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 لیتیوم 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 دریافت: ۲۳ اسفند ۱۳۹۳
تاریخ پذیرش: ۲۴ فروردین ۱۳۹۴

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 لیتیوم 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 میلی‌گرم/کیلوگرم) به‌صورت درون صفاقی به موش‌های صحرایی تزریق گردید. گروه‌های آزمون (TMT+Li) به‌ترتیب دوزهای ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی اکی والان/کیلوگرم از لیتیوم 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، محفظهٔ تاریک -روشن و محفظهٔ باز استفاده شد. سپس سطح هیپوکامپی فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز با استفاده از الایزا اندازه‌گیری شد. **یافته‌ها:** نتایج یک افزایشی را در رفتارهای اضطرابی و یک کاهشی را در رفتارهای اکتشافی نشان دادند. به‌علاوه سطح هیپوکامپی فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز در موش‌های صحرایی در معرض قرار گرفته با تری متیل تین کاهش یافت. اگرچه تیمار با لیتیوم کلراید اثرات معنی‌داری را بر کاهش میزان اضطراب با تعدیل رفتارهای اکتشافی در آزمون‌های رفتاری نشان داد. **نتیجه گیری:** لیتیوم کلراید که اثرات حمایت‌کنندهٔ عصبی کافی دارد، می‌تواند به‌عنوان یک راهکاری به‌منظور 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. لیتیوم کلراید
۵. فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز

* **نویسنده مسئول:** محمد امین عدالت منش
آدرس الکترونیکی: *amin.edalatmanesh@gmail.com*

مقدمه

تری متیل تین کلراید[1] (C_3H_9Clsn) ارگانوتینی[2] متیله شده است که کاربردهای زیادی در صنایع به‌عنوان حلال رنگ، تعدیل‌کننده در PVC[3]، آفت‌کش‌ها و جلادهندهٔ چوب دارد (۱). تری متیل تین به‌عنوان یک تعدیل‌کنندهٔ تولید پلاستیک سبب ۶۷ نوع مسمومیت در سراسر دنیا شده و ۱۸۴۹ نفر را به‌طور حاد بین سال‌های ۱۹۸۷ تا ۲۰۰۸ متأثر کرده است (۲). در سال ۱۹۹۴ تولید ارگانوتین‌ها نزدیک به ۵۰۰۰۰ تن در سال بود. تری آلکیل[4] ارگانوتین‌ها به‌طور عمده در حشره‌کش‌ها کاربرد دارند (۳).

تری متیل تین باعث القاء آسیب انتخابی و مرگ نورونی در سیستم عصبی انسان و جوندگان می‌شود و دارای اثرات نوروتوکسیک[5] بالقوه‌ای است (۴). مطالعات رفتاری نشان داده‌اند که به دنبال مسمومیت با تری متیل تین، افزایش نقص حرکتی، اختلال در یادگیری و حافظهٔ فضایی، بیش فعالی، پرخاشگری و افسردگی رخ می‌دهد. در انسان مسمومیت با این ترکیب حالت تهوع، صرع، آشفتگی‌های خواب، افسردگی و نقص در حافظهٔ دراز مدت و یادگیری را باعث می‌شود (۷-۵).

تزریق درون صفاقی تری متیل تین در مدل‌های حیوانی آزمایشگاهی باعث مرگ نورونی گسترده‌ای در سیستم لیمبیک و هیپوکامپ می‌شود. مکانیسم‌های آپوپتوز ناشی از تری متیل تین هنوز به‌درستی مشخص نیستند. سمیّت تحریکی وابسته به گلوتامات به‌عنوان یک کاندید اصلی در میان سایر مکانیسم‌ها مطرح می‌باشد. در همهٔ موارد مرگ سلولی توسط تری متیل تین، نشان داده شده که این واقعه با میزان بالای کلسیم داخل سلولی مرتبط می‌باشد (۸، ۷). مطالعاتی که در مورد تحلیل عصبی[6] ناشی از تری متیل تین انجام شده‌اند، نشان داده‌اند که مسمومیت با تری متیل تین شاید سبب کاهش بیان فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF)[7] در نواحی مختلف سیستم عصبی مرکزی و از جمله هیپوکامپ می‌گردد و سطح بیان Bcl2[8]، Bcl2L1[9] و BDNF به دنبال تیمار با تری متیل تین در هیپوکامپ کاهش می‌یابند (۴).

لیتیوم کاتیونی تک ظرفیتی است که با داشتن ویژگی نوروتروفیک باعث کند کردن پیشرفت آتروفی عصبی شده و در نتیجه از مرگ سلول‌های عصبی جلوگیری می‌کند (۱۰، ۹). لیتیوم قادر است آشفتگی‌های رفتاری و شناختی را در مدل حیوانی بیماری‌های تحلیل برندهٔ عصبی[10] مانند صدمات مغزی، ALS[11]، سندرم X شکننده[12]، بیماری هانتینگتون[13]، آلزایمر و پارکینسون بهبود بخشد (۱۲، ۱۱).

پژوهش‌ها نشان داده‌اند که لیتیوم، فسفریلاسیون پروتئین Tau را از راه مهار GSK-3[14] کاهش می‌دهد، با این مکانیسم بیان BDNF افزایش یافته و سبب افزایش بقای سلول‌ها می‌گردد.

درمان با لیتیوم در بیماران آلزایمری سبب افزایش قابل توجهی در سطح BDNF می‌شود (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 سمّیت تری متیل تین بر سطح اضطراب، فعالیت حرکتی و جستجوگری و نیز سطح هیپوکامپی فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز در موش‌های صحرایی می‌باشد. همچنین اثرات ضد اضطرابی لیتیوم کلراید در این مدل مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

حیوانات و گروه‌های آزمایشی

در این مطالعه از ۵۰ سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگ داولی[15] با میانگین وزنی ۱۰±۲۵۰ گرم استفاده شد. این حیوانات در مرکز پرورش و تکثیر حیوانات دانشگاه علوم و تحقیقات فارس پرورش یافتند و تحت شرایط استاندارد دمایی (۲± ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد) و رطوبت (۱۰±۵۰ درصد) و چرخهٔ روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعت نگهداری شدند. کلیهٔ مراحل کار با حیوانات طبق قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی و با نظارت کمیتهٔ اخلاقی دانشگاه انجام شد. حیوانات در ۵ گروه به تفکیک زیر تقسیم شدند: گروه سالم: حیوانات این گروه هیچ نوع تیماری نداشته و به‌منظور بررسی‌های رفتاری و بیوشیمیایی با سایر گروه‌های مورد مطالعه استفاده شد. گروه (TMT+Saline): حیوانات این گروه تک‌دوز تری متیل تین (۸ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن، درون صفاقی) را دریافت نمودند و سپس به مدت ۱۴ روز حلال لیتیوم کلراید یعنی نرمال سالین را به‌صورت درون صفاقی دریافت داشتند. گروه‌های TMT+Li۰/۵، TMT+Li۱ و TMT+Li۱/۵. این گروه‌ها پس از مسمومیت با تک‌دوز تری متیل تین، به مدت ۱۴ روز به ترتیب دوزهای ۰/۵، 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 به‌منظور سنجش میزان اضطراب در حیوانات گروه‌های مختلف پس از اتمام دورهٔ تیمار با لیتیوم کلراید صورت گرفت. ماز صلیبی مرتفع شامل دو بازوی باز و دو بازوی بستهٔ مقابل هم است. عرض بازوها ۱۰ سانتی‌متر، طول آن‌ها ۵۰ سانتی‌متر و ارتفاع ماز از سطح زمین ۶۰ سانتی‌متر می‌باشد. پس از آشنایی با محیط ماز که ۱۵ دقیقه قبل از انجام آزمایش صورت می‌گیرد، حیوان به‌آرامی در مرکز ماز قرار داده می‌شود. آنگاه به مدت ۵ دقیقه عملکرد حیوان در ماز مورد بررسی قرار می‌گیرد. 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

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

آزمون محفظهٔ تاریک و روشن

در این آزمون از یک جعبه با دو محفظهٔ 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 دیوارهٔ محفظهٔ 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 محفظهٔ 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 محفظهٔ تاریک به‌عنوان مدت زمان تأخیر در ورود به محفظهٔ 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 محفظهٔ تاریک سنجیده شد.

آزمون محفظهٔ باز

به‌منظور سنجش و مقایسهٔ میزان رفتارهای جستجوگری، اضطراب و فعالیت حرکتی از این آزمون استفاده شد. دستگاه محفظهٔ 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 دورهٔ 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 میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم/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[16] از بقیهٔ قسمت‌های مغز جدا شد و به‌سرعت با استفاده از ازت مایع منجمد گردید. آنگاه با قرار دادن در هاون چینی و ضربه زدن، بافت مغز متلاشی شد و با افزودن ۱ میلی‌لیتر از بافر RIPA[17] و سانتریفیوژ در دور rpm ۴۰۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه، محلول رویی جدا گردید و جهت سنجش میزان BDNF به روش الایزا مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیز آماری

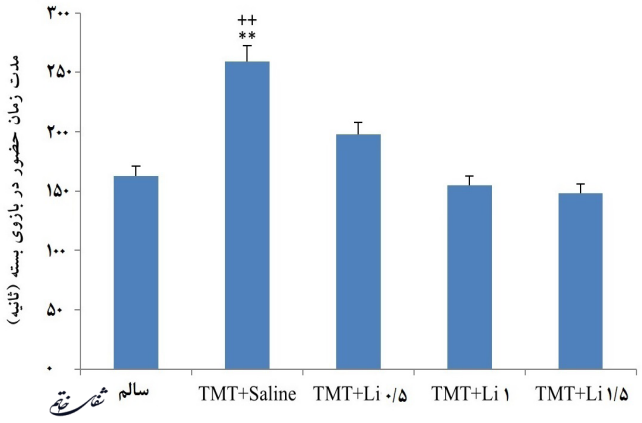
تجزیه و تحلیل آماری بین گروه‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۲۲ انجام شد. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش داده شد. به‌منظور تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد نظر از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. از نظر آماری مقادیر $P<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

آزمون ماز صلیبی مرتفع

نتایج نشان‌دهندهٔ افزایش معنی‌داری در سطح اضطراب حیوانات به دنبال مسمومیت با تری متیل تین بود. بدین ترتیب، مدت زمان باقی ماندن حیوانات گروه TMT+Saline (۱۴/۸ ± ۲۵۹/۴ ثانیه) در بازوی بستهٔ ماز صلیبی بیشتر از این مدت زمان در گروه سالم (۱۲/۹±۱۶۲/۸ ثانیه) بود ($P<۰/۰۱$).

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 (۱۲/۳ ± ۱۵۵ ثانیه) و TMT+Li ۱/۵ (۱۳/۸ ± ۱۴۸/۴ ثانیه) با گروه TMT+Saline اختلاف معنی‌داری دیده شد ($P<۰/۰۱$). از طرف دیگر، تجویز لیتیوم کلراید در دوز



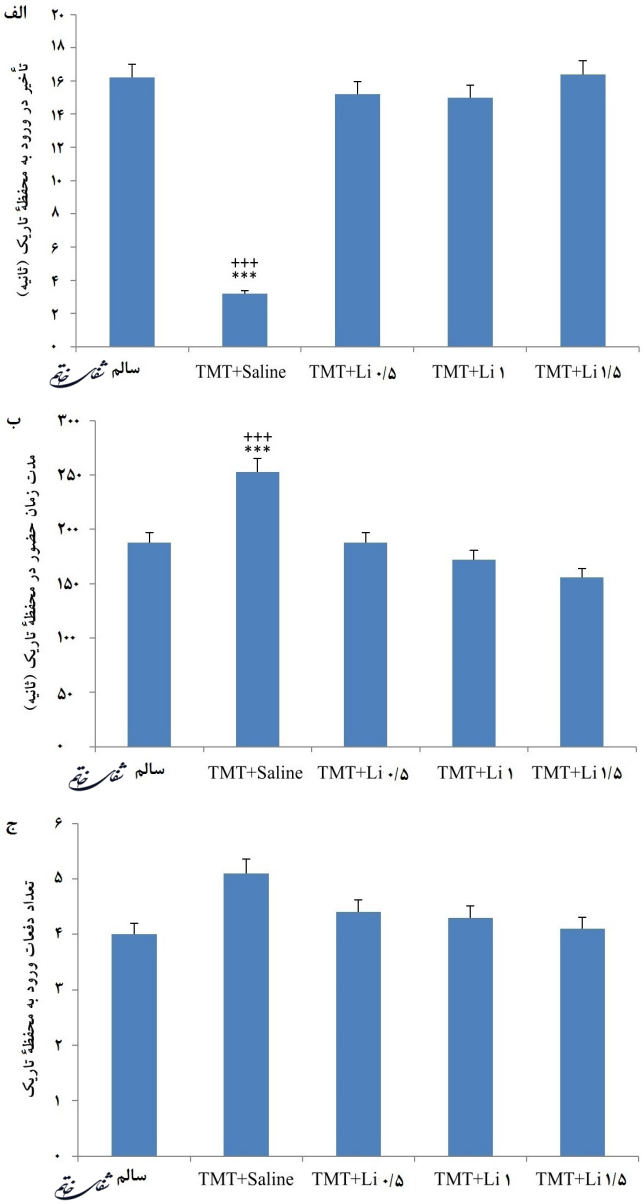
نمودار ۱- مقایسهٔ میانگین ± انحراف معیار مدت زمان باقی ماندن در بازوی بستهٔ ماز صلیبی مرتفع در گروه‌های مختلف: نتایج نشان می‌دهد که بین گروه TMT+Saline و سالم اختلاف معنی‌داری وجود دارد (**$P<۰/۰۱$). از طرفی، بین گروه ۱ TMT+Li و ۱/۵ TMT+Li با گروه TMT+Saline اختلاف معنی‌دار دیده می‌شود (++$P<۰/۰۱$).

[16] Stereoscope
[17] Radioimmunoprecipitation assay buffer

۰/۵ میلی اکی والان بر کیلوگرم علیرغم کاهش سطح اضطراب (۱۴/۹ ± ۱۹۷/۸ ثانیه) معنی‌دار نبود ($P=0/064$)-(نمودار ۱).

آزمون محفظهٔ تاریک و روشن

نتایج حاصل نشان داد که در تأخیر ورود به محفظهٔ تاریک بین گروه‌های TMT+Saline (۰/۲۳ ± ۳/۲ ثانیه) و سالم (۲/۴ ± ۱۶/۲ ثانیه) در سطح $P<0/001$ اختلاف معنی‌داری وجود داشت. همچنین بین گروه‌های TMT+L۰/۵ (۲/۱ ± ۱۵/۲ ثانیه)، TMT+Li ۱ (۳/۰۱ ± ۱۵/۰ ثانیه) و TMT+Li ۱/۵ (۲/۰۸ ± ۱۶/۴ ثانیه) با گروه TMT+Saline اختلاف معنی‌داری دیده شد ($P<0/001$)-(نمودار ۲ الف). در میانگین ± انحراف معیار مدت زمان باقی ماندن در محفظهٔ تاریک، نتایج نشان داد که بین گروه TMT+Saline (۲۱/۹ ± ۲۵۲/۸ ثانیه) و گروه سالم (۱۶/۷ ± ۱۸۷/۶ ثانیه) اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<0/001$)-(نمودار ۲ ب). از طرفی تمامی گروه‌های دریافت‌کنندهٔ دوزهای متفاوت لیتیوم کلراید با گروه TMT+Saline اختلاف معنی‌داری داشتند. به‌گونه‌ای که بین گروه‌های TMT+Li ۰/۵ (۱۸/۴ ± ۱۸۷/۴۹ ثانیه)، TMT+Li ۱ (۱۶/۸ ± ۱۷۲/۲۷ ثانیه) و TMT+Li ۱/۵ (۱۴/۴ ± ۱۵۵/۸۶ ثانیه) با گروه TMT+Saline در سطح $P<0/001$ تفاوت دیده شد (نمودار ۲ ب). در تعداد دفعات ورود به محفظهٔ تاریک، نتایج حاصل آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی نشان داد که علیرغم افزایش این تعداد به دنبال مسمومیت با تری متیل تین



نمودار ۲- الف) مقایسهٔ میانگین ± انحراف معیار مدت زمان تأخیر در ورود به محفظهٔ تاریک طی آزمون محفظهٔ تاریک و روشن نشان داد که بین گروه سالم با گروه TMT+Saline در سطح $P<0/001$*** اختلاف معنی‌داری وجود دارد. همچنین بین گروه‌های TMT+Li ۰/۵، TMT+Li ۱ و TMT+Li ۱/۵ با گروه TMT+Saline تفاوت معنی‌داری دیده شد ($P<0/001$+++). ب) مقایسه میانگین± انحراف معیار مدت زمان باقی ماندن در محفظهٔ تاریک نشان داد که بین گروه TMT+Saline و سالم اختلاف معنی‌داری در سطح $P<0/001$*** وجود دارد. بین کلیهٔ گروه‌های دریافت کنندهٔ تری متیل تین نیز با گروه TMT+Saline در سطح $P<0/001$+++ اختلاف معنی‌داری دیده می‌شود. ج) مقایسهٔ میانگین ± انحراف معیار تعداد دفعات ورود به محفظهٔ تاریک نشان داد که بین گروه‌های مورد مطالعه هیچ اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

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 ۲ ج).

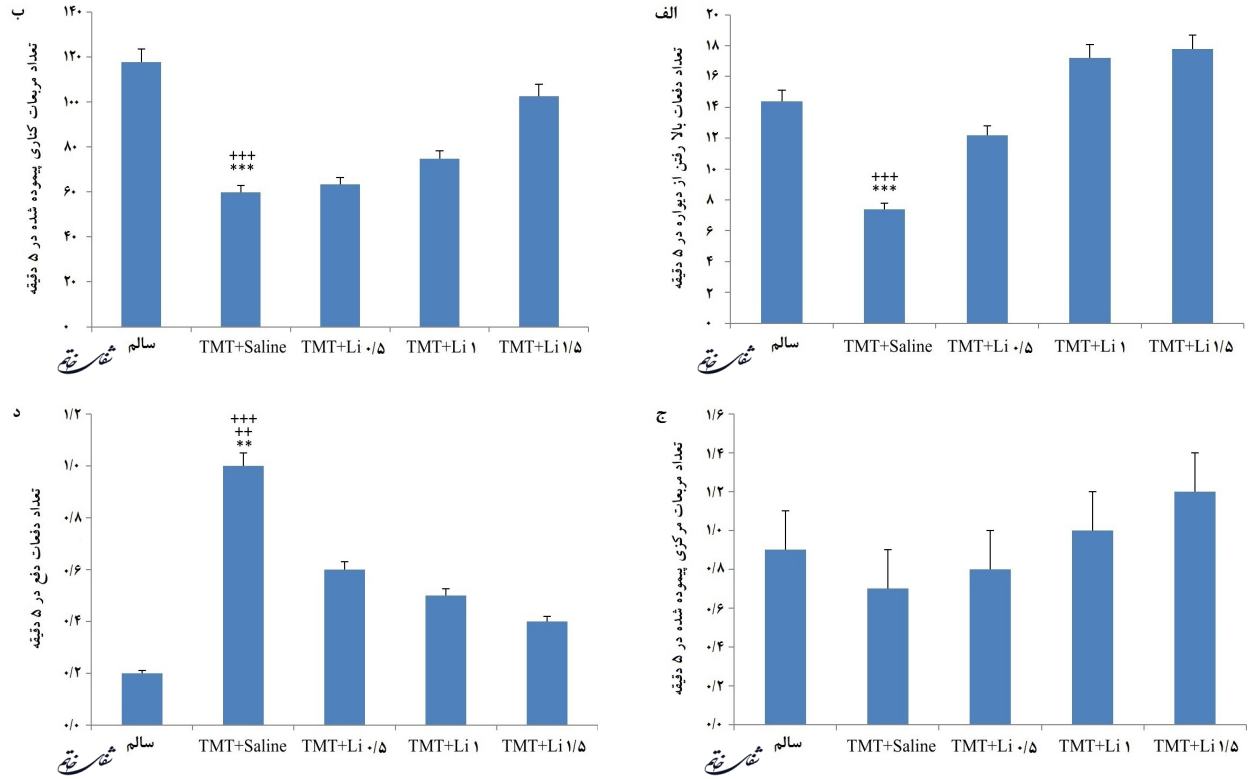
آزمون محفظهٔ باز

به دنبال مسمومیت با تری متیل تین، نتایج بیانگر تفاوت معنی‌داری بین میانگین تعداد دفعات بالا رفتن از دیوارهٔ محفظه به‌عنوان یک رفتار اکتشافی در گروه TMT+Saline (۱/۶ ± ۷/۴) نسبت به گروه سالم (۲/۳ ± ۱۴/۴) بود. به‌گونه‌ای که این تعداد در گروه TMT+Saline نسبت به گروه سالم کاهش نشان داد ($P<۰/۰۰۱$)-(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 ۱/۵ میلی اکی والان بر کیلوگرم وزن بدن حیوان معنی‌دار بود ($P<۰/۰۰۱$)-(نمودار ۳ الف).

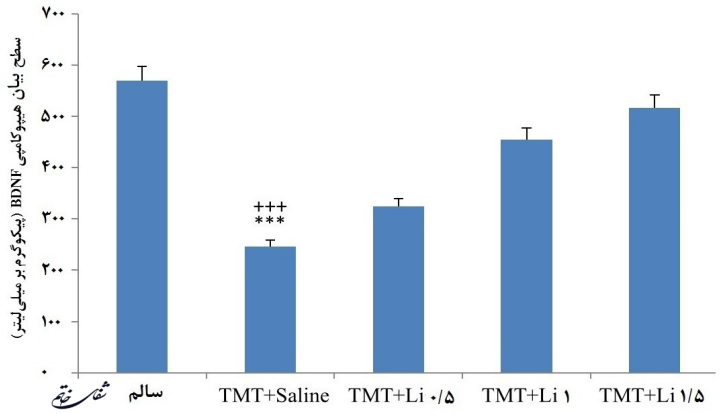
بررسی تعداد دفعات عبور از مربع‌های کناری در گروه TMT+Saline با گروه سالم تفاوت معنی‌داری را نشان داد. تعداد دفعات عبور از مربع‌های کناری در گروه TMT+Saline (۱۱/۵ ± ۵۹/۸) به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه سالم (۱۳ ± ۱۱۷/۶) بود. این امر نشان‌دهندهٔ کاهش میزان رفتارهای اکتشافی و فعالیت حرکتی بین موش‌های صحرایی مسموم شده با تری متیل تین نسبت به گروه سالم بود ($P<۰/۰۰۱$)-(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 TMT+Li ۱/۵ (۱۲/۱ ± ۱۰۲/۶) با گروه TMT+Saline معنی‌دار است ($P<۰/۰۰۱$)-(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 (۰/۲ ± ۰/۷)، اختلاف معنی‌داری با گروه سالم (۰/۲ ± ۰/۹) 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 (۰/۱ ± ۱/۰) نسبت به گروه سالم (۰/۰۴ ± ۰/۲)، اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P<۰/۰۱$)-(نمودار ۳ د). تعداد دفعات دفع حیوانات گروه‌های دریافت کنندهٔ لیتیوم کلراید نسبت به گروه TMT+Saline کاهش یافت. از آنجایی که این شاخص نشان‌دهندهٔ میزان اضطراب در جوندگان می‌باشد، کاهش آن به منزلهٔ کاهش میزان اضطراب مورد ارزیابی قرار گرفت. به



نمودار ۳- الف) مقایسهٔ میانگین ± انحراف معیار تعداد دفعات بالا رفتن از دیوارهٔ محفظه طی آزمون محفظهٔ باز نشان داد که بین گروه TMT+Saline و سالم اختلاف معنی‌داری در سطح $P<۰/۰۰۱^{***}$ وجود دارد. از طرفی بین گروه‌های TMT+Li ۱ و TMT+Li ۱/۵ با گروه TMT+Saline اختلاف معنی‌داری در سطح $P<۰/۰۰۱^{+++}$ مشاهده می‌شود. ب) مقایسهٔ میانگین ± انحراف معیار تعداد مربع‌های کناری پیموده شده نشان داد بین گروه TMT+Saline با گروه سالم در سطح $P<۰/۰۰۱^{***}$ اختلاف معنی‌داری وجود دارد. همچنین بین گروه TMT+Li ۱/۵ با گروه TMT+Saline اختلاف معنی‌داری مشاهده می‌شود ($P<۰/۰۰۱^{+++}$). ج) مقایسهٔ میانگین ± انحراف معیار تعداد مربع‌های مرکزی پیموده شده هیچ اختلاف معنی‌داری را میان گروه‌ها نشان نداد. د) مقایسهٔ میانگین ± انحراف معیار تعداد دفعات دفع حیوان نشان داد بین گروه TMT+Saline و سالم اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۱^{**}$). بین گروه TMT+Li ۱ و TMT+Li ۱/۵ با گروه TMT+Saline اختلاف معنی‌داری به ترتیب در سطح $P<۰/۰۱^{++}$ و $P<۰/۰۰۱^{+++}$ مشاهده می‌شود.



نمـودار ۴- مقایسـهٔ میانگیـن ± انحـراف معیـار سـطح بیـان هیپوکامپـی BDNF. نتایـج نشـان داد بیـن گـروه TMT+Saline و سـالم تفـاوت معنـی‌داری در سـطح $P<۰/۰۰۱$*** وجـود دارد. همچنیـن بیـن گـروه TMT+Li ۱ و TMT+Li ۱/۵ بـا گـروه TMT+Saline اختـلاف معنـی‌داری وجـود دارد ($P<۰/۰۰۱$***).

گونه‌ای که بین گروه‌های TMT+Li ۱ (۰/۰۶ ± ۰/۵) با گروه TMT+Saline در سطح $P<۰/۰۱$ و بین گروه TMT+Li ۱/۵ (۰/۰۳ ± ۰/۴) با گروه TMT+Saline در سطح $P<۰/۰۰۱$ 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 معنی‌داری در سطح بیان هیپوکامپی این نوروتروفین گردید. به‌گونه‌ای که میزان BDNF در عصارهٔ هیپوکامپ گروه TMT+Saline (۱۶/۲ ± ۲۴۵/۷۸ پیکوگرم/میلی‌لیتر) به میزان قابل توجهی کمتر از گروه سالم (۱۸/۷ ± ۵۶۹/۳۱ پیکوگرم/میلی‌لیتر) بود ($P<۰/۰۰۱$)-(نمودار۴). 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 (۱۶/۳±۴۵۴/۶۴ پیکوگرم/میلی‌لیتر) و TMT+Li ۱/۵ (۱۷/۵ ± ۵۱۶/۰۵ پیکوگرم/میلی‌لیتر) با گروه TMT+Saline اختلاف معنی‌داری دیده شد ($P<۰/۰۰۱$).

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 به‌ویژه در دوز ۱/۵ میلی اکی والان میزان اضطراب و بیش فعالی کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه دریافت‌کنندهٔ نرمال سالین به‌تنهایی نشان داد و نیز در میزان رفتارهای اکتشافی و سطح هیپوکامپی BDNF افزایش معنی‌داری دیده شد.

نوروتروفین‌ها تنظیم‌کننده‌های اصلی تکوین، رشد و تمایز 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[18] استرس و اضطراب اشاره دارند، به‌گونه‌ای که سطح BDNF در اختلالات اضطرابی کاهش می‌یابد (۱۸، ۱۷). با توجه به مشاهدهٔ رفتارهای شبه اضطرابی موش‌های صحرایی تیمار شده با تری متیل تین (۱۹) در ماز صلیبی مرتفع و محفظهٔ 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 شیوهٔ تجویز تری متیل تین متفاوت است (۲۱)، این تغییرات رفتاری به دنبال مسمومیت با تری متیل تین در آزمون محفظهٔ باز بررسی شده است و مشاهدات نشان داده‌اند که فعالیت‌های لوکوموتور و خود به خودی پس از مرحلهٔ 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 محفظهٔ 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 گابائرژیک هیپوکامپ می‌باشد (۲۳)، از این

[18] Etiology

رو مدل تحلیل عصبی ناشی از تری متیل تین به‌عنوان مدلی برای ADHD[19] یا همان بیش فعالی 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[20] 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 نوروآدرنرژیکی می‌دانند (۲۴). میگنینی[21] و همکاران نیز نشان داده‌اند که پس از تجویز تری متیل تین مدت زمان حرکات گریزی جانور کاهش می‌یابد که نشان‌دهندهٔ 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 دیوارهٔ ماز طی آزمون محفظهٔ 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.

لیتیوم کاتیونی تک ظرفیتی است که آبشار سلولی نوروتروفیک و محافظت‌کنندهٔ عصبی[22] را فعال می‌نماید. تجویز لیتیوم سبب افزایش بیان BDNF در مغز جوندگان به‌ویژه در هیپوکامپ و قشر پیشانی می‌گردد و همچنین پژوهش‌ها نشان داده‌اند که اثرات نوروتروفیک لیتیوم 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[23] آن در پی مسمومیت با تری متیل تین کاهش می‌یابد، تجویز دراز مدت لیتیوم می‌تواند با مکانیسمی جبرانی، جلوی کاهش سطح BDNF را بگیرد و از این رو موش‌های صحرایی را از حوادث تحلیل برندهٔ عصبی ناشی از تری متیل تین و القاء اثرات رفتاری متعاقب آن نظیر افسردگی (۲۷) و رفتارهای اضطرابی نظیر آنچه در مطالعهٔ حاضر دیده شده است، مصون نگه می‌دارد.

اثر لیتیوم بر ترس و رفتارهای اضطرابی در بسیاری از پژوهش‌ها با تناقض‌هایی رو به رو است. لیتیوم 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). لیتیوم به‌صورت مقطعی می‌تواند سطح عمومی اضطراب را طی آزمون ماز صلیبی مرتفع کاهش داده و بیش فعالی را نیز تعدیل نماید (۲۹). موش‌های مبتلا به سندرم X شکننده، سطح بالایی از اضطراب و نیز بیش فعالی را نشان می‌دهند و مهارکنندهٔ GSK-3 سبب مهار این رفتارها می‌شود که این امر نشان‌دهندهٔ دخالت GSK-3 در بیماری‌زایی[24] سندرم X شکننده است. GSK-3 و در واقع مهار آن با واسطهٔ لیتیوم می‌تواند راهکار درمانی مناسبی برای تعدیل رفتاری در این قبیل حیوانات گردد (۳۰).

در مسمومیت با تری متیل تین که با بیش فعالی و سطح بالای اضطراب همراه است، شاید لیتیوم می‌تواند سبب کاهش میزان اضطراب گردد. همچنین لیتیوم سطح فعالیت‌های لوکوموتور و بیش فعالی را که به ترتیب در آزمون محفظهٔ باز و ماز صلیبی مرتفع در موش‌های صحرایی مدل ایسکمی مغزی گلوبال[25] دیده شده است، کاهش می‌دهد (۳۱). در پژوهش حاضر به بررسی اثرات ضد اضطرابی لیتیوم در مدل تحلیل عصبی ناشی از تری متیل تین پرداخته شد و مشاهدات حاکی از کاهش معنی‌دار سطح اضطراب در گروه‌های دریافت‌کنندهٔ لیتیوم نسبت به گروه شم در آزمون‌های ماز صلیبی مرتفع و محفظهٔ تاریک و روشن می‌باشد، به‌گونه‌ای که مدت زمان باقی ماندن در بازوی بستهٔ آزمون ماز صلیبی مرتفع و مدت زمان باقی ماندن در محفظهٔ تاریک نسبت به گروه شم کاهش معنی‌داری را نشان داده است. مؤلفه‌های سنجش اضطراب در آزمون محفظهٔ باز مانند مدت زمان سکون و بی‌حرکتی و نیز تعداد دفعات دفع حیوان بعد از تیمار با لیتیوم 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 لیتیوم 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.

[19] Attention deficit hyperactivity disorder
[20] Messing
[21] Mignini
[22] Neuroprotective
[23] Signaling
[24] Pathogenesis
[25] Global

منابع

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 CAJr, 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 to the avulsed ventral horn of adult rats through the secretion of brain-drived neurotrophic factor. J Neurochem. 2009; 108(6): 1385-98.

14. Wada A. Lithium and neuropsychiatric therapeutics: Neuroplasticity via glycogen synthase kinase-3β, 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.