

The Lithium Chloride Effect on Anxiety, Exploratory Activity, and Brain Derived Neurotrophic Factor Levels of the Hippocampus in a Rat Model of TMT Intoxication

Marzieh Moghadas, Mohammad Amin Edalatmanesh*

Department of Physiology, College of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Article Info:

Received: 14 Mar 2015

Accepted: 13 Apr 2015

ABSTRACT

Introduction: Trimethyltin (TMT) is an organotin neurotoxicant which causes selective degeneration in central nervous system such as hippocampus. TMT intoxication is the cause of mood-cognitive and motor deficits in human and rodents. The present study aimed to investigate the effect of lithium chloride (LiCl) on brain derived neurotrophic factor (BDNF) level in the hippocampus and anxiety-exploratory behaviors in TMT intoxication rat model.

Materials and Methods: In order to induce intoxication, TMT (8mg/kg) was injected intraperitoneally to the rats. The test groups (TMT+Li) received 0.5, 1 and 1.5 meq/kg of LiCl respectively and the TMT+Saline group received normal saline for 14 days after TMT intoxication. The elevated plus maze, dark-light box and open field tests were conducted in order to investigate the anxiety symptoms and exploratory behaviors. Then, the hippocampal level of BDNF was measured using ELISA. **Results:** The findings indicated an increase in anxiety behaviors and a decrease in exploratory ones. In addition, the hippocampal level of BDNF was decreased in the TMT-treated rats. However, LiCl treatment revealed significant effects on decreasing the anxiety level with exploratory behaviors modification in the behavioral tests. **Conclusion:** LiCl, having sufficient neuroprotective effects, can be used as a solution to manage the anxiety symptoms and cognition deficits after TMT intoxication.

Key words:

1. Exploratory Behavior
2. Anxiety
3. Trimethyltin Compounds
4. Lithium Chloride
5. Brain-Derived Neurotrophic Factor

* **Corresponding Author:** Mohammad Amin Edalatmanesh

E-mail: amin.edalatmanesh@gmail.com

اثر لیتیموم کلراید بر اضطراب، رفتار اکتشافی و میزان هیپوکامپی فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز در مدل موش صحرایی مسمومیت با تری متیل تین کلراید

مرضیه مقدس، محمد امین عدالت منش*

گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۲۴ فروردین ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۲۳ اسفند ۱۳۹۳

چکیده

مقدمه: تری متیل تین یک نوروتوکسین ارگانوتینی است که سبب دژنراسیون انتخابی در سیستم عصبی مانند هیپوکامپ می‌شود. مسمومیت با تری متیل تین علت اختلال‌های خلقی-شناختی و حرکتی در انسان‌ها و جوندگان است. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر لیتیموم کلراید بر سطح فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز در هیپوکامپ و رفتارهای اضطرابی-اکتشافی در مدل موش صحرایی مسمومیت با تری متیل تین انجام شد. **مواد و روش‌ها:** جهت القای مسمومیت، تری متیل تین (۸ میلی گرم/کیلوگرم) به صورت درون صفاقی به موش‌های صحرایی تزریق گردید. گروه‌های آزمون (TMT+Li) به ترتیب دوزهای ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی اکی والان/کیلوگرم از لیتیموم کلراید دریافت کردند و گروه TMT+Saline نرمال سالین را به مدت ۱۴ روز پس از مسمومیت با تری متیل تین دریافت کرد. جهت بررسی علایم اضطرابی و رفتارهای اکتشافی از آزمون‌های ماز صلیبی مرتفع، محفظه تاریک-روشن و محفظه باز استفاده شد. سپس سطح هیپوکامپی فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز با استفاده از الایزا اندازه‌گیری شد. **یافته‌ها:** نتایج یک افزایش را در رفتارهای اضطرابی و یک کاهش را در رفتارهای اکتشافی نشان دادند. به علاوه سطح هیپوکامپی فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز در موش‌های صحرایی در معرض قرار گرفته با تری متیل تین کاهش یافت. اگرچه تیمار با لیتیموم کلراید اثرات معنی‌داری را بر کاهش میزان اضطراب با تعدیل رفتارهای اکتشافی در آزمون‌های رفتاری نشان داد. **نتیجه‌گیری:** لیتیموم کلراید که اثرات حمایت‌کننده عصبی کافی دارد، می‌تواند به عنوان یک راهکاری به منظور مدیریت علایم اضطراب و اختلال‌های شناختی پس از مسمومیت با تری متیل تین مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه‌ها:

۱. رفتار اکتشافی
۲. اضطراب
۳. ترکیبات تری متیل تین
۴. لیتیموم کلراید
۵. فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز

* نویسنده مسئول: محمد امین عدالت منش

آدرس الکترونیکی: amin.edalatmanesh@gmail.com

مقدمه

تری متیل تین کلراید^۱ (C_3H_9ClSn) ارگانوتینی^۲ متیله شده است که کاربردهای زیادی در صنایع به عنوان حلال رنگ، تعدیل کننده در PVC^۳، آفت کش ها و جلا دهنده^۴ چوب دارد (۱). تری متیل تین به عنوان یک تعدیل کننده تولید پلاستیک سبب ۶۷ نوع مسمومیت در سراسر دنیا شده و ۱۸۴۹ نفر را به طور حاد بین سال های ۱۹۸۷ تا ۲۰۰۸ متأثر کرده است (۲). در سال ۱۹۹۴ تولید ارگانوتین ها نزدیک به ۵۰۰۰ تن در سال بود. تری آلکیل^۴ ارگانوتین ها به طور عمده در حشره کش ها کاربرد دارند (۳).

تری متیل تین باعث القاء آسیب انتخابی و مرگ نورونی در سیستم عصبی انسان و جوندگان می شود و دارای اثرات نوروتوکسیک^۵ بالقوه ای است (۴). مطالعات رفتاری نشان داده اند که به دنبال مسمومیت با تری متیل تین، افزایش نقص حرکتی، اختلال در یادگیری و حافظه فضایی، بیش فعالی، پر خاشگری و افسردگی رخ می دهد. در انسان مسمومیت با این ترکیب حالت تهوع، سرع، آشفتگی های خواب، افسردگی و نقص در حافظه دراز مدت و یادگیری را باعث می شود (۵-۷).

تزریق درون صفاقی تری متیل تین در مدل های حیوانی آزمایشگاهی باعث مرگ نورونی گسترده ای در سیستم لیمبیک و هیپوکامپ می شود. مکانیسم های آپوپتوز ناشی از تری متیل تین هنوز به درستی مشخص نیستند. سمیت تحریکی وابسته به گلو تامات به عنوان یک کاندید اصلی در میان سایر مکانیسم ها مطرح می باشد. در همه موارد مرگ سلولی توسط تری متیل تین، نشان داده شده که این واقعه با میزان بالای کلسیم داخل سلولی مرتبط می باشد (۸، ۷). مطالعاتی که در مورد تحلیل عصبی^۶ ناشی از تری متیل تین انجام شده اند، نشان داده اند که مسمومیت با تری متیل تین شاید سبب کاهش بیان فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF)^۷ در نواحی مختلف سیستم عصبی مرکزی و از جمله هیپوکامپ می گردد و سطح بیان $Bcl2$ ^۸ و $Bcl2L1$ ^۹ به دنبال تیمار با تری متیل تین در هیپوکامپ کاهش می یابد (۴).

لیتیوم کاتیونی تک ظرفیتی است که با داشتن ویژگی نوروتروفیک باعث کند کردن پیشرفت آتروفی عصبی شده و در نتیجه از مرگ سلول های عصبی جلوگیری می کند (۱۰، ۹). لیتیوم قادر است آشفتگی های رفتاری و شناختی را در مدل حیوانی بیماری های تحلیل برنده عصبی^{۱۰} مانند صدمات مغزی، ALS^{۱۱}، سندرم X شکننده^{۱۲}، بیماری هانتینگتون^{۱۳}، آلزایمر و پارکینسون بهبود بخشد (۱۲، ۱۱).

پژوهش ها نشان داده اند که لیتیوم، فسفریلاسیون پروتئین Tau را از راه مهار GSK-3^{۱۴} کاهش می دهد، با این مکانیسم بیان BDNF افزایش یافته و سبب افزایش بقای سلول ها می گردد.

درمان با لیتیوم در بیماران آلزایمری سبب افزایش قابل توجهی در سطح BDNF می شود (۱۴-۱۲، ۱۰).

تاکنون پژوهشی در ارتباط با استفاده از تری متیل تین در القاء مدلی از اضطراب در حیوانات آزمایشگاهی صورت نگرفته است. این بررسی به دنبال بررسی اثرات سمیت تری متیل تین بر سطح اضطراب، فعالیت حرکتی و جستجوگری و نیز سطح هیپوکامپی فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز در موش های صحرایی می باشد. همچنین اثرات ضد اضطرابی لیتیوم کلراید در این مدل مورد بررسی قرار می گیرد.

مواد و روش ها

حیوانات و گروه های آزمایشی

در این مطالعه از ۵۰ سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگ داوولی^{۱۵} با میانگین وزنی 25.0 ± 1.0 گرم استفاده شد. این حیوانات در مرکز پرورش و تکثیر حیوانات دانشگاه علوم و تحقیقات فارس پرورش یافتند و تحت شرایط استاندارد دمایی (25 ± 2 درجه سانتی گراد) و رطوبت (50 ± 10 درصد) و چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعت نگهداری شدند. کلیه مراحل کار با حیوانات طبق قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی و با نظارت کمیته اخلاقی دانشگاه انجام شد. حیوانات در ۵ گروه به تفکیک زیر تقسیم شدند: گروه سالم: حیوانات این گروه هیچ نوع تیماری نداشته و به منظور بررسی های رفتاری و بیوشیمیایی با سایر گروه های مورد مطالعه استفاده شد. گروه (TMT+Saline): حیوانات این گروه تکدوز تری متیل تین (۸ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن، درون صفاقی) را دریافت نمودند و سپس به مدت ۱۴ روز حلال لیتیوم کلراید یعنی نرمال سالین را به صورت درون صفاقی دریافت داشتند. گروه های $TMT+Li^+/5$ ، $TMT+Li^+/1$ و $TMT+Li^+/0.5$. این گروه ها پس از مسمومیت با تکدوز تری متیل تین، به مدت ۱۴ روز به ترتیب دوزهای ۵/۰، ۱ و ۱/۵ میلی اکی والان بر کیلوگرم وزن بدن حیوان، لیتیوم کلراید را با تزریق درون صفاقی دریافت نمودند.

آزمون ماز صلیبی مرتفع

این آزمون به منظور سنجش میزان اضطراب در حیوانات گروه های مختلف پس از اتمام دوره تیمار با لیتیوم کلراید صورت گرفت. ماز صلیبی مرتفع شامل دو بازوی باز و دو بازوی بسته مقابل هم است. عرض بازوها ۱۰ سانتی متر، طول آن ها ۵۰ سانتی متر و ارتفاع ماز از سطح زمین ۶۰ سانتی متر می باشد. پس از آشنایی با محیط ماز که ۱۵ دقیقه قبل از انجام آزمایش صورت می گیرد، حیوان به آرامی در مرکز ماز قرار داده می شود. آنگاه به مدت ۵ دقیقه عملکرد حیوان در ماز مورد بررسی قرار می گیرد. میانگین مدت زمان حضور در بازوهای

¹ Trimethyltin chloride (TMT)

² Organotin

³ Polyvinyl chloride

⁴ Trialkyl

⁵ Neurotoxic

⁶ Neurodegeneration

⁷ Brain-derived neurotrophic factor

⁸ B-cell lymphoma 2

⁹ BCL2-Like 1

¹⁰ Neurodegenerative

¹¹ Amyotrophic lateral sclerosis

¹² Fragile X syndrome

¹³ Huntington's disease

¹⁴ Glycogen synthase kinase-3

¹⁵ Sprague Dawley

کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند. به دنبال خون‌گیری از قلب، سر حیوان جدا گردید و مغز به‌طور کامل از جمجمه خارج و بر روی یخ قرار داده شد. بلافاصله هیپوکامپ با دقت در زیر استریوسکوپ^{۱۶} از بقیه قسمت‌های مغز جدا شد و به‌سرعت با استفاده از ازلت مایع منجمد گردید. آنگاه با قرار دادن در هاون چینی و ضربه زدن، بافت مغز متلاشی شد و با افزودن ۱ میلی لیتر از بافر RIPA^{۱۷} و سانتریفیوژ در دور rpm ۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه، محلول رویی جدا گردید و جهت سنجش میزان BDNF به روش الایزا مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری بین گروه‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۲۲ انجام شد. داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش داده شد. به‌منظور تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد نظر از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. از نظر آماری مقادیر $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

آزمون ماز صلیبی مرتفع

نتایج نشان‌دهنده افزایش معنی‌داری در سطح اضطراب حیوانات به دنبال مسمومیت با تری متیل تین بود. بدین ترتیب، مدت زمان باقی ماندن حیوانات گروه TMT+Saline ($14/8 \pm 259/4$) (ثانیه) در بازوی بسته ماز صلیبی بیشتر از این مدت زمان در گروه سالم ($12/9 \pm 162/8$) (ثانیه) بود ($P < 0.01$).

آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که تجویز لیتیوم کلراید به مدت ۱۴ روز در دو دوز مختلف ۱ و ۱/۵ میلی اکی والان بر کیلوگرم وزن بدن حیوان، سبب کاهش معنی‌داری در سطح اضطراب طی این آزمون شد. بدین ترتیب که بین گروه‌های TMT+Li ۱ ($12/3 \pm 155$) (ثانیه) و TMT+Li ۱/۵ ($13/8 \pm 134/4$) (ثانیه) با گروه TMT+Saline اختلاف معنی‌داری دیده شد ($P < 0.01$). از طرف دیگر، تجویز لیتیوم کلراید در دوز

بسته، نشان‌دهنده میزان اضطراب حیوان می‌باشد. این آزمون با ۳ تکرار در دو روز متوالی انجام شد.

آزمون محفظه تاریک و روشن

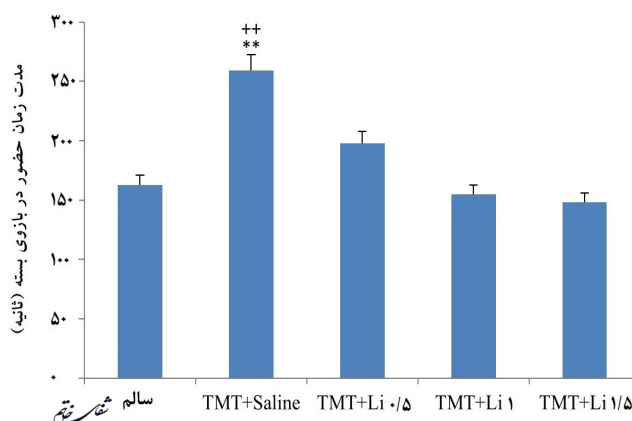
در این آزمون از یک جعبه با دو محفظه جداگانه از جنس پلکسی گلاس به رنگ‌های تیره و روشن که با یک درب گیوتینی از هم جداشده‌اند، استفاده شد. یک لامپ ۴۰ وات در دیواره محفظه روشن تعبیه شده است و در طول مدت آزمایش جهت القای یک محیط سراسر روشن استفاده می‌شود. یک روز قبل از انجام آزمایش موش‌های صحرایی به مدت ۵ دقیقه در محفظه‌های تاریک و روشن جهت آشنایی با محیط قرار می‌گیرند. سپس در زمان آزمایش در محفظه روشن قرار داده شدند و پس از مدت ۱۵ ثانیه درب گیوتینی بین دو محفظه به‌آرامی برداشته شد از این زمان تا زمان ورود حیوان به محفظه تاریک به‌عنوان مدت زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک در نظر گرفته شد و ثبت گردید. همچنین مدت زمان باقی ماندن در هر یک از محفظه‌های تاریک و روشن و تعداد دفعات ورود به محفظه تاریک سنجیده شد.

آزمون محفظه باز

به‌منظور سنجش و مقایسه میزان رفتارهای جستجوگری، اضطراب و فعالیت حرکتی از این آزمون استفاده شد. دستگاه محفظه باز صفحه‌ای مربعی با اضلاع ۷۲ سانتی‌متر می‌باشد که به چهار قسمت ۱۸ سانتی‌متری جهت مشخص نمودن مربع‌های کناری و مرکزی تقسیم شده است. در هر چهار جهت، دیواره‌ای به ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر این صفحه را احاطه کرده است. تعداد دفعات بالا رفتن از دیواره‌های محفظه، دفعات عبور از مربع‌های کناری و نیز مربع‌های مرکزی به‌عنوان شاخص‌هایی برای ارزیابی رفتارهای جستجوگرانه و همچنین، تعداد دفعات دفع حیوان (شاخص سنجش اضطراب حیوان) در طول ۲ دوره زمانی ۵ دقیقه‌ای مورد بررسی قرار گرفت.

سنجش سطح هیپوکامپی BDNF

پس از پایان آزمون‌های رفتاری، حیوانات با تزریق درون صفاقی مخلوطی از دو داروی کتامین هیدرو کلراید (۵۰ میلی گرم/



نمودار ۱- مقایسه میانگین $\pm$ انحراف معیار مدت زمان باقی ماندن در بازوی بسته ماز صلیبی مرتفع در گروه‌های مختلف: نتایج نشان می‌دهد که بین گروه TMT+Saline و سالم اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.01$). از طرفی، بین گروه ۱ و TMT+Li ۱/۵ و TMT+Li با گروه TMT+Saline اختلاف معنی‌دار دیده می‌شود ($P < 0.01$).

¹⁶ Stereoscope

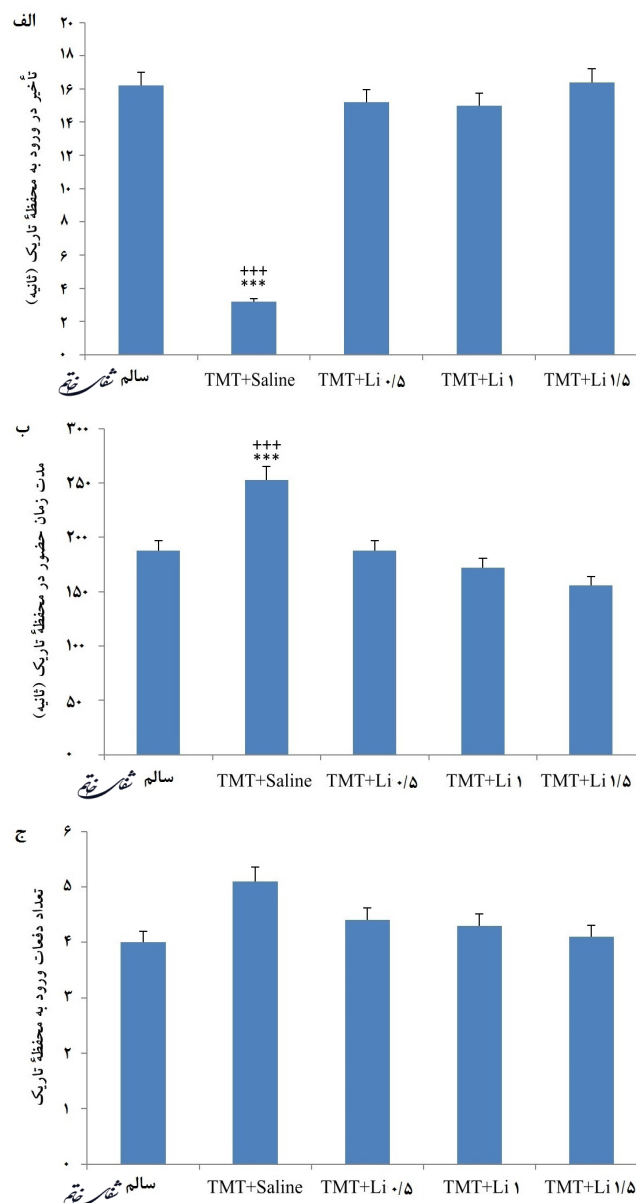
¹⁷ Radioimmunoprecipitation assay buffer

محفظه تاریک، نتایج نشان داد که بین گروه TMT+Saline (۲۱/۹ ± ۲۵۲/۸ ثانیه) و گروه سالم (۱۶/۷ ± ۱۸۷/۶ ثانیه) اختلاف معنی داری وجود داشت ($P < ۰/۰۰۱$) - (نمودار ۲ ب). از طرفی تمامی گروه‌های دریافت‌کننده دوزهای متفاوت لیتیوم کلراید با گروه TMT+Saline اختلاف معنی داری داشتند. به گونه‌ای که بین گروه‌های ۱/۵ TMT+Li (۱۸۷/۴۹ ± ۱۸/۴ ثانیه)، ۱ TMT+Li (۱۵۵/۸۶ ± ۱۴/۴ ثانیه) و ۱/۵ TMT+Li (۱۷۲/۲۷ ± ۱۶/۸ ثانیه) با گروه TMT+Saline در سطح $P < ۰/۰۰۱$ تفاوت دیده شد (نمودار ۲ ب). در تعداد دفعات ورود به محفظه تاریک، نتایج حاصل آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی نشان داد که علیرغم افزایش این تعداد به دنبال مسمومیت با تری متیل تین

۰/۵ میلی اکی والان بر کیلوگرم علیرغم کاهش سطح اضطراب (۱۴/۹ ± ۱۹۷/۸ ثانیه) معنی دار نبود ($P = ۰/۰۶۴$) - (نمودار ۱).

آزمون محفظه تاریک و روشن

نتایج حاصل نشان داد که در تأخیر ورود به محفظه تاریک بین گروه‌های TMT+Saline (۳/۲ ± ۰/۲۳ ثانیه) و سالم (۲/۴ ± ۱۶/۲ ثانیه) در سطح $P < ۰/۰۰۱$ اختلاف معنی داری وجود داشت. همچنین بین گروه‌های ۱/۵ TMT+Li (۲/۱ ± ۱۵/۲ ثانیه)، ۱ TMT+Li (۳/۱ ± ۱۵/۰ ثانیه) و ۱/۵ TMT+Li (۲/۰۸ ± ۱۶/۴ ثانیه) با گروه TMT+Saline اختلاف معنی داری دیده شد ($P < ۰/۰۰۱$) - (نمودار ۲ الف). در میانگین $\pm$ انحراف معیار مدت زمان باقی ماندن در



نمودار ۲- الف) مقایسه میانگین $\pm$ انحراف معیار مدت زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک طی آزمون محفظه تاریک و روشن نشان داد که بین گروه سالم با گروه TMT+Saline در سطح $P < ۰/۰۰۱$ اختلاف معنی داری وجود دارد. همچنین بین گروه‌های ۱/۵ TMT+Li، ۱ TMT+Li و ۱/۵ TMT+Li با گروه TMT+Saline تفاوت معنی داری دیده شد ($P < ۰/۰۰۱$) - (ب). مقایسه میانگین $\pm$ انحراف معیار مدت زمان باقی ماندن در محفظه تاریک نشان داد که بین گروه TMT+Saline و سالم اختلاف معنی داری در سطح $P < ۰/۰۰۱$ وجود دارد. بین کلیه گروه‌های دریافت‌کننده تری متیل تین نیز با گروه TMT+Saline در سطح $P < ۰/۰۰۱$ اختلاف معنی داری دیده می‌شود. ج) مقایسه میانگین $\pm$ انحراف معیار تعداد دفعات ورود به محفظه تاریک نشان داد که بین گروه‌های مورد مطالعه هیچ اختلاف معنی داری وجود ندارد.

متیل تین نسبت به گروه سالم بود ($P < 0.001$) - (نمودار ۳ ب). اگرچه تیمار با لیتیوم کلراید باعث افزایش تعداد دفعات عبور از مربع‌های کناری در گروه‌های آزمون شد اما در بررسی‌های آماری تنها اختلاف بین گروه $1/5$ TMT+Li ($12/1 \pm 10/6$) با گروه TMT+Saline معنی‌دار است ($P < 0.001$) - (نمودار ۳ ب).

شاخص عبور از مربع‌های مرکزی یعنی ورود از مربع‌های کناری به مربع‌های مرکزی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت و علیرغم کاهش تعداد دفعات ورود به مربع‌های مرکزی در گروه TMT+Saline ($0/2 \pm 0/7$)، اختلاف معنی‌داری با گروه سالم ($0/2 \pm 0/9$) مشاهده نشد (نمودار ۳ ج). تجویز لیتیوم کلراید باعث افزایش رفتار اکتشافی و کاهش سطح اضطراب در گروه‌های آزمون شد. به گونه‌ای که تعداد دفعات عبور از مربع‌های مرکزی بیش از گروه TMT+Saline بود. هرچند این اختلاف معنی‌دار نبود.

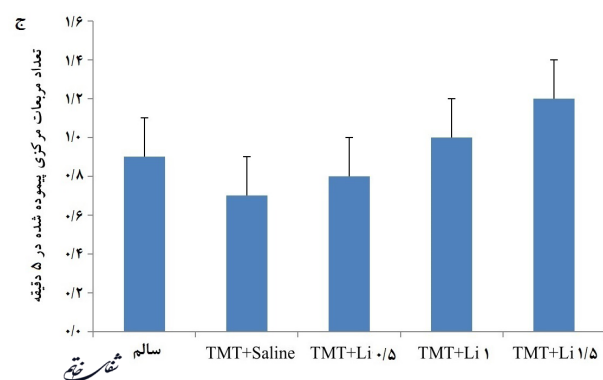
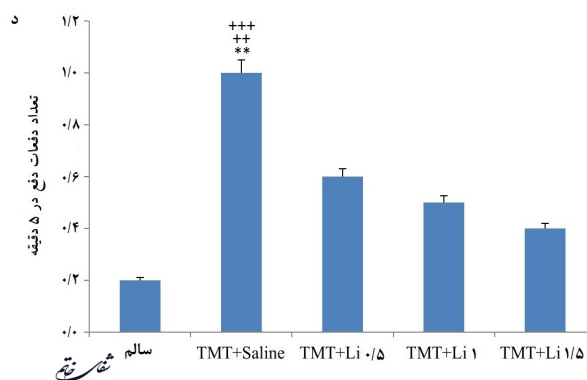
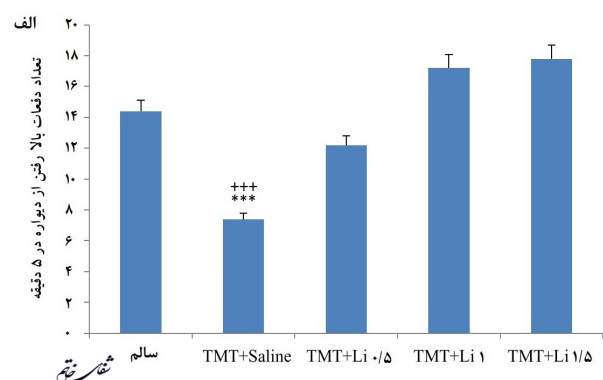
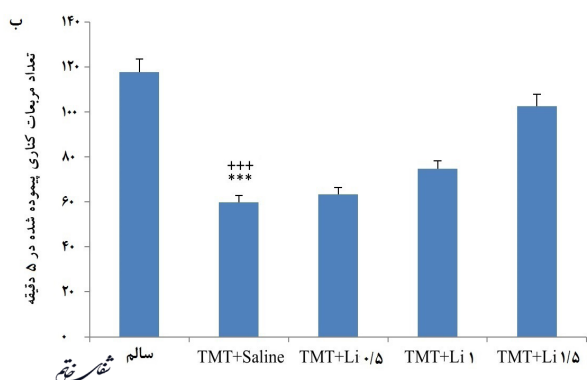
تعداد دفعات دفع حیوان به عنوان یک شاخص برای سنجش میزان اضطراب بین گروه‌های مختلف مورد مقایسه قرار گرفت. تعداد دفعات دفع حیوانات گروه TMT+Saline ($1/0 \pm 0/1$) نسبت به گروه سالم ($0/4 \pm 0/2$)، اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.001$) - (نمودار ۳ د). تعداد دفعات دفع حیوانات گروه‌های دریافت‌کننده لیتیوم کلراید نسبت به گروه TMT+Saline کاهش یافت. از آنجایی که این شاخص نشان‌دهنده میزان اضطراب در جوندگان می‌باشد، کاهش آن به منزله کاهش میزان اضطراب مورد ارزیابی قرار گرفت. به

در گروه TMT+Saline نسبت به گروه سالم و نیز کاهش این تعداد در گروه‌های تیمار شده با لیتیوم کلراید اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه وجود نداشت (نمودار ۳ ج).

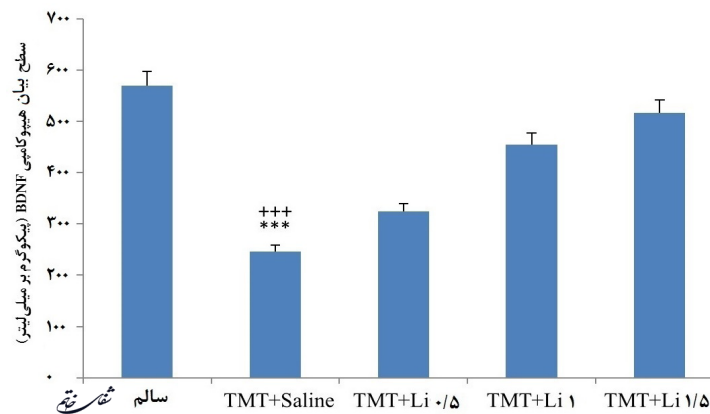
آزمون محفظه باز

به دنبال مسمومیت با تری متیل تین، نتایج بیانگر تفاوت معنی‌داری بین میانگین تعداد دفعات بالا رفتن از دیواره محفظه به عنوان یک رفتار اکتشافی در گروه TMT+Saline ($1/6 \pm 0/4$) نسبت به گروه سالم ($2/3 \pm 14/4$) بود. به گونه‌ای که این تعداد در گروه TMT+Saline نسبت به گروه سالم کاهش نشان داد ($P < 0.001$) - (نمودار ۳ الف). تیمار با لیتیوم کلراید باعث افزایش تعداد دفعات بالا رفتن از دیواره در حیوانات گروه‌های آزمون نسبت به گروه TMT+Saline شد، هرچند نتایج در این ارتباط نشان می‌دهد که این اختلاف در دوزهای ۱ و $1/5$ میلی اکس والان بر کیلوگرم وزن بدن حیوان معنی‌دار بود ($P < 0.001$) - (نمودار ۳ الف).

بررسی تعداد دفعات عبور از مربع‌های کناری در گروه TMT+Saline با گروه سالم تفاوت معنی‌داری را نشان داد. تعداد دفعات عبور از مربع‌های کناری در گروه TMT+Saline ($11/5 \pm 59/8$) به طور معنی‌داری کمتر از گروه سالم ($13 \pm 117/6$) بود. این امر نشان‌دهنده کاهش میزان رفتارهای اکتشافی و فعالیت حرکتی بین موش‌های صحرایی مسموم شده با تری



نمودار ۳- الف) مقایسه میانگین $\pm$ انحراف معیار تعداد دفعات بالا رفتن از دیواره محفظه طی آزمون محفظه باز نشان داد که بین گروه TMT+Saline و سالم اختلاف معنی‌داری در سطح $P < 0.001$ وجود دارد. از طرفی بین گروه‌های ۱ TMT+Li و $1/5$ TMT+Li با گروه TMT+Saline اختلاف معنی‌داری در سطح $P < 0.001$ مشاهده می‌شود. (ب) مقایسه میانگین $\pm$ انحراف معیار تعداد مربع‌های کناری پیموده شده نشان داد بین گروه TMT+Saline با گروه سالم در سطح $P < 0.001$ اختلاف معنی‌داری وجود دارد. همچنین بین گروه $1/5$ TMT+Li با گروه TMT+Saline اختلاف معنی‌داری مشاهده می‌شود ($P < 0.001$). (ج) مقایسه میانگین $\pm$ انحراف معیار تعداد مربع‌های مرکزی پیموده شده هیچ اختلاف معنی‌داری را میان گروه‌ها نشان نداد. (د) مقایسه میانگین $\pm$ انحراف معیار تعداد دفعات دفع حیوان نشان داد بین گروه TMT+Saline و سالم اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.001$). بین گروه ۱ TMT+Li و $1/5$ TMT+Li با گروه TMT+Saline اختلاف معنی‌داری به ترتیب در سطح $P < 0.001$ و $P < 0.001$ مشاهده می‌شود.



نمودار ۴- مقایسه میانگین $\pm$ انحراف معیار سطح بیان هیپوکامپی BDNF. نتایج نشان داد بین گروه TMT+Saline و سالم تفاوت معنی داری در سطح $P < 0.001$ وجود دارد. همچنین بین گروه TMT+Saline با گروه TMT+Li ۱/۵ و TMT+Li ۱ تفاوت معنی داری وجود دارد ($P < 0.001$).

بخش‌های مختلف سیستم عصبی مرکزی و محیطی هستند (۱۵). BDNF یکی از نوروتروفین‌های اصلی است که در سرتاسر زندگی در قشر انتورینال تولید می‌شود و دارای اثرات تروفیک در رشد و تکوین سیستم عصبی می‌باشد. علاوه بر اثرات تروفیک در نورون‌های هدف، BDNF بخشی از مکانیسم تعدیل وابسته به فعالیت سیناپسی محسوب می‌شود (۱۶). این مکانیسم پتانسیل طولانی مدت عملکرد سیناپسی را در هیپوکامپ و قشر مغز ساماندهی می‌کند.

پژوهش‌های مختلف به نقش BDNF در سبب شناسی^{۱۸} استرس و اضطراب اشاره دارند، به گونه‌ای که سطح BDNF اختلالات اضطرابی کاهش می‌یابد (۱۷، ۱۸). با توجه به مشاهده رفتارهای شبه اضطرابی موش‌های صحرایی تیمار شده با تری متیل تین (۱۹) در ماز صلیبی مرتفع و محفظه تاریک و روشن در این مطالعه، نتایج حاکی از آن است که شاید کاهش سطح BDNF که با تیمار با تری متیل تین در هیپوکامپ مشاهده شده است، رفتارهای شبه اضطرابی را به همراه دارد.

مسمومیت با تری متیل تین سبب افزایش فعالیت حرکتی در موش‌های صحرایی و موش‌ها می‌شود (۲۰). هرچند افزایش فعالیت‌های لوکوموتور و پرخاشگری مشاهده شده در حیوانات مختلف بسته به گونه، نژاد، سن، دوز، حامل و یا شیوه تجویز تری متیل تین متفاوت است (۲۱)، این تغییرات رفتاری به دنبال مسمومیت با تری متیل تین در آزمون محفظه باز بررسی شده است و مشاهدات نشان داده‌اند که فعالیت‌های لوکوموتور و خود به خودی پس از مرحله آشناسازی با محیط در موش‌های صحرایی تیمار شده افزایش می‌یابد (۲۲).

بیش فعالی در موش‌های صحرایی تیمار شده با تری متیل تین پس از ۲۱ روز در آزمون محفظه باز دیده شده است. علاوه بر این افزایش فعالیت‌های لوکوموتور با نقص در رفتارهای اجتنابی فعال و غیرفعال نیز همراه شده است که ظاهراً به دلیل آسیب سیستم‌های گاباژیک هیپوکامپ می‌باشد (۲۳)، از این

گونه‌ای که بین گروه‌های TMT+Li ۱ (0.06 ± 0.05) با گروه TMT+Saline در سطح $P < 0.01$ و بین گروه TMT+Li ۱/۵ (0.03 ± 0.04) با گروه TMT+Saline در سطح $P < 0.01$ تفاوت وجود داشت (نمودار ۳ د).

سنجش سطح بیان هیپوکامپی فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز

نتایج حاصل نشان داد که تیمار با تری متیل تین سبب کاهش معنی داری در سطح بیان هیپوکامپی این نوروتروفین گردید. به گونه‌ای که میزان BDNF در عصاره هیپوکامپ گروه TMT+Saline ($245/78 \pm 16/2$ پیکوگرم/میلی لیتر) به میزان قابل توجهی کمتر از گروه سالم ($569/31 \pm 18/7$ پیکوگرم/میلی لیتر) بود ($P < 0.001$) (نمودار ۴). این در حالی است که تیمار با لیتیوم کلراید سبب افزایش قابل توجهی در سطح بیان هیپوکامپی BDNF در گروه‌های آزمون نسبت به گروه TMT+Saline گردید. بدین ترتیب که بین گروه‌های TMT+Li ۱ ($454/64 \pm 16/3$ پیکوگرم/میلی لیتر) و TMT+Li ۱/۵ ($516/05 \pm 17/5$ پیکوگرم/میلی لیتر) با گروه TMT+Saline اختلاف معنی داری دیده شد ($P < 0.001$).

بحث و نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که به دنبال مسمومیت با تری متیل تین میزان اضطراب، بیش فعالی و استرس در حیوانات افزایش یافت. هرچند میزان رفتارهای اکتشافی و سطح بیان BDNF در هیپوکامپ کاهش قابل توجهی نشان داد. به دنبال تیمار با لیتیوم کلراید به ویژه در دوز ۱/۵ میلی اکی والان میزان اضطراب و بیش فعالی کاهش معنی داری را نسبت به گروه دریافت کننده نرمال سالین به تنهایی نشان داد و نیز در میزان رفتارهای اکتشافی و سطح هیپوکامپی BDNF افزایش معنی داری دیده شد.

نوروتروفین‌ها تنظیم‌کننده‌های اصلی تکوین، رشد و تمایز

¹⁸ Etiology

اثر لیتیموم بر ترس و رفتارهای اضطرابی در بسیاری از پژوهش‌ها با تناقض‌هایی رو به رو است. لیتیموم می‌تواند مدت زمان بی‌حرکتی در پاسخ به شوک‌های الکتریکی را به‌عنوان یک رفتار اضطرابی افزایش و یا کاهش دهد و یا هیچ اثری بر آن نداشته باشد (۲۸). لیتیموم به‌صورت مقطعی می‌تواند سطح عمومی اضطراب را طی آزمون ماز صلیبی مرتفع کاهش داده و بیش‌فعالی را نیز تعدیل نماید (۲۹). موش‌های مبتلا به سندرم X شکننده، سطح بالایی از اضطراب و نیز بیش‌فعالی را نشان می‌دهند و مهارکننده GSK-3 سبب مهار این رفتارها می‌شود که این امر نشان‌دهنده دخالت GSK-3 در بیماری‌زایی^{۲۴} سندرم X شکننده است. GSK-3 و در واقع مهار آن با واسطه لیتیموم می‌تواند راهکار درمانی مناسبی برای تعدیل رفتاری در این قبیل حیوانات گردد (۳۰).

در مسمومیت با تری متیل تین که با بیش‌فعالی و سطح بالای اضطراب همراه است، شاید لیتیموم می‌تواند سبب کاهش میزان اضطراب گردد. همچنین لیتیموم سطح فعالیت‌های لوکوموتور و بیش‌فعالی را که به ترتیب در آزمون محفظه باز و ماز صلیبی مرتفع در موش‌های صحرایی مدل ایسکمی مغزی گلوبال^{۲۵} دیده شده است، کاهش می‌دهد (۳۱). در پژوهش حاضر به بررسی اثرات ضد اضطرابی لیتیموم در مدل تحلیل عصبی ناشی از تری متیل تین پرداخته شد و مشاهدات حاکی از کاهش معنی‌دار سطح اضطراب در گروه‌های دریافت‌کننده لیتیموم نسبت به گروه شم در آزمون‌های ماز صلیبی مرتفع و محفظه تاریک و روشن می‌باشد، به‌گونه‌ای که مدت زمان باقی ماندن در بازوی بسته آزمون ماز صلیبی مرتفع و مدت زمان باقی ماندن در محفظه تاریک نسبت به گروه شم کاهش معنی‌داری را نشان داده است. مؤلفه‌های سنجش اضطراب در آزمون محفظه باز مانند مدت زمان سکون و بی‌حرکتی و نیز تعداد دفعات دفع حیوان بعد از تیمار با لیتیموم در گروه‌های آزمون کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه شم از خود نشان داده‌اند.

بنابراین مسمومیت با تری متیل تین که سبب تحلیل عصبی انتخابی در هیپوکامپ و تغییر در بروز رفتارهای مرتبط با این جزء از سیستم لیمبیک می‌گردد، با کاهش سطح BDNF در هیپوکامپ همراه است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که لیتیموم چه‌بسا با تعدیل سطح BDNF سبب بهبود نشانه‌های اضطرابی و کنترل رفتارهای اکتشافی و حرکات لوکوموتور در مدل مسمومیت ناشی از تری متیل تین می‌شود.

رو مدل تحلیل عصبی ناشی از تری متیل تین به‌عنوان مدلی برای ADHD^{۱۹} یا همان بیش‌فعالی همراه با نقص توجه، مورد بررسی قرار می‌گیرد.

پژوهش‌های محدودی در ارتباط با رفتارهای اکتشافی در موش‌های صحرایی تیمار شده با تری متیل تین صورت گرفته است. مسینگ^{۲۰} و همکاران عنوان نموده‌اند که تجویز دهانی تری متیل تین سبب کاهش رفتارهای اکتشافی در موش‌های صحرایی می‌شود و علت این مسئله را اختلال در انتقال عصبی نوروآدرنرژیک می‌دانند (۲۴). میگنینی^{۲۱} و همکاران نیز نشان داده‌اند که پس از تجویز تری متیل تین مدت زمان حرکات گریزی جانور کاهش می‌یابد که نشان‌دهنده تمایل کم موش‌های صحرایی تیمار شده با تری متیل تین جهت کشف یک محیط جدید است (۲۵).

این پژوهش نشان داد که نه تنها تعداد حرکات گریزی موش‌های صحرایی تیمار شده با تری متیل تین نسبت به گروه کنترل کاهش می‌یابد که می‌تواند در کاهش تعداد دفعات بالا رفتن از دیواره ماز طی آزمون محفظه باز تفسیر گردد، بلکه تعداد مربعات مرکزی و کناری پیموده شده در گروه شم کمتر از گروه کنترل می‌باشد. با این حال می‌توان گفت که مسمومیت با تری متیل تین چه‌بسا سبب نقص در رفتارهای اکتشافی حیوان می‌گردد، هرچند مطالعات بیشتری در این زمینه باید صورت گیرد.

لیتیموم کاتیونی تک ظرفیتی است که آبشار سلولی نوروتروفیک و محافظت‌کننده عصبی^{۲۲} را فعال می‌نماید. تجویز لیتیموم سبب افزایش بیان BDNF در مغز جوندگان به‌ویژه در هیپوکامپ و قشر پیشانی می‌گردد و همچنین پژوهش‌ها نشان داده‌اند که اثرات نوروتروفیک لیتیموم در نورون‌های قشری نیازمند بیان BDNF می‌باشد (۲۶)، لذا از آنجایی که تیمار با تری متیل تین سبب کاهش محتوای BDNF در مغز به‌ویژه هیپوکامپ می‌گردد و بیان گیرنده‌های BDNF و نیز مسیر پیام‌رسانی^{۲۳} آن در پی مسمومیت با تری متیل تین کاهش می‌یابد، تجویز دراز مدت لیتیموم می‌تواند با مکانیسمی جبرانی، جلوی کاهش سطح BDNF را بگیرد و از این رو موش‌های صحرایی را از حوادث تحلیل برنده عصبی ناشی از تری متیل تین و القاء اثرات رفتاری متعاقب آن نظیر افسردگی (۲۷) و رفتارهای اضطرابی نظیر آنچه در مطالعه حاضر دیده شده است، مصون نگه می‌دارد.

¹⁹ Attention deficit hyperactivity disorder

²⁰ Messing

²¹ Mignini

²² Neuroprotective

²³ Signaling

²⁴ Pathogenesis

²⁵ Global

1. Cui Z, Zhang K, Zhou Q, Liu J, Jiang G. Determination of methyltin compounds in urine of occupationally exposed and general population by in situ ethylation and headspace SPME coupled with GC-FPD. *Talanta*. 2011; 85(2): 1028-33.
2. Chen J, Huang C, Zheng L, Simonich M, Bai C, Tanguay R, et al. Trimethyltin chloride (TMT) neurobehavioral toxicity in embryonic zebrafish. *Neurotoxicol Teratol*. 2011; 33(6): 721-26.
3. Mundy WR, Freudenrich TM. Apoptosis of cerebellar granule cells induced by organotin compounds found in drinking water: involvement of MAP kinases. *Neurotoxicology*. 2006; 27(1): 71-81.
4. Corvino V, Marchese E, Giannetti S, Lattanzi W, Bonvissuto D, Biamonte F, et al. The neuroprotective and neurogenic effects of neuropeptide Y administration in an animal model of hippocampal neurodegeneration and temporal lobe epilepsy induced by trimethyltin. *J Neurochem*. 2012; 122(2): 415-26.
5. Trabucco A, Di Pietro P, Nori SL, Fulceri F, Fumagalli L, Paparelli A, et al. Methylated tin toxicity a reappraisal using rodents models. *Arch Ital Biol*. 2009; 147(4): 141-53.
6. Park HJ, Shim HS, Choi WK, Kim KS, Bae H, Shim I. Neuroprotective effect of lucium chinense fruit on trimethyltin-Induced learning and memory deficits in the rats. *Exp Neurobiol*. 2011; 20(3): 137-43.
7. Corvino V, Marchese E, Zarkovic N, Zarkovic K, Cindric M, Waeg G, et al. Distribution and timecourse of 4-hydroxynonenal, heat shock protein 110/105 family members and cyclooxygenase-2 expression in the hippocampus of rat during trimethyltin-induced neurodegeneration. *Neurochem Res*. 2011; 36(8): 1490-500.
8. Andjus PR, Bataveljic D, Vanhoutte G, Mitrecic D, Pizzolante F, Djogo N, et al. In vivo morphological changes in animal models of amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer's-like disease: MRI approach. *Anat Rec*. 2009; 292(12): 1882-92.
9. Lei P, Ayton S, Bush AI, Adlard PA. GSK-3 in neurodegenerative diseases. *Int J Alzheimers Dis*. 2011; 2011:189246. doi: 10.4061/2011/189246.
10. Tso CY, Chiu KH, Cheung KW. Ceramic insert dislodgment after revision ceramic-on-ceramic total hip arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2010; 25(4): 660-7.
11. Quiroz JA, Machado-Vieira R, Zarate CA Jr, Manji HK. Novel insights into lithium's mechanism of action: neurotrophic and neuroprotective effects. *Neuropsychobiology*. 2010; 62(1): 50-60.
12. Chiu CT, Chuang DM. Neuroprotective action of lithium in disorders of the central nervous system. *Zhong Nan Da Xue Bao Yi Xue Ban*. 2011; 36(6): 461-76.
13. Su H, Zhang W, Guo J, Guo A, Yuan Q, Wu W. Lithium enhances the neuronal differentiation of neural progenitor cells in Vitro and after transplantation in the avulsed ventral horn of adult rats through the secretion of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem*. 2009; 108(6): 1385-98.
14. Wada A. Lithium and neuropsychiatric therapeutics: Neuroplasticity via glycogen synthase kinase-3 β , β -catenin, and neurotrophin cascades. *J Pharmacol Sci*. 2009; 110(1): 14-28.
15. Nykjaer A, Willnow TE, Petersen CM. p75NTR-live or let die. *Curr Opin Neurobiol*. 2005; 15(1): 49-57.
16. Yano H, Chao MV. Mechanisms of neurotrophin receptor vesicular transport. *J Neurobiol*. 2004; 58(2): 244-57.
17. Pandey DK, Yadav SK, Mahesh R, Rajkumar R. Depression-like and anxiety-like behavioural aftermaths of impact accelerated traumatic brain injury in rats: a model of comorbid depression and anxiety? *Behav Brain Res*. 2009; 28; 205(2): 436-42.
18. Ravenelle R, Byrnes EM, Byrnes JJ, McInnis C, Park JH, Donaldson ST. Environmental enrichment effects on the neurobehavioral profile of selective out bred trait anxiety rats. *Behav Brain Res*. 2013; 252: 49-57.
19. Jiang C, Salton SR. The role of neurotrophins in major depressive disorder. *Transl Neurosci*. 2013; 1; 4(1): 46-58.
20. Geloso MC, Corvino V, Michetti F. Trimethyltin-induced hippocampal degeneration as a tool to investigate neurodegenerative processes. *Neurochemistry Int*. 2011; 58(7): 729-38.
21. Harry GJ, Lefebvre d'Hellencourt C. Dentate Gyrus: alterations that occur with hippocampal injury. *Neurotoxicology*. 2003; 24(3): 343-56.
22. Hlinak Z, Krejci I, Hynie S, Klenerova V. Dipeptide

“alaptide” prevented impairments in spontaneous behavior produced with trimethyltin in male rats. *Neuro Endocrinol Lett.* 2008; 29(6): 917-23.

23. Earley B, Burke M, Leonard BE. Behavioural, biochemical and histological effects of trimethyltin (TMT) induced brain damage in the rat. *Neurochem Int.* 1992; 21(3): 351-66.

24. Messing RB, Devauges V, Sara SJ. Limbic forebrain toxin trimethyltin reduces behavioral suppression by clonidine. *Pharmacol Biochem Behav.* 1992; 42(2): 313-6.

25. Mignini F, Nasuti C, Artico M, Giovannetti F, Fabrizi C, Fumagalli L, et al. Effects of trimethyltin on hippocampal dopaminergic markers and cognitive behaviour. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2012; 25(4): 1107-19.

26. Hashimoto R, Takei N, Shimazu K, Christ L, Lu B, Chuang DM. Lithium induces brain derived neurotrophic factor and activates TrkB in rodent cortical neurons: an essential step for neuroprotection against glutamate excitotoxicity. *Neuropharmacology.* 2002; 43(7): 1173-9.

27. Moghadas M, Edalatmanesh M, Hosseini M. Effect of lithium chloride on serum levels of BDNF, TNF- α , and wet weight of brain in an animal model of depression. *Shefaye Khatam.* 2014; 2 (4): 9-19.

28. Youngs RM, Chu MS, Meloni EG, Naydenov A, Carlezon WA Jr, Konradi C. Lithium administration to preadolescent rats causes long-lasting increases in anxiety-like behavior and has molecular consequences. *J Neurosci.* 2006; 26(22): 6031-9.

29. Liu ZH, Chuang DM, Smith CB. Lithium ameliorates phenotypic deficits in a mouse model of fragile X syndrome. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2011; 14(5): 618-30.

30. Yuskaitis CJ, Mines MA, King MK, Sweatt JD, Miller CA, Jope RS. Lithium ameliorates altered glycogen synthase kinase-3 and behavior in a mouse model of fragile X syndrome. *Biochem Pharmacol.* 2010; 79(4): 632-46.

31. Yan XB, Wang SS, Hou HL, Ji R, Zhou JN. Lithium improves the behavioral disorder in rats subjected to transient global cerebral ischemia. *Behav Brain Res.* 2007; 177(2): 282-9.