

آلكالوئید استروئید های مجزا شده از برگ زیتون آسیب ناشی از ایسکمی مغزی در رت را کاهش می دهند

منصور اسمعیلی دهج^۱، بهرام دلفان^۲، محمد هادی مشکوه السادات^۳، حجت الله اعلائی^۴، اسدالله توکلی^۱، غلامرضا شهسوار^۱، محمد جواد طراح^۱

۱- مربی - عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی لرستان (دانشجوی دکتری فیزیولوژی)

۲- استادیار - عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی لرستان

۳- استادیار - عضو هیئت علمی دانشگاه لرستان

۴- دانشیار دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

یافته / دوره هفتم / شماره ۱ / بهار ۸۴ / مسلسل ۱۴

چکیده

دریافت مقاله: ۸۳/۴/۲، پذیرش مقاله: ۸۳/۷/۲۵

*** مقدمه:** آلكالوئید استروئید های مجزا شده از گونه های گیاهی متعدد به علت خواص فارماکولوژیک متنوع توجه زیادی را به خود جلب کرده اند. در این تحقیق هدف بر این بوده است تا اثرات آلكالوئید استروئید های مجزا شده از برگ زیتون بر ایسکمی مغزی در رت بررسی شود

*** مواد و روش ها:** در این مطالعه آزمایشی ۴۸ رت نژاد ویستار به شش گروه ۸ تایی تقسیم شدند و ایسکمی مغزی بوسیله مسدود کردن شریانهای کاروتید و مهره ای دو طرف به مدت ۱۰ دقیقه ایجاد شد و سپس به مدت ۵ روز بعد از باز شدن شریانها مورد بررسی قرار گرفتند.

*** یافته ها:** تزریق داخل وریدی آلكالوئید استروئید ها ($0.5, 1, 1/5$ mg/kg) اندکس سکنه را کاهش، دامنه الکتروانسفالوگرام (EEG) را افزایش و غلظت لیپید پراکسیداز (LPO) و محتوی کلسیم قشر مغز را به روش وابسته به دوز کاهش دادند؛ اما هیچ تفاوت معنی داری در غلظت سدیم و محتوی آب قشر مغز مشاهده نشد.

*** نتیجه گیری:** این نتایج نشان می دهند که آلكالوئید استروئیدهای مجزا شده از برگ زیتون اثرات محافظتی روی آسیب ایسکمی مغزی -خونسازی مجدد در رت دارند و مکانیسم آن ممکن است با کاهش دادن تجمع کلسیم و پراکسیداسیون لیپیدها ارتباط داشته باشد.

واژه های کلیدی: آلكالوئید استروئید، ایسکمی مغزی، الکتروانسفالوگرام، لیپید پراکسیداز

آدرس مکاتبه: تهران، میدان رسالت، خیابان فرجام، خیابان عبادی شمالی، کوچه شهید صالحی، پلاک ۱۷۸، واحد ۱۱

پست الکترونیک: med1354@yahoo.com

مقدمه

مواد و روش ها

آلکالوئید استروئیدهای مجزا شده از گونه های گیاهی متعدد به علت خواص فارماکولوژیک متعدد توجه زیادی را به خود جلب کرده اند (۱). تعدادی از آلکالوئید استروئیدهای مجزا شده از بعضی گونه های گیاهی موجب کاهش فشار خون در حیوانات آزمایشگاهی مانند رت و خوکچه می شوند (۱). سالیگین، آلکالوئید استروئید مجزا شده از اس. سالیگنا^۱ فعالیت بلاک کننده گانگلیونی و خاصیت کند کنندگی اثر نیکوتین روی فشار خون را دارد (۳). همچنین آلکالوئید استروئیدهای بدست آمده از بعضی گونه های گیاهی فعالیت ضد قارچی قوی دارند (۲). بعضی از این ترکیبات اثرات مهاری روی انتقال و مقاومت چند دارویی در سلولهای سرطانی انسان دارند (۳). گروهی خواص تتراتوژنیک و آنتی تومر (۴) و گروهی نیز از طریق دپلاریزاسیون سلولهای عصبی و ماهیچه ای به وسیله فعال کردن کانالهای سدیمی موجود در غشاء سلول عمل می کنند (۵). سلانیدین، آلکالوئید استروئید موجود در گیاه تاجریری برگ نقره ای است که روی سیستم عصبی عمل می کند (۶).

برگ زیتون که دارای ترکیبات متنوع از جمله آلکالوئید استروئید است، دارای خواص گوناگونی از جمله خواص آنتی باکتریال و آنتی ویرال (۷،۸،۹) فعالیت هیپوگلیسمیک (۱۰) و اثر شل کنندگی عروق (۱۱) است. همچنین بعضی از ترکیبات برگ زیتون خواص آنتی اکسیدانی دارند (۱۲،۱۳). ما پیشنهاد کردیم که این آلکالوئید ها ممکن است کاربرد بالقوه ای در پیشگیری و درمان اختلالات نورولوژیکی ایسکمی حاد داشته باشند.

از این روست که ما اثرات حمایتی آلکالوئید استروئیدهای مجزا شده از برگ زیتون روی آسیب ایسکمی مغزی همراه با خونرسانی مجدد در رت را از طریق ارزیابی، اندکس سکنه، نوار مغزی (EEG) و تغییرات کلسیم، سدیم، آب و لیپید پراکسیداز بررسی کردیم.

این مطالعه یک مطالعه آزمایشی بود که مراحل و عناصر مورد استفاده به شرح ذیل بود:

جداسازی آلکالوئید استروئیدها:

عصاره برگ خشک شده درخت زیتون را به وسیله سوکسله در اتانول استخراج نموده، باقی مانده الکی تغلیظ شده و سپس با اضافه کردن اسید کلریدریک ۳٪ به مدت ۳ ساعت در یخچال نگهداری شدند. به محلول آلی به تدریج آمونیاک اضافه کرده تا به $PH = 8$ و $PH = 12$ برسد. بخش آلی توسط کلروفرم استخراج شد و بعد از چک کردن عصاره با TLC آنها را مخلوط نمودیم و پس از تغلیظ توسط PTLC با استفاده از سیستم $CHCL_3 : MeOH (2 : 7)$ آلکالوئید استروئیدها جدا شدند.

حیوانات:

رتهای نر نژاد ویستار^۳ از مؤسسه انستیتو پاستور ایران به میانگین وزنی ۳۲۰ - ۲۹۰ گرم برای این مطالعه استفاده شده است. رتها به تعداد ۴ تا در هر قفس با یک دوره ۱۲ ساعته تاریکی - روشنایی (روشنایی از ساعت ۶ صبح) و دمای $21^{\circ}C$ در تمام مدت مطالعه نگهداری شدند. بعد از سازگاری با محیط حیوانات به صورت جدول شماره یک تقسیم بندی شدند.

جدول شماره ۱: تقسیم بندی رتها به گروههای متعدد

ردیف	نام گروه	mg/kg دوز دارو	تعداد
۱	sham شاهد یا	سالین ۲۰ ml/kg	۸
۲	*- خون رسانی مجدد ایسکمیک	۲۰ ml/kg سالین	۸
۳	ایسکمیک - خون رسانی مجدد	آلکالوئید استروئید ۰/۵	۸
۴	ایسکمیک - خون رسانی مجدد	آلکالوئید استروئید ۱	۸
۵	ایسکمیک - خون رسانی مجدد	آلکالوئید استروئید ۱/۵	۸
۶	ایسکمیک - خون رسانی مجدد	نیمو دیپین ۱/۵	۸

* (Isc - Rep) Ischemic - Reperfusion

1. S. Saligna
2. stroke index

3. Wistar

القاء ایسکمی مغزی - خونرسانی مجدد :

رتها با پنتوباریتال سدیم ($50 \text{ mg. kg}^{-1} \text{ i.p.}$) بیهوش شدند؛ سپس با تراشیدن موهای ناحیه گردن و ضدعفونی کردن محل (با استفاده از بتادین)، با شرایط استریل و ایجاد یک برش طولی در خط وسط گردن، شریانهای کاروتید مشترک و مهره ای دو طرف را پیدا کرده و به طور همزمان برای مدت ۱۰ دقیقه مسدود شدند. در پایان زمان ایسکمی جریان خون مجدداً برقرار شد. قدرت شریانهای کاروتید برای انتقال خون از طریق مشاهده مستقیم آنها چک شد. در گروه شاهد پروسیژرهای مشابهی انجام شد با این تفاوت که انسداد شریانها صورت نگرفت. درجه حرارت حیوانات در $36/5$ تا $37/5$ درجه سانتیگراد با استفاده از گرمای لامپ در طول بیهوشی حفظ گردید. رت‌ها برای ۵ روز بعد از برگشت از بیهوشی به طور نرمال تغذیه شدند. آلکالوئید استروئید به طور داخل وریدی ($i.v$) برای مدت ۵ دقیقه قبل از ایسکمی و به طور داخل صفاقی ($i.p$) به طور روزانه برای مدت ۵ روز بعد از خون رسانی مجدد تزریق شد.

ثبت آنالیز EEG :

برای ثبت امواج مغزی حیوان دو الکتروود نقره ای روی سخت شامه در نواحی پیشانی - آهیانه ای و پس سری کاشته شد و به اسیلوسکوپ حافظه ای وصل گردید. باید گفت که الکتروود فرانس در ناحیه پس سری قرار داده شد. EEG برای ۵ دقیقه قبل از ایسکمی ۱۰، ۳۰ و ۶۰ دقیقه بعد از خونرسانی مجدد ثبت گردید و درصد دامنه EEG بر طبق فرمول ذیل محاسبه گردید :

$$EEG \text{ دامنه } (\%) = \frac{A \text{ یا } B}{C} \times 100$$

A: دامنه EEG در طول ایسکمی

B: دامنه EEG در طول خونرسانی مجدد

C: دامنه EEG قبل از ایسکمی

تعیین محتوی کلسیم، سدیم و آب کورتکس مغزی :

پنج روز بعد از خونرسانی مجدد به قشر مغز، سر حیوانات برداشته شد و قشر آهیانه ای - گیجگاهی سریعاً برداشته شد و همانطور که توسط یاوند^۱ (۱۶) توصیف شده است در لیوان کواتزی قرار داده شد، وزن گردید و سپس در دمای 100°C به

مدت ۵ ساعت خشک شد و در نهایت مجدداً برای تعیین محتوی آب بر طبق فرمول ذیل وزن شد:

$$100 \times \frac{\text{وزن خشک} - \text{وزن تر}}{\text{وزن تر}} = (\%) \text{ محتوی آب}$$

غلظتهای کلسیم و سدیم قشر آهیانه ای گیجگاهی به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر با جذب اتمیک تعیین گردید (۱۵).

اندازه گیری محتوی لیپیدپراکسیداز :

مغز قدامی (*forebrain*) نیز سریعاً برداشته شد و برای اندازه گیری لیپیدپراکسیداز (*LPO*) با اسید تیوباریتوریک در دمای 30° - درجه ذخیره گردید (۱۶). سطح *LPO* بر حسب nmol/g وزن خشک (*MDA*) (مالون آلدئید) با استفاده از 10 و 30 تترامتوکسی پروپان به عنوان استاندارد خارجی بیان گردید.

مالون دآلدئید تشکیل شده از تجزیه اسیدهای چربی غیر اشباع پلی (*polyunsaturated*) به عنوان یک اندکس قراردادی جهت تعیین وسعت واکنش پراکسیداسیون در نظر گرفته می شود. مالون دآلدئید در واکنش با تیوباریتوریک اسید رنگ قرمزی با جذب در طول موج 535 نانومتر ایجاد می کند (۱۷).

آمارها (*statistics*) :

داده ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده اند. معنی دار شدن آماری و اختلاف بین گروهها به وسیله تست کای اسکور و *t* استودنت نشان داده شده است.

یافته ها

شش ساعت بعد از انسداد دو طرفه شریانهای کاروتید، تمام حیوانات در گروه *IsC-Rep* علائم نورولوژیکی با اندکس سخته (*strok index*) ایجاد کرده اند؛ در حالی که گروههای تحت درمان دارویی کاهش قابل ملاحظه ای در اندکس سخته ($0/1$) $P <$ (در مقایسه با گروه *IsC - Rep*) نشان داده اند. از طرفی، در طول خونرسانی مجدد، دو رت از گروه دو با میزان مرگ و میر 20% و یک رت از گروه سه با میزان مرگ و میر $11/1\%$ مردند؛ در حالی که هیچ گونه مرگ و میری در گروههای دیگر مشاهده نگردید جدول (۲).

جدول ۲- اثرات تزریق داخل وریدی آلکالوئید استروئیدهای

جداشده از برگ زیتون روی اندکس سکنه و میزان مرگ و میر در طول زمان ایسکمی مغزی و خون رسانی مجدد در رتها

گروهها	دوزدارو mg/kg	n	Stroke index a	mortality(%) b
sham	سالین	۸	۰ ± ۰	۰
Isc - Rep	سالین	۱۰	۱۶/۳ ± ۱/۲	۲۰
آلکالوئید استروئید	۰/۵	۹	۱۱/۲ ± ۱/۷	۱۱/۱
آلکالوئید استروئید	۱	۸	۹/۵ ± ۱/۲	۰
آلکالوئید استروئید	۱/۵	۸	۷/۴ ± ۱/۶	۰
نیمودیپین	۱/۵	۸	۶/۹ ± ۱/۱	۰

b: اندکس هر یک ساعت در طول ۶ ساعت اولیه خونرسانی مجدد اندازه گیری شد
x: p < در مقایسه با گروه ششم

b: میزان مرگ و میر در طول ۵ روز خونرسانی مجدد

e: p < ۰/۰۱ در مقایسه با گروه Isc - Rep

در گروه *Isc - Rep* دامنه *EEG* فوراً کاهش یافته است و در طول خونرسانی مجدد دامنه *EEG* به طور آهسته افزایش یافته و به ۳۶٪ در ۳۰ دقیقه اول و به ۴۰٪ در ۶۰ دقیقه بعد از خونرسانی مجدد رسیده است (جدول ۳). افزایش آشکار دامنه *EEG* در گروههای تحت درمان با غلظتهای ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ($p < ۰/۰۵$) در مقایسه با گروه *Isc - Rep* دیده می شود که ۶۲٪، ۷۶٪، ۹۰٪ به ترتیب در غلظتهای ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم آلکالوئید استروئید ۶۰ دقیقه بعد از خونرسانی مجدد می باشد. کاهش دامنه *EEG* ناشی از ایسکمی در غلظت آلکالوئید استروئید $۱/۵ \text{ mg.kg}^{-1}$ تقریباً مشابه حیوانات دریافت کننده نیمودیپین است (جدول ۳).

جدول ۳- اثرات آلکالوئید استروئیدهای برگ زیتون روی *EEG* در طول ایسکمی و خونرسانی مجدد در رتها ریزتر

گروهها	Dose Mg.kg	ischemia min ۱۰	%EEG amplitude Reperfusion		
			min ۱۰	min ۳۰	min ۶۰
sham	سالین	—	۱۰۴ ± ۲	۹۷/۸۵ ± ۱/۵۹	۱۰۴/۴ ± ۱/۹
Isc - Rep	سالین	۲۳/۹۵ ± ۲/۲ b	۳۶/۴ ± ۱/۵ b	۲۸/۶ ± ۳/۲۷ b	۴۰/۷۳ ± ۳/۷۷ b
آلکالوئید استروئید a	۰/۵	۲۴/۶۱ ± ۲/۹	۳۴/۴ ± ۲/۳ c	۳۱/۳۷ ± ۲	۶۲/۱۵ ± ۲/۸۶ c
آلکالوئید استروئید	۱	۲۹/۶۲ ± ۳/۹	۶۳/۱۸ ± ۲/۵۱ d	۴۶/۰۸ ± ۳/۲ d	۷۶/۵۲ ± ۴/۱۴ d
آلکالوئید استروئید	۱/۵	۲۹/۱۵ ± ۱/۸۵ c	۶۴/۷۶ ± ۳ d	۵۴/۱ ± ۱/۲ d	۹۰/۲۶ ± ۱/۶ d
نیمودیپین	۱/۵	۳۴/۷۵ ± ۲/۲۴ d	۷۶/۱۸ ± ۳/۴۹ d	۶۴/۱۱ ± ۳/۴۴ d	۹۳/۲۷ ± ۳/۳۱ d

a: steroidal alkaloids: b: p < ۰/۰۱ در مقایسه با گروه ششم c: p < ۰/۰۵ در مقایسه با گروه Isc - Rep d: p < ۰/۰۱ در مقایسه با گروه Isc - Rep

اثرات مهاري آلکالوئید استروئیدها با غلظت $۱/۵ \text{ mg.kg}^{-1}$ تقریباً برابر با اثرات مهاري نیمودیپین می باشد. آلکالوئید استروئیدها در غلظت $۱/۵ \text{ mg.kg}^{-1}$ غلظت سدیم را به طور معنی داری کاهش داد؛ اما در مجموع در یک روش وابسته به دوز غلظت سدیم را کاهش داده است (جدول ۴).

افزایش قابل ملاحظه آب، کلسیم و محتوی *MDA* در کورتکس مغز در گروههای *Isc - Rep* مشاهده می شود که با گروه *sham* تفاوت قابل ملاحظه ای دارد ($p < ۰/۰۱$). در همه گروههای تحت درمان با آلکالوئید استروئیدها، افزایش کلسیم و محتوی *MDA* در یک روش وابسته به دوز زیاد می شود.

جدول (۴): اثر آلکالوئید استروئیدهای برگ زیتون روی محتوی سدیم، آب، کلسیم و *MDA* کورتکس مغز بعد از ۵ روز خونرسانی مجدد در رتها

گروهها	Dose (mg.kg)	H ₂ O (%)	Na ⁺ (Mmol.g ⁻¹ dry.w)	Ca ⁺⁺ (Mmol.g ⁻¹ dry.w)	MDA (Mmol.g ⁻¹ dry.w)
sham	سالین	۷۷/۷۳ ± ۱/۸	۲۱۴/۶۱ ± ۵/۸	۳/۲۱ ± ۰/۱۳	۲۱۲/۲۲ ± ۵/۹
Isc - Rep	سالین	۷۶/۳۱ ± ۱/۷۴	۲۲۷/۹۲ ± ۴/۸۷	۵/۱۱ ± ۰/۳۷ a	۲۵۲/۲۵ ± ۵/۹ a
آلکالوئید استروئید	۰/۵	۷۷/۲۳ ± ۱/۳۵	۲۱۹/۰۳ ± ۶/۶۷	۴/۷۱ ± ۰/۳۷ b	۲۳۳/۱۵ ± ۷/۲ b
آلکالوئید استروئید	۱	۷۷/۳۳ ± ۱/۴۲	۲۲۲/۵۲ ± ۸/۷	۳/۸ ± ۰/۳ b	۲۲۹ ± ۸/۳ b
آلکالوئید استروئید	۱/۵	۷۷/۰۲ ± ۰/۶۷	۲۱۶/۹۵ ± ۵/۸۴	۳/۵ ± ۰/۲۶ b	۲۱۸/۵ ± ۶/۵۴ b
نیمودیپین	۱/۵	۷۷/۱۲ ± ۰/۵۸	۲۱۷/۲۳ ± ۵/۹۶	۳/۳۶ ± ۰/۲۴ c	۲۱۷/۷۶ ± ۵/۱ b

b: p < ۰/۰۱ در مقایسه با گروه sham

a: R < ۰/۰۱ در مقایسه گروه Isc - Rep

بحث

مالون دآلدئید تشکیل شده از تجزیه اسیدهای چرب غیر اشباع پلی به عنوان یک اندکس قراردادی برای تعیین وسعت واکنش پراکسیداسیون عمل می کند. مالون دآلدئید به عنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدها شناسایی شده است که با تیوباربتوریک اسید یک رنگ قرمزی ایجاد می کند که جذب آن در طول موج 535 nm است (۲). در نتایج مطالعه ما، آلکالوئید استروئید با غلظت $1/5 \text{ mg/kg}$ محتوی مالون دآلدئید مغز را به طور مؤثر کاهش داده است و همچنین آلکالوئید استروئیدها با این غلظت عمل آنتی اکسیدانته تقریباً برابری با نیمودیپین داشته است. ورود زیاد کلسیم به داخل سلولها و پراکسیداسیون لیپیدی میانجیگری شده از رادیکالهای آزاد اکسیژن، نقش مهمی در میان مکانیسم های آسیب ایسکمی مغزی - خونرسانی مجدد بازی می کنند (۱۹، ۲۰).

در نتایج ما آلکالوئید استروئیدها در غلظت $1/5 \text{ mg/kg}$ غلظت کلسیم را به طور مؤثری کاهش داده است، این مقدار آلکالوئید استروئید اثر ضد تجمعی کلسیم (*calcium - overloading effect*) برابری با نیمودیپین اعمال کرده است. افزایش ورود کلسیم به داخل نوروں از طریق کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ و گیرنده ممکن است منجر به افزایش تشکیل رادیکالهای اکسیژن گردد. رادیکالهای آزاد اکسیژن پراکسیداسیون لیپید از غشاء نوروں را افزایش می دهند که خود یکی از عوامل القاء کننده بیماری عملکرد غشایی است (۲۱، ۲۲). بلاکهای کانال سدیم شبیه تترادوتوکسین ممکن است از طریق دپلاریزاسیون شدید نوروں، محدود کردن آزاد شدن گلوتامات سمی از طریق معکوس کردن انتقال گلوتامات وابسته به سدیم، پیشگیری از تجمع کلسیم داخل سلولی، حفظ ذخائر انرژی سلولی و برگشت هومئوستاز یونی از طریق

مبادله کننده سدیم - کلسیم در درمان آسیب نوروںی ایسکمیک قابلیت مصرف داشته باشد (۲۳، ۲۴). مطالعاتی که نقش کانالهای یونی حساس به تترادوتوکسین را در آسیب نوروںی هیپوکسیک - ایسکمیک بررسی می کنند نشان داده اند که ورود سدیم یک حادثه شروع کننده مهم است (۲۵، ۲۳). در مطالعه ما آلکالوئید استروئیدها فقط در دوز بالا محتوی سدیم را به طور معنی دار کاهش داده اند. بنابراین به نظر می رسد که این اثر از طریق بلاک کردن کانالهای سدیمی به عمل می رسد. متورم شدن سلولها در ایسکمی مغزی به طور مقدماتی در آستروسیت ها ایجاد می شود. معتقدند که ورود آب به داخل سلولها از حرکت اسمزی آب به دنبال تخریب هومئوستاز یونی غشاء ایجاد می شود. به هر حال متورم شدن سلولی زودتر از آنچه انتظار می رود (بعد از ایسکمی) بوجود می آید (۲۶). اما در تحقیقات ما محتوی آب در هیچ کدام از گروهها تغییر نکرده است

نتیجه گیری

بنابراین به نظر می رسد آلکالوئید استروئیدهای برگ زیتون از تخریب هومئوستاز یونی غشاء ممانعت بعمل نیآورده اند یا اثر اندکی داشته اند. در این مطالعه گروههای تحت درمان با آلکالوئید استروئیدها کاهش اندکس سکت و افزایش بقاء را نسبت به گروه *Isc_Rep* نشان داده اند. این حالت دلالت می کند که آلکالوئید استروئیدها اثرات حمایتی روی آسیب ایسکمی مغزی - خونرسانی مجدد با یک روش وابسته به افزایش دوز داشته اند. همچنین دوز بالاتر آلکالوئید استروئیدها کاهش *EEG* ناشی شده از ایسکمی را مهار کرده است.

پیشنهاد می گردد که آلکالوئید استروئیدهای برگ زیتون تحمل نوروںها را در طول ایسکمی و آنوکسی افزایش می دهد که برای کند کردن آسیب ایسکمی مغزی مفید خواهد بود.

References

1. Ilakay E, Bilge S, and Atta-Ur. Etioline, a steroidal alkaloid from *lilium candidum* L. *Biochemical Systematics and Ecology* 2001; 29: 535-536
2. Osbourn AE. Preformed anti-Microbial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant cells* 1996: 1821 – 1831
3. Lavie Y, Harel-orbital T, Gaffield W and Liscovitch M. Inhibitory effect of steroidal alkaloids on drug transport and multi drug resistance in human cancer cells. *Anticancer Res* 2001; 21 (2A): 1189 – 94
4. Chen JK, Taiple J, Cooper MK, and Beackey PA. Inhibition of hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to smoothened. *Genes Dev* 2002; 16(21): 2743-8
5. Dambacher JP, Beehler BM, Spande TF, Garrof HM, and Daly JW. Homobatrachotoxin in the genus *Pitohui*: chemical defense in birds? *Science*. 1992; 258 (5083): 799-801
6. Buck WB, Dollahite JW, and Allen TJ. *Solanum elaeagnifolium*, silver leafed nightshade, poisoning in livestock. *J Am Vet Med Assoc* 1960; 137: 348 – 51
7. Lee-Huang S, Zhang L, Huang PL, Chang YT, and Huang PL. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 307(4): 1029-37.
8. Markin D, Duek L, and Berdicevsky I. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. *Mycoses*, 2003 Apr; 46(3-4): 132-6
9. Tranter HS, Tassou SC, and Nychas GY. The effect of olive phenolic compound, oleuropein, on growth and enterotoxinB production by *staphylococcus aureus*. *J App Microbiol* 1993;74: 235 – 59
10. Gonzalez M, zarzuelo A, Gamez MJ, Urtilla MP, Jemenez J, and Osuna I. Hypoglycemic activity of olive leaf. *Planta Med*1992; 58(6): 513 – 5
11. Zarzuelo A, Duarte J, Jimenez J, Gonzalez and Urtilla MP. Vasodilator effect of olive leaf. *Planta Med* 1991; 57 (5): 417 – 19
12. Visiolo F and Galli C. Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation . *life sciences*: 1997; 55(24): 1965 – 1971
13. Briante R, Patumi M, Terenziani S, Bismuto E, Febbraio F, and Nucci R. *Olea europaea* L. leaf extract and derivatives: antioxidant properties. *J Agric Food Chem* 2002; 50(17): 4934-40
14. Young W, Rappaport H, chalif DJ, and Flamm ES. Regional brain sodium potassium and water changes in rat middle cerebral artery occlusion of ischemia. *Stroke* 1987; 18: 751 – 9
15. Bradbary MW. B, kleenman CR, Bagdoyan H, Barbarian A. The calcium and magnesium content of skeletal muscle brain and cerebral fluid as determined by atomic absorption flame photometry. *J lab. Clin Med*1968; 71: 884 – 92
16. Ohkawa H, Ohishi N, and Yagi K. Assay for lipid peroxidase in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annal Biochem*1979; 95: 351 – 8
17. Niehaus WG, Samuelsson B. Formation of malonaldehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation. *Eur J Biochem* 1968; 6: 126-130

18. Peter H. Proctor and Edward S. Peynolds. Free radicals and disease in man. physiological chemistry and physics and medical nmr 1984; 16: 175-195
19. Rami A, kerigstein J. Neuronal protective effects of calcium antagonists in cerebral ischemia. Life, sci. 1994; 55: 2105 – 13
20. Pahlmark, folbergrov J, smith MI, and Siesyo Bk. Effects of dimethyl thiourea on selective vulnerability in forebrain ischemia in rats. Stroke 1993 ; 24 : 731 – 7
21. Jiny Z, Helene B, Bruce Klitzman and Claude A. Piantadosi. Nitric oxide synthase inhibition and extracellular Glutamate concentration after cerebral ischemia reperfusion. Stroke 1995; 26: 298 – 304
22. Feng YP. Pathophysiology of cerebral ischemic and stroke and status of dry intervention. Acta pharm ceut. Sin 1999; 34: 72 – 8
23. Lysko, PG, Webb CL, Yue TL, Gu JL and Feuerstien G. Neuroprotective effects of teradotoxin as a Na⁺ channel modulator and glutamate release inhibitor in cultured rat cerebellar neurons and in gerbil global brain ischemia: Stroke 1994; 25 (12): 2476-82
24. Hicken bottom SL, and Grotta J. Neuroprotective therapy. Semin Neurol. 1998; 18 (4): 485 – 92
25. Weiser T, Wienrich M, Brenner M, Kubiake R, Weckesser and Polluk R. The AMPA receptor/Na⁺ channel blocker BTR 567 CL is protective in a model of global cerebral ischemia. Eur J pharmacol 2001; 421 (3): 165 – 70
26. Kentaro M, Masahiro M Z, Hiheaki I, and Minoru Meada. Temporal profile of changes in brain tissue extracellular space and extracellular ion (Na⁺, K⁺) concentration after cerebral ischemia and the effects of mild cerebral hypothermia. J Neurotrauma 2002; 19 (10): 1261 – 70

