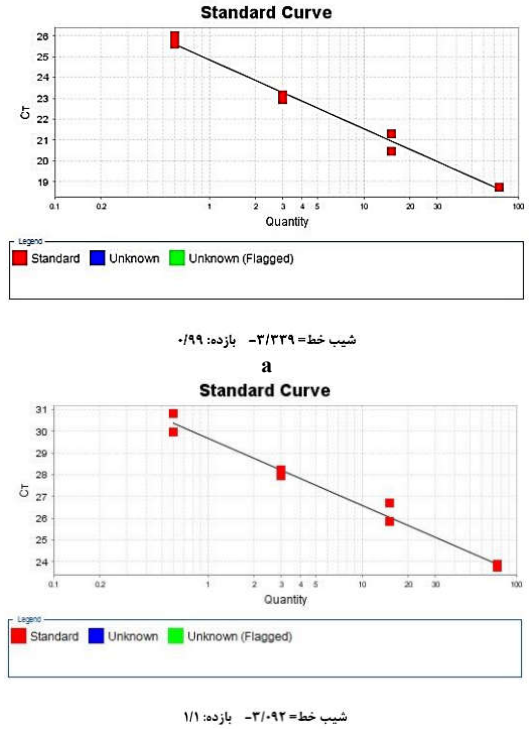
شکل ۲ نشان دهنده طول صحیح وتک باندبودن قطعات تکثیرشده با پرایمرهاست (طول قطعه ژن Bad و طول قطعه Gapdh).

شکل ۲. نتیجه PAGE برای تکثیرنمونه کنترل با پرایمر

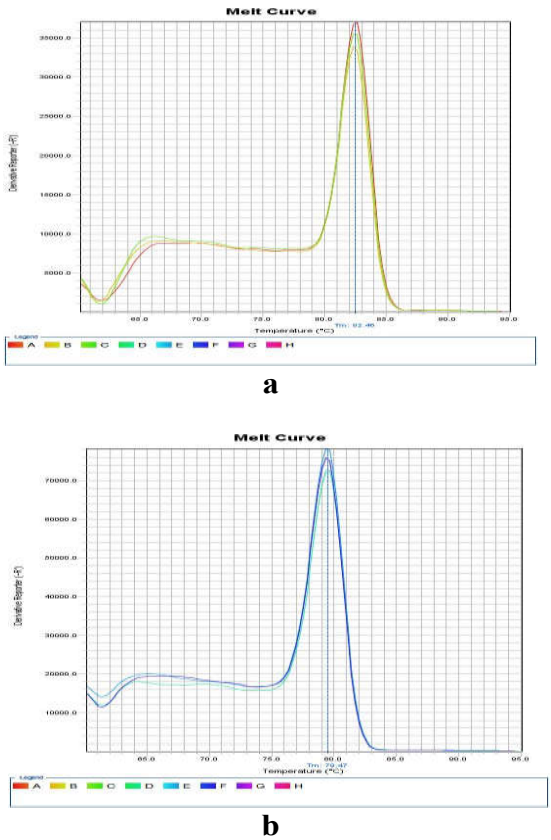
منحنی استاندارد با بازده ۹۹ درصد برای ژن Gapdh و ۱۰۰ درصد برای ژن Bad محاسبه شد (شکل ۳).

آنالیز منحنی ذوب (تفکیک)

منحنی ذوب بیانگر محصولاتی است که طی واکنش PCR تکثیر می‌شوند. به دلیل تک قله‌ای بودن تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مورد نظر، عدم جفت شدن پرایمرها و عدم تکثیر قطعات غیر اختصاصی برای هر ژن با استفاده از منحنی ذوب (تفکیک) تعیین شد. شکل ۴ ذوب مربوط به ژن Bad را به ترتیب در مقایسه با ژن مرجع Gapdh نشان می‌دهد.



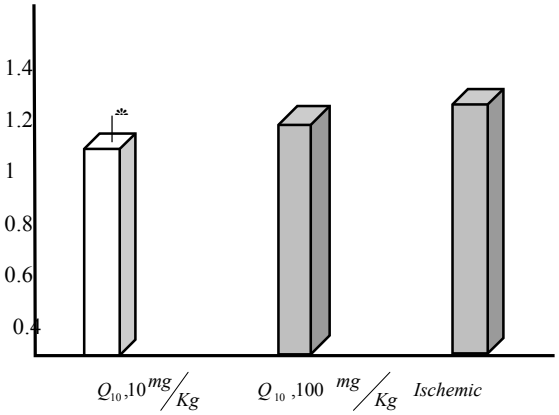
شکل ۳. منحنی استاندارد مربوط به ژن‌های Bad(a) و Gapdh (b)



شکل ۴. منحنی ذوب قطعه تکثیرشده ژن Bad با نقطه ذوب ۷۹/۴۷°C (a) و ژن Gapdh دمای ذوب ۸۲/۴۶°C(b)

بیان ژن Bad و آنالیزهای آماری

نمودار ۱ نتیجه بیان ژن‌های Bad در گروه‌های مختلف نسبت به کنترل را نشان می‌دهد.



نمودار ۱. نسبت بیان ژن BAD درگروه‌های مختلف نسبت به کنترل

بحث

تاکنون استراتژی موثری با معضل ایسکمی پیدا نشده است که این امر شاید به علت کمبود اثر و یا عوارض جانبی دارو است. اخیرا استفاده از یوبیکینون به عنوان یک استراتژی مناسب و جدید در نقش یک نورو پروتکتیو مورد ملاحظه قرار گرفته است (۷).

کوآنزیم Q10 دارویی است که اثبات شده است مقاومت در برابر اکسیداتیو را باعث می‌شود و انرژی زیستی مغز را در زمان رپرفیوژن بعد از آسیب مغزی ایسکمیک بهبود می‌بخشد. از آنجا که افزایش آزاد سازی رادیکال‌های اکسیژن به دنبال ایسکمی مغزی اتفاق می‌افتد، لذا به منظور ترمیم پیامدهای نامرغوب نورولوژیکی و جلوگیری از آسیب نورونی باید این رادیکال‌ها کاهش یابند. کوآنزیم Q10 باعث مقاومت در برابر اکسیداتیو استرس می‌شود و انرژی زیستی مغز را در زمان رپرفیوژن بعد از آسیب مغزی ایسکمیک بهبود می‌دهد که استفاده از این ماده راهی منطقی به نظر می‌رسد. آنتی‌اکسیدان‌ها نظیر کوآنزیم Q10 می‌توانند در کاهش فعالیت سیتوزولی LDH و سطح کلسیم که در پی ایسکمی/ رپرفیوژن افزایش می‌یابند موثر باشند. همچنین در مطالعات حیوانی مشخص شده است آنزیم Q10 با کاهش کاسپاز ۳ باعث کاهش مرگ سلول می‌شود که به عنوان یک نوروپروتکتیو مطرح می‌شود (۶).

ژن Bad یک ژن پیش آپوپتوزی است که مسیر را به سمت آپوپتوز پیش می‌برد و نقش مهمی در آپوپتوتیک شدن سلول دارد. هر گاه بیان ژن پروآپوپتوتیک بیشتر شود به‌این معناست که سلول به سمت آپوپتوز هدایت می‌شود. هیچ گاه نمی‌توان ادعا کرد که به دلیل افزایش ژن Bad آپوپتوز رخ داده است، زیرا عوامل دیگری هم دخیل هستند ولی می‌توان به این نتیجه رسید که یک ژن پیش برنده آپوپتوز است (۱۱).

مشخص شده است با غیرفعال کردن جهش ژن پیش آپوپتوزی Bad فعالیت آپوپتوز کاهش یافته و در نتیجه مرگ سلولی نیز کاهش می‌یابد (۱۲). با بررسی میزان بیان ژن Bad در ناحیهCA1 هیپوکامپ موش صحرایی با استفاده از داروی نوروتوروفیک مشخص شد که بیان ژن BAD بعد ازاستفاده نوروتوروفیک کاهش می‌یابد (۱، ۱۳).

درخصوص نقش اعضای خانواده Bcl2 در آسیب ایسکمیک مغز مشخص شده است که تظاهر مقدار بالای Bcl2 یا افزایش تظاهر سایر اعضای آنتی آپوپتوزی خانواده Bcl2 مثل Bcl xl از آپوپتوز نورونی می‌کاهد. رهایی سیتوکروم C از میتوکندری پس از ایسکمی به علت فعالیت Bax و سایر اعضای پرو آپوپتوتیک خانواده Bcl2 به وجود می‌آید. افزایش سطح Bax به سرعت از سیتوزول به میتوکندری نقل مکان می‌کند (۱۴).

در این مطالعه با بررسی داروی Q10 به عنوان یک ماده حفاظتی بر کنترل بیان ژن Bad، تغییر آپوپتوز در امر ناشی از ایسکمی/ رپرفیوژن تایید شد. نتایج این پژوهش از تاثیر ایسکمی بر افزایش بیان ژن Bad حکایت داشت و داروی Q10 با دوز ۱۰میلی گرم بر کیلوگرم با کاهش بیان ژن Bad از شدت ضایعات جلوگیری کرد.

REFERENCES

1. Badr R, Hashemi M, Javadi G, Movafagh A, Mahdian R. Assessment of global ischemic /reperfusion and Tacrolimus administration on CA1 region of hippocampus: gene expression profiles of BAX and BCL2 genes. Bratisl Lek Listy 2016;117:358-62.

2.Badr R, Hashemi M, Javadi G, Movafagh A, Mahdian R. Gene Expression Profiles of BAD and Bcl-xL in the CA1 Region of the Hippocampus Following Global Ischemic/Reperfusion and FK-506 Administration. Iran Red Crescent Med J 2015;17:e23145.

3. Behroozaghdam M, Hashemi M, Javadi G, Mahdian R, Soleimani M. Expression of bax and bcl2 Genes in MDMA-induced Hepatotoxicity on Rat Liver Using Quantitative Real-Time PCR Method through Triggering Programmed Cell Death. Iran Red Crescent Med J 2015; 26:17:e24609.

4.Ishrat T, Khan MB, Hoda MN, Yousuf S, Ahmad M, Ansari MA, et al. Coenzyme Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. Behav Brain Res 2006; 171: 9-16.

5.Gholnari T, Aghadavod E, Soleimani A, Hamidi GA, Sharifi N, Asemi Z. The Effects of Coenzyme Q10 Supplementation on Glucose Metabolism, Lipid Profiles, Inflammation, and Oxidative Stress in Patients With Diabetic Nephropathy: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. J Am Coll Nutr 2018;37:188-93.

6.Awad AM, Bradley MC, Fernández-Del-Río L, Nag A, Tsui HS, Clarke CF. Coenzyme Q10 deficiencies: pathways in yeast and humans. Essays Biochem 2018;62:361-376.

7.Kalayci M, Unal MM, Gul S, Acikgoz S, Kandemir N, Hanci V, et al. Effect of Coenzyme Q10 on ischemia and neuronal damage in an experimental traumatic brain-injury model in rats. BMC neuroscience. BMC Neurosci 2011;12:75.

8.Horecký J, Gvozdjáková A, Kucharská J, Obrenovich ME, Palacios HH, Li Y, et al. Effects of Coenzyme Q and Creatine Supplementation on Brain Energy Metabolism in Rats Exposed to Chronic Cerebral Hypoperfusion. Curr Alzheimer Res 2011; 8: 868-875.

9.Young AJ, Johnson S, Steffens DC, Doraiswamy PM. Coenzyme Q10: a review of its promise as a neuroprotectant. CNS spectrums 2007; 12: 62-68.

10.Hashemi M. The Study of Pentoxifylline Drug Effects on Renal Apoptosis and BCL-2 Gene Expression Changes Following Ischemic Reperfusion Injury in Rat. Iran J Pharm Res 2014; 13: 181-89.

11.Farahani K, Hashemi M. Investigating the Effect of Hydroalcoholic Extract of Cyperus rotundus L. on the Expression of Bcl-x1 Antiapoptotic Gene in Rats' Hippocampus Tissue Following Global Ischemic-Reperfusion Injury. Acta Medica Iranica 2016;54:256-60.

12.Khazaei Koohpar Z, Entezari M, Movafagh A, Hashemi M. Anticancer activity of curcumin on human breast adenocarcinoma: Role of Mcl-1 gene. Iran J Cancer Prev 2015;8:1-4.

13.Sharifi ZN, Abolhassani F, Zarrindast MR, Movassaghi S, Rahimian N, Hassanzadeh G. Effects of FK506 on hippocampal CA1 cells following transient global ischemia/reperfusion in Wister rat. Stroke Res Treat 2012;2012:809417.

14.Sari S, Hashemi M, Mahdian R, Parivar K, Rezayat M. The effect of pentoxifylline on bcl-2 gene expression changes in hippocampus after ischemia-reperfusion in Wistar rats by a quatitative RT-PCR method. Iran J Pharm Res 2013; 12: 495-501.