

اثر الاژیک اسید بر حافظه و درد ناشی از ایسکمی مغزی در موش صحرائی نر بالغ

مریم قاسم زاده دهکردی^۱، دکتر مریم رفیعی راد^۲، دکتر لیلا روحی^۳

نویسنده‌ی مسول: خوزستان، ایذه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ایذه، گروه زیست شناسی Rafeirad.m@gmail.com

دریافت: ۹۲/۵/۷ پذیرش: ۹۲/۱۱/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: ایسکمی در مغز موش موجب ایجاد آسیب‌های نرونی شدید و به دنبال آن اختلالات یادگیری و حافظه و درد می‌گردد. الاژیک اسید یک ترکیب پلی فنلی با خواص آنتی اکسیدانی است که در میوه‌هایی مانند انار، تمشک و انواع توت یافت می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی اثر تجویز ۱۴ روزه‌ی دوزهای مختلف الاژیک اسید بر حافظه و یادگیری و درد متعاقب ایسکمی عمومی در مغز موش بود. **روش بررسی:** در این تحقیق ۵۰ سر موش صحرائی نژاد ویستار در محدوده‌ی وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم به‌طور تصادفی در ۵ گروه مختلف قرار داده شدند. برای ایجاد ایسکمی شریان‌های کاروتید عمومی دو طرفه جدا شده، از دو قسمت مسدود و از بخش میانی قطع شدند. ارزیابی حافظه با استفاده از آزمون یادگیری اجتنابی غیر فعال (شاتل باکس) و ارزیابی آستانه‌ی درد با استفاده از دستگاه تیل فلیک انجام گرفت. **یافته‌ها:** ایسکمی باعث کاهش حافظه ($P < 0/01$) و کاهش آستانه درد ($P < 0/001$) شد و تجویز دوزهای ۱۰، ۲۵، ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم الاژیک اسید به ویژه دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم منجر به بهبود نقایص ایجاد شده در حافظه ($P < 0/01$) و درد ($P < 0/001$) گردید. **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد استفاده‌ی الاژیک اسید بتواند به واسطه‌ی خاصیت آنتی اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد، از شدت اختلالات عصبی ناشی از ایسکمی هیپوپرفیوژن بکاهد.

واژگان کلیدی: ایسکمی مغزی، الاژیک اسید، حافظه، درد، موش صحرائی نر

مقدمه

۵۰ میلی‌متر جیوه می‌شود (۴). اگر جریان خون مغز به کمتر از ۱۰ سی‌سی در ۱۰۰ گرم از بافت مغز در هر دقیقه برسد، مرگ سلول‌های عصبی رخ می‌دهد (۵). ایسکمی گلوبال مغزی موجب نورودژنراسیون وسیع در ناحیه‌ی CA۱ هیپوکامپ، استریاتوم و نئوکورتکس می‌گردد (۶). یادگیری و حافظه مکانیسم‌های حیاتی برای یک سیستم زنده هستند. زیرا این فرایندهای مغز به حیوان اجازه می‌دهد تا از

ایسکمی به عنوان کاهش جریان خون مغزی [Cerebral blood flow (CBF)] است که به کل مغز و یا بخشی از آن آسیب وارد می‌کند (۲ و ۱). مدل Two Vessel Occlusion (۲VO) یک مدل تجربی برای هیپوپرفیوژن مزمن مغزی است (۳) که در آن انسداد دایم هر دو شریان کاروتید مشترک و قطع آن‌ها (در موش صحرائی) صورت می‌گیرد و موجب کاهش فشار خون به سطح ۴۰ تا

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد

۲- دکترای فیزیولوژی جانوری، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد ایذه

۳- دکترای فیزیولوژی جانوری، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد

ایسکمی هیپوپرفیوژن مورد بررسی قرار می‌گیرد.

روش بررسی

تحقیق حاضر، با استفاده از موش‌های صحرائی نر بالغ نژاد ویستار تولیدی مرکز تکثیر و نگهداری خانگی حیوانات دانشگاه علوم پزشکی اهواز با محدوده‌ی وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم انجام گرفت. حیوانات در شرایط استاندارد 20 ± 2 درجه‌ی گرم سانتی‌گراد و سیکل روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته (روشنایی از ۷ صبح آغاز می‌شود) و دسترسی کافی به غذای فشرده شرکت‌های دام پارس تهران و چاودانه‌ی شهرضای اصفهان و آب لوله‌کشی تصفیه‌ی شهر ایذه و در مرکز نگهداری حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد ایذه در درون قفس‌های استاندارد به‌صورت گروه‌های چهارتایی نگهداری شدند. برای آسان شدن کار و سازش با شرایط محیط و آزمایش کننده، حیوانات، از قبل روزانه به مدت چند دقیقه دست آموز می‌شدند. پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین‌المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی تنظیم و در کمیته‌ی اخلاق دانشگاه به تصویب رسید.

حیوانات به‌طور تصادفی به گروه‌های زیر تقسیم شدند:

۱- گروه سالم (کنترل) بدون القای ایسکمی و بدون دریافت دارو (کنترل)

۲- گروه ایسکمی هیپوپرفیوژن بدون دریافت دارو (ایسکمی)

۳- گروه ایسکمی هیپوپرفیوژن، به مدت ۱۴ روز، روزانه مقدار ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم الژییک اسید را به روش تجویز داخل معدی یا گاوژ دریافت نمودند (EA ۱۰ mg/kg + ایسکمی).

۴- گروه ایسکمی هیپوپرفیوژن، به مدت ۱۴ روز، روزانه مقدار ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم الژییک اسید را به روش تجویز داخل معدی یا گاوژ دریافت نمودند (EA ۲۵ mg/kg + ایسکمی).

اطلاعات محیط استفاده کند و در نتیجه احتمال بقای خود را افزایش دهد (۷). هیپوکامپ در تثبیت حافظه و یادگیری فضایی در پستانداران نقش اساسی دارد (۸). به طوری که تخریب این بخش کاربرد حافظه‌ی فضایی را مختل می‌کند (۹). آسیب به هیپوکامپ باعث ایجاد فراموشی و ضعف حافظه‌ی کوتاه مدت و حافظه‌ی فضایی می‌شود (۱۰). شواهد بالینی، حاکی از این فرضیه است که هیپوپرفیوژن مزمن مغزی در اختلالات عصبی، منجر به اختلال درد نیز می‌گردد (۱۱). درد نوروپاتییک به دردی اطلاق می‌شود که به دنبال آسیب به سیستم عصبی ایجاد می‌شود (۱۲). درد بخشی ضروری از سیستم دفاعی بدن، و یک هشدار سریع به سیستم عصبی جهت ایجاد یک واکنش حرکتی برای به حداقل رساندن آسیب‌های فیزیکی است (۱۳). در سال‌های اخیر به خوبی نشان داده شده است که مصرف میوه‌ها و سبزیجات حاوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موجب پیشگیری از بسیاری بیماری‌ها، از جمله عوارض قلبی و حتی سرطان‌های مختلف شده است (۱۴). الژییک اسید، (۸، ۷، ۳، ۲- ترا هیدروکسی - کرومنو (۳، ۴، ۵- سی دی ای) کرومنو - ۵، ۱۰، ۵- دیون - با وزن مولکولی ۳۰۲ گرم بر مول)، یک ترکیب فعال زیستی است که کاربردهای دارویی و صنعتی بسیاری دارد (۱۵). الژییک اسید پلی فنلی است که در میوه‌ها از جمله انار، توت فرنگی، تمشک و انگور یافت می‌شود (۱۶). این مولکول دارای خواص متنوعی از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (۱۵). مطالعات انجام شده بر روی الژییک اسید در سلول‌های سرطانی، القای آپوپتوز و مرگ سلولی و جلوگیری از رشد مستمر تومور را نشان داده است (۱۷). از نتایج مطالعات حدس زده می‌شود که الژییک اسید تأثیرات حفاظت عصبی مفیدی را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو در موش‌های دیابتی ارایه می‌دهد (۱۸). در این پژوهش برای اولین بار دزهای متفاوت الژییک اسید بر حافظه و درد در مدل

درون و بیرون محفظه گردش کنند. سپس حیوان درون جعبه روشن قرار داده شده و زمان تاخیر رفتن حیوان به جعبه تاریک ثبت گردید (یادگیری). به محض ورود حیوان به محفظه تاریک درب گیوتینی بسته شده و شوک الکتریکی به کف پای آن اعمال شد. ۲۴ ساعت بعد (یک روز بعد) مدت زمان تاخیر ورود حیوانات به محفظه تاریک (که قبلاً شوک داشت ولی این بار فاقد شوک می‌باشد) به عنوان حافظه‌ی اجتنابی غیرفعال برحسب ثانیه اندازه‌گیری شد. این عمل برای همه موش‌ها در تمام گروه‌های مورد تحقیق انجام شد (۲۵ و ۲۴).

تست سنجش آستانه‌ی درد: با استفاده از دستگاه تیل فلیک (ساخته شده توسط آقای مهندس پور)، آستانه‌ی درد در حیوانات در گروه‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش که روشی استاندارد برای ارزیابی درد در مدل‌های حیوانی می‌باشد، با تاباندن گرمای ۵۰ تا ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد روی نقطه‌ای در فاصله ۸ سانتی‌متری از نوک دم موش‌های صحرائی، مدت زمان تاخیر تکان دادن و یا دور کردن دم از کانون گرمایی ثبت می‌گردد. زمان قطع گرما به منظور پیشگیری از صدمه بافتی در دم روی ۱۰ ثانیه تنظیم و کنترل شد (۲۶ و ۲۴). این عمل نیز برای تمامی گروه‌های مورد آزمایش انجام گرفت.

روش‌های آماری: داده‌های این تحقیق به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارایه و سپس با روش‌های مناسب آماری در محیط‌های نرم افزارهای Excel و SPSS و با استفاده از روش ANOVA یک طرفه و تست پشتیبان LSD آنالیز شدند و تفاوت نتایج بین گروه‌های مختلف با حداقل $P < 0/05$ معنی‌دار تلقی گردید (۲۴).

یافته‌ها

تست یادگیری اجتنابی غیر فعال: مقایسه‌ی میانگین زمان تاخیر اولیه در نمودار ۱، نشان می‌دهد که میزان تاخیر اولیه،

۵- گروه ایسکمی هیپوپرفیوژن، به مدت ۱۴ روز، روزانه مقدار ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم الاژیک اسید را به روش تجویز داخل معدی یا گاوژ دریافت نمودند (EA ۵۰ mg/kg + ایسکمی) (۲۱-۱۹).

تهیه‌ی الاژیک اسید: الاژیک اسید از شرکت Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) تهیه و پس از حل شدن در نرمال سالین به روش داخل معدی گاوژ تجویز شد.

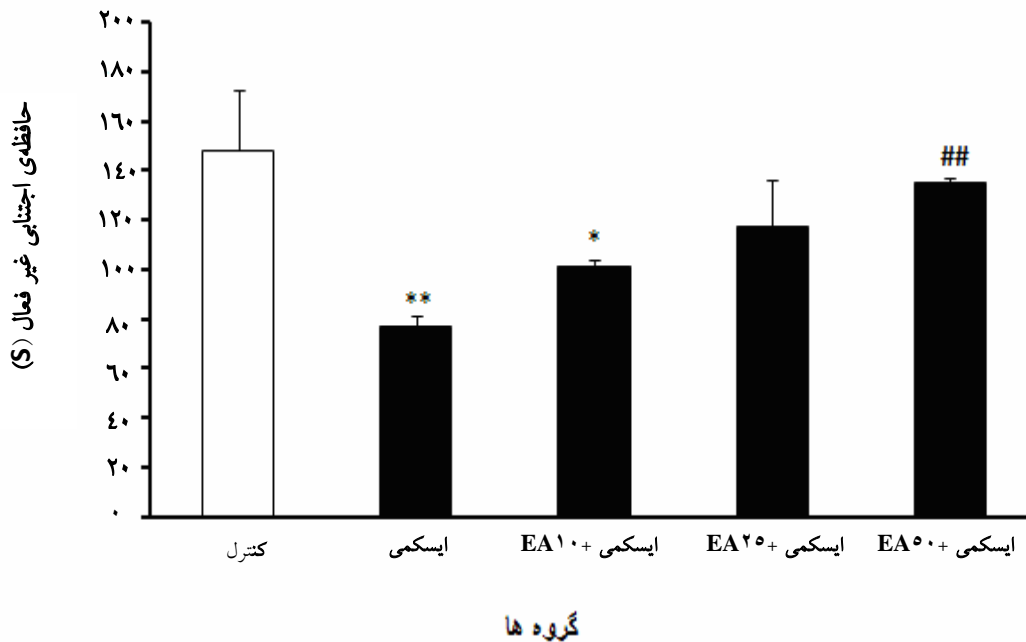
روش جراحی: پس از بیهوشی کامل حیوانات با کتامین / زیلازین (۱۰/۹۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی) با ایجاد شکاف طولی در پوست زیرگردن آن‌ها و کنارزدن عضلات، شریان‌های کاروتید مشترک چپ و راست را نمایان کرده و با بستن دوگره با نخ جراحی ابریشمی در بالا و پایین هر شریان، وسط دو گره را با قیچی قطع نمودیم. سپس بابخیه کردن محل جراحی، حیوانات برای سپری کردن دوره‌ی بهبودی از عمل جراحی تیمار شدند. در ادامه پس از به هوش آمدن حیوانات و بعد از یک هفته، جراحی مشابهی در طرف دیگر انجام می‌شد (۲۲). پس از آن حیوانات هر گروه به مدت دو هفته با یکی از دوزهای مختلف الاژیک اسید به روش گاوژ تحت درمان قرار گرفتند.

تست حافظه‌ی اجتنابی غیر فعال: با استفاده از دستگاه شاتل باکس (مدل ST- ۵۵۰۰) که شامل دو محفظه یکی تاریک و دیگری روشن است و کف آن‌ها از مفتول‌های فلزی استیل با قطر ۱ تا ۲ میلی‌متر و فواصل یک سانتی‌متر پوشیده شده است و توسط یک دستگاه تولید جریان الکتریکی شوک خفیفی به میزان ۷۵ ولت، ۰/۳ میلی‌آمپر به مدت ۳ ثانیه جریان متناوب در محفظه‌ی تاریک و تنها یکبار به کف پای حیوانات اعمال می‌گردد، انجام گرفت (۲۳). ابتدا حیوانات، هر کدام برای مدت ۱۰ دقیقه به منظور آشنایی با دستگاه (آموزش) درون شاتل باکس با درب گیوتینی باز قرار داده شدند تا آزادانه بین

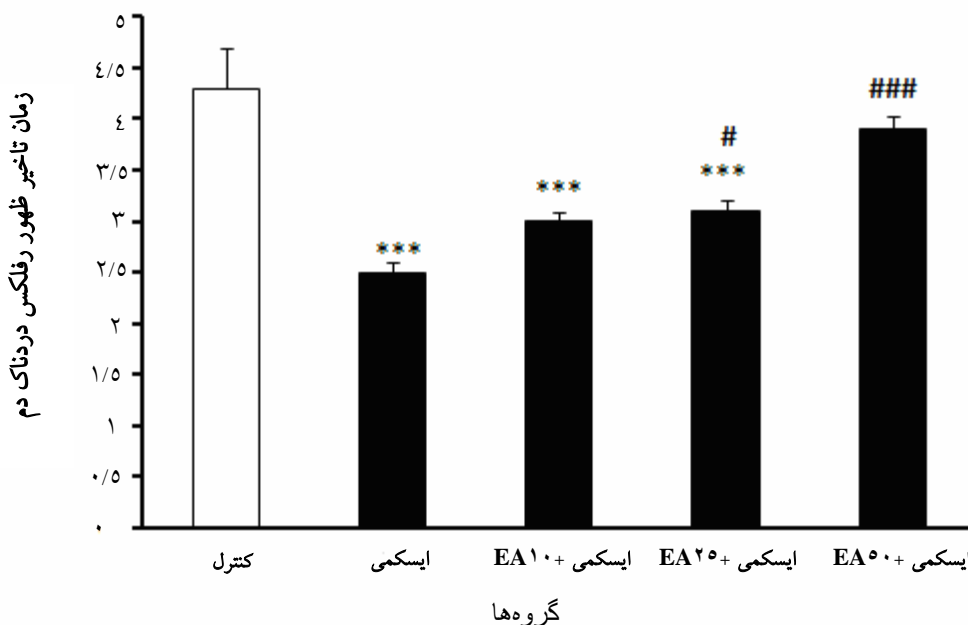
نمودار نشان می‌دهد که زمان تاخیر در آزمون تیل فلیک در تمامی گروه‌های ایسکمی دریافت‌کننده‌ی الژیکی اسید نسبت به گروه ایسکمی افزایش یافت که گروه سوم (Ischemia+ ۵۰EA) تفاوت بسیار معنی‌داری در حد ($P < ۰/۰۰۱$) با گروه ایسکمی نشان می‌دهد و تفاوت گروه دوم (Ischemia+ ۲۵EA) با گروه ایسکمی در حد ($P < ۰/۰۰۱$) و با گروه کنترل سالم در حد ($P < ۰/۰۰۱$) معنی‌دار است. گروه ۱ (Ischemia+ ۱۰EA) نیز تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل سالم دارد ($P < ۰/۰۰۱$). که نشان دهنده‌ی آن است که این دز نتوانسته بر افزایش آستانه‌ی درد موثر باشد.

به شکل معنی‌داری در گروه ایسکمی نسبت به گروه کنترل سالم کاهش یافت ($P < ۰/۰۱$). همچنین این نمودار نشان می‌دهد در تمامی گروه‌های ایسکمی دریافت‌کننده‌ی الژیکی اسید، میزان تاخیر اولیه نسبت به گروه ایسکمی افزایش یافته است. که گروه سوم (Ischemia+ ۵۰EA) در این مورد تفاوت معنی‌داری در حد ($P < ۰/۰۱$) با گروه ایسکمی نشان می‌دهد. تفاوت گروه ۱ (Ischemia+ ۱۰EA) نیز نسبت به گروه کنترل سالم معنی‌دار است ($P < ۰/۰۰۵$).

تست تیل فلیک: با مقایسه‌ی زمان تاخیر در آزمون تیل فلیک در نمودار ۲ کاهش معنی‌داری در پاسخ تاخیری (تاخیر ظهور رفلکس دردناک دم)، در موش‌های صحرایی ایسکمیک نسبت به گروه کنترل مشاهده می‌شود ($P < ۰/۰۰۱$). همچنین این



نمودار ۱: مقایسه‌ی یادگیری اجتنابی غیرفعال (زمان تاخیر اولیه درون شاتل باکس) در بین گروه‌های دریافت‌کننده‌ی مقادیر مختلف الژیکی اسید با گروه ایسکمی و کنترل نمودار برحسب (میانگین \pm انحراف استاندارد) رسم شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، علامت (*) بیانگر اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل و علامت ## بیانگر اختلاف معنی‌دار با گروه ایسکمی است. ($n=10$ آنالیز واریانس یکطرفه و تست پشتیبان LSD).



نمودار ۲: مقایسه‌ی میانگین زمان تاخیر ظهور رفلکس دردناک دم در بین گروه‌های دریافت‌کننده‌ی مقادیر مختلف الازئیک اسید با گروه ایسکمی و کنترل. نمودار برحسب (میانگین ± انحراف معیار از میانگین) رسم شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، علامت (*) بیانگر اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل و علامت # بیانگر اختلاف معنی‌دار با گروه ایسکمی است (n=10 آنالیز واریانس یکطرفه و تست پشتیبان LSD).

بحث

ایسکمی مغزی موجب افزایش Reaction Oxygen Species (ROS) و در نتیجه فعال شدن مسیرهایی می‌شود که منجر به مرگ سلولی در نواحی آسیب‌پذیر مغز می‌گردد (۲۸ و ۲۹). هیپوکامپ نقش مهمی را در تشکیل حافظه جدید و تجزیه و تحلیل اطلاعات فضایی ایفا می‌کند (۳۰). نرون‌ها در منطقه‌ی CA1 هیپوکامپ بیشترین حساسیت به ایسکمی را دارند (۳۱). تحقیقات قبلی نشان دادند که بستن هر دو شریان کاروتید مشترک به مدت ۳۰ دقیقه موجب مرگ سلولی گسترده در ناحیه CA1 هیپوکامپ می‌شود، به نحوی که کاهش معنی‌داری در میانگین تعداد سلول‌های ناحیه CA1 در گروه ایسکمی نسبت به سایر گروه‌ها و نیز تغییرات معنی‌داری در آزمایشات رفتاری حیوانات مشاهده گردید (۳۶ و ۲۵ و ۶). در همین راستا وانگ در سال ۲۰۰۸ در مطالعه‌ای نشان داد که آسیب به هیپوکامپ متعاقب ایسکمی منجر به نقایص رفتاری،

نتایج این تحقیق نشان داد که ایسکمی باعث ایجاد آسیب‌های رفتاری گردید به طوری که میزان یادگیری اجتنابی غیر فعال و آستانه‌ی درد متعاقب ایسکمی به شدت کاهش یافت. زمان تاخیر اولیه برای رفتن به اتاق تاریک پس از القای شوک، همچنین زمان تاخیر در دور کردن دم از منبع گرما در گروه ایسکمی نسبت به گروه سالم کاهش معنی‌داری را نشان داد. همچنین نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تجویز ۱۴ روزه‌ی دوزهای مختلف الازئیک اسید در گروه‌های ایسکمی موجب افزایش میزان یادگیری و حافظه و آستانه‌ی درد گردید و در میان دوزهای تجویزی، دز ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بیشترین و دز ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کمترین اثر را داشته است. کاهش جریان خون مغزی و هیپوپرفیوژن مغزی موجب کاهش اکسیژن مغز و در نتیجه ایسکمی مغزی می‌شود (۲۷).

پاتوژن‌ها در انسان را دارد که اعمال الازیک اسید، احتمالاً منجر به آپوپتوز در سلول‌های سرطانی از طریق مهار عواملی که باعث متاستاز می‌گردند، می‌شود (۴۰ و ۳۹). آب غنی از پلی فنل‌های انار می‌تواند مغز نوزادان موش را در برابر آسیب هیپوکسیک ایسکمی محافظت کند (۴۱). علاوه بر این، الازیک اسید دارای چند اثر التهابی است و باعث کاهش استرس اکسیداتیو می‌گردد (۴۲).

نتیجه گیری

ایسکمی دائمی مغز با تولید مواد اکسیدانی و رادیکال‌های آزاد موجب پردردی و نیز اختلال معنی‌دار حافظه‌ی اجتنابی غیرفعال در موش‌های صحرایی نر می‌گردد. تجویز خوراکی دوزهای مختلف الازیک اسید به مدت ۱۴ روز و روزی یک بار توانست اختلالات ناشی از ایسکمی مغزی را به طور معنی‌داری بهبود ببخشد. احتمالاً ترکیبات فنولی از جمله الازیک اسید، با روش جاروب کردن مواد اکسیدانی و رادیکال‌های آزاد ناشی از روند ایسکمی مغز، موجب بهبودی اختلالات رفتارهای شناختی از جمله حافظه و شدت درد متعاقب ایسکمی می‌شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بر خود واجب می‌دانند که از حوزه‌ی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ایذه که در اجرای این تحقیق با نویسندگان همراهی کردند، تشکر و قدردانی نمایند.

References

1- Pulsinelli WA. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Prog Brain Res.* 1995; 63: 29-37.

به‌خصوص نقایص مرتبط با حافظه و یادگیری می‌شود (۳۳). در برخی پژوهش‌ها نشان داده شده است که ROS باعث انسداد عروق و با درد همراه است (۳۴) و در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شده است که ROS از مهم‌ترین عوامل بروز آسیب‌های نرونی و دردهای نوروپاتی است و تعادل بین ROS و عملکرد سیستم‌های از بین برنده‌ی آن‌ها نقش مهمی در حیات سلول‌ها و سلامت بدن دارد (۳۵). در درد نوروپاتیک علاوه بر افزایش ROS میزان آنتی اکسیدان‌ها هم کاهش می‌یابد (۳۴). تحقیقات ما در گذشته ایجاد عوامل استرس اکسیداتیو از جمله مالون دی آلدیید را و نیز کاهش حافظه و آستانه‌ی درد در مدل ایسکمی نشان داده است (۳۶ و ۳۲ و ۲۵) تحقیقات قبلی نیز بیانگر ایجاد اختلالات درد در نتیجه‌ی ایسکمی می‌باشند (۳۷). مطالعه‌ی کنونی نیز در تایید نتایج مطالعات قبلی نشان داد که القای ایسکمی باعث ایجاد اختلالات یادگیری و حافظه و درد می‌شود. مطالعات فارماکولوژیکی هم در انسان و هم در جانوران از این فرضیه حمایت می‌کند که تغییرات عملکردی در فعالیت کولینرژیک مرکزی بر فرآیند حافظه و یادگیری تاثیر می‌گذارد و هیپوکامپ و آمیگدال که در شکل‌گیری حافظه نقش دارند و غنی از سیناپس‌های کولینرژیک می‌باشند تحت کنترل سیستم گابانرژیک‌اند (۳۸). گریش و راج در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که الازیک اسید بر سیستم گابانرژیک اثر دارد. این تصور می‌رود که احتمالاً الازیک اسید از طریق سیستم گابانرژیک موجب افزایش یادگیری و حافظه شود (۱۹). الازیک اسید به عنوان عامل ضد میکروبی و ضد ویروسی شناخته شده است و همچنین بیان شده است که الازیک اسید توانایی مهار رشد

2- Kaplan B, Brint S, Tanabe J, et al. Temporal thresholds for neocortical infarction in rats subjected to irreversible focal cerebral ischemia. *Stroke.* 1991; 22: 1032-9.

- 3- Kagstorm E, Smith ML, Siesjo BK. Local cerebral blood flow in the recovery period following complete cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1983; 3: 170-82.
- 4- Pusinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol.* 1982; 11: 491-8.
- 5- Bhardwaj A, Alkayed NJ, Kirsch JR, et al. Mechanisms of ischemic brain damage. *Curr Cardiol Rep.* 2003; 5: 160-7.
- 6- Schmidt W, Reymann KG. Proliferating cells differentiate into neurons in the hippocampal CA1 region of gerbils after global cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* 2002; 334: 153-6.
- 7- Alvarez EO, Beauquis J, Revsin Y, et al. Cognitive dysfunction and hippocampal changes in experimental type 2 diabetes. *Behavioural Brain Research.* 2009; 198: 224-30.
- 8- Squire LR. Memory and the hippocampus-A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev.* 1992; 99: 195-23.
- 9- Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, Okeefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature.* 1982; 297: 681-3.
- 10- Ahmadiasl N, Alaei H, Hanninen O. Effect of exercise on learning, memory and levels of epinephrine in rats hippocampus. *J Sport Sci Med.* 2003; 2:106-9.
- 11- Kalaria RN. The role of cerebral ischemia in alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2000; 21: 321-30.
- 12- Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of peripheral neuropathic pain. *Pain.* 2000; 87: 149-58.
- 13- Axelrod FB, Hilz MJ. "Inherited autonomic neuropathies. *Semin Neurol.* 2003; 23: 381-90.
- 14- Casanova E, García-Mina JM, Calvo MI. Antioxidant and antifungal activity of verbena officinalis L. leaves. *Plant Foods for Human Nutrition.* 2008; 63: 93-97.
- 15- Ascacio-Valdés JA, Aguilera-Carbó A, Martínez-Hernández JJ, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN. Euphorbia antisyphilitica residues as a new source of ellagic acid. *Chem Pap.* 2010; 64: 528-32.
- 16- Thakur K, Pitre KS. Polarographic (DCP & DPP) determination of ellagic acid in strawberries & pharmaceutical formulations. *J Chin Chem Soc.* 2008; 55: 143-46.
- 17- Ito H, Miyake M, Nisitani E, et al. Anti-tumor promoting activity of polyphenols from *Cowania Mexicana* and *Coleogyne Ramosissima*. *Cancer lett.* 1999; 143: 5-13.
- 18- Uzar E, Alp H, Ugurcevik M, et al. Ellagic acid attenuates oxidative stress on brain and sciatic nerve and improves histopathology of brain in streptozotocin-induced-diabetic rats. *Neurol Sci.* 2012; 33: 567-74.
- 19- Girish C, Raj V, Arya J, Balakrishnan S. Involvement of the GABAergic system in the anxiolytic-like effect of the flavonoid ellagic acid in mice. *Eur J Pharmacol.* 2013; 15: 710: 49-58.
- 20- Malini P, Kanchana G, Rajadurai M. Antidiabetic efficacy of ellagic acid in

- streptozotocin induced diabetes mellitus in albino wistar rats. *Asian J Pharm Clin Res.* 2011; 4: 124-28.
- 21- Krishna Veni N, Meyyanathan SN, Suresh B. Analysis of ellagic acid in fresh and processed fruit products by high performance thin layer chromatography. *Int Res J Pharm.* 2012; 3: 201-4.
- 22- Cristina S, Leonardo P, Luciano Bartolini, Domenico I. Persistent impairment of gait performances and working memory after bilateral common carotid artery occlusion in the adult Wistar Rat. *Behav Brain Res.* 2002; 136: 13-20.
- 23- Tamburella A, Micale V, Mazzola C, Salomone S, Drago F. The selective norepinephrine reuptake inhibitor atomoxetine counteracts behavioral impairments in trimethyltin-intoxicated rats. *Eur J Pharmacol.* 2012; 683: 148-54.
- 24- Rafieirad M, Valipour Chardahcherik S. Gallic acid improves the memory and pain in diabetic rats. *Yafteh.* 2013; 15: 33-41.
- 25- Sarkaki A, Rafieirad M, Hossini E, Farbood Y, Mansouri MT, Motamedi F. Cognitive deficiency induced by cerebral hypoperfusion/ischemia improves by exercise and grape seed extract. *Health MED Journal.* 2012; 6: 1097-105.
- 26- Kaeidi A, Esmaeili-Mahani S, Abbasnejad M, et al. Satureja khuzestanica attenuates apoptosis in hyperglycemic PC12 cells and spinal cord of diabetic rats. *J Nat Med.* 2013; 67: 61-69.
- 27- 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.
- 28- Bhardwaj A, Alkayed NJ, Kirsch JR, et al. Mechanisms of ischemic brain damage. *Curr Cardiol Rep.* 2003; 5: 160-7.
- 29- Rabiei Z, Bigdeli MR, Asadi M. The Effect of dietary virgin olive oil on brain lipid levels and brain edema in rat stroke models. *J Zanjan Univ Med Sci.* 2013; 21: 56-64.
- 30- Ankarcona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, et al. Necrosis and apoptosis elicited by glutamate in cerebellar granule cells: a temporal sequence depending on mitochondrial function. *Neuron.* 1995; 15: 961-73.
- 31- Eichenbaum H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron.* 2004; 44: 109-20.
- 32- Sarkaki A, Rezaei M, Gharib naseri M, Rafieirad M. Improving active and passive avoidance memories deficits due to permanent cerebral ischemia by pomegranate seed extract in female rats. *Malays J Med Sci.* 2013; 20: 26-35.
- 33- Wang JY, Shen J, Gao Q, et al. Ischemic post conditioning protects against global cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in rats. *Stroke.* 2008; 39: 983-90.
- 34- Luo Z, Harada T, London S, Gajdusek C, Mayberg MR. Antioxidant and ironchelating agents in cerebral vasospasm. *Neurosurgery.* 1995; 37: 1154-58.
- 35- Kim HK, Park SK, Zhou JL, et al. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a

rat model of neuropathic pain. *pain*. 2004; 111: 116-24.

36- Rafeirad M, Sarkaki A, Hosseini A, Farboud Y, Mansouri M, Motamedi F. Effect of grape seed extract on lipid peroxidation duo to ischemia/hypoperfusion in male rat striatum. *Journal of Animal Biology Damghan*. 2011; 4: 37-44.

37- Sopala M, Danysz W. Chronic cerebral hypoperfusion in the rat enhances age-related deficits in spatial memory. *J Neural Transm*. 2001; 108: 1445-56.

38- Izquierdo I, Dacunha C, Rosat R. Neurotransmitter receptors involved in memory processing by the amygdale, medial septum and hippocampus of rats. *Behav And Neurobiol*. 1992; 58: 16-26.

39- Huertz P, Mavaddat N, Mavri J. Reaction between ellagic acid and an ultimate carcinogen. *J Chem Inf Model*. 2005; 45: 1564-70.

40- Akiyama H, Fujii K, Yamasaki O, Oono T, Iwatsuki K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*. 2001; 48: 487-91.

41- West T, Atzeva M, Holtzman D. Pomegranate polyphenols and resveratrol protect the neonatal brain against hypoxic- ischemia injury. *Neurobiol Dis*. 2006; 29: 363-72.

42- Seeram N, Lee R, Hebert D. Rapid scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Separ Purif Technol*. 2005; 41: 49-55.

The Effect of Ellagic Acid on Memory and Pain Induced by Brain Ischemia in Adult Male Rats

Ghasemzadeh Dehkordi M¹, Rafieirad M², Rouhi L³

¹Dept. of Biology, Shahr-e-kord Branch, Islamic Azad University, Shahr-e-kord -Iran

²Dept. of Biology, Izeh Branch, Islamic Azad University, Izeh-Iran

Corresponding Author: Rafieirad M, Dept. of Biology, Izeh Branch, Izeh-Islamic Azad University, Izeh-Iran

E-mail: Rafieirad.m@gmail.com

Received: 29 Jul 2013

Accepted: 9 Feb 2014

Background and Objective: Ischemia in the brain of rats causes intensive neural injuries leading to learning and memory disorders in addition to pain. Ellagic acid is a polyphenol compound with antioxidant properties which is found in fruits like pomegranate, blackberry and all types of mulberry. The objective of this study was to investigate the effect of 14-day prescription of different doses of ellagic acid on memory, learning and pain followed by general ischemia in the brain of rats.

Materials and Methods: In this study, 50 Wistar rats in weight range of 200-250 g were randomly placed in five different groups. To induce ischemia, common carotid arteries were separated from both sides, blocked from both parts and cut from the middle part. Memory was evaluated using passive avoidance learning test (shuttle box) and pain threshold was assessed using tail- flick device.

Results: Ischemia caused reduction of memory ($p < 0.01$) and pain threshold ($p < 0.001$). Prescription of 10, 25 and 50 mg/kg doses of ellagic acid, particularly 50 mg/kg, led to improvement of defects in memory ($p < 0.01$) and reduction of pain ($p < 0.001$).

Conclusion: It seems that using ellagic acid can reduce intensity of neural disorders caused by ischemic hypo-perfusion due to its antioxidant property and inhibition of free radicals.

Keywords: Brain ischemia, Ellagic acid, Memory, Pain, Rat