

The effect of Ferulic acid on motor-cognitive learning in Trimethyltin-induced hyperactivity model

Habiboolah Khodabandeh¹, Mohammad Amin Edalatmanesh²

¹ PhD Candidate in Cell and Developmental Biology, Department of Biology, College of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

² Associate Professor of Physiology, Department of Biology, College of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Abstract

Background: Trimethyltin (TMT) is an organotin with selectively damage in the cerebral cortex and hippocampus which leads hyperactivity in prenatal exposure. The aim of this study was the evaluation of Ferulic acid (FER) effect on amelioration of motor and cognitive deficits in prenatal TMT-intoxication rat model.

Materials and methods: In this experimental study, 30 Wistar pregnant rats were randomly divided into 5 groups, including control group, TMT+Saline group and TMT+FER25, TMT+FER50 and TMT+FER100 groups. TMT (9 mg/kg) were intraperitoneally injected to the pregnant rats on embryonic day (ED) 14. Ferulic acid groups were treated by 25, 50 and 100 mg/kg doses of Ferulic acid during ED12 to ED18. Open field test for evaluation of anxiety and locomotor activity, beam walking and grid walking test for assessment of motor learning and Y-maze for evaluation of working memory were used on postnatal day (PND) 30. The data were analyzed by ANOVA and Tukey post hoc.

Results: Increased rates of anxiety- like behaviors, decrease of motor learning and working memory were shown in TMT+Saline group compared to the control. Although, Ferulic acid treated groups were shown a significant amelioration in correct alteration behavior and motor learning with reduction of anxiety- like behaviors ($p < 0.05$).

Conclusion: TMT prenatal exposure impairs learning and attention in rats and Ferulic acid may reduce cognitive-behavioral deficits.

Keywords: Attention deficit disorder with hyperactivity, Trimethyltin, Ferulic acid, Motor learning, Rat.

Cited as: Khodabandeh H, Edalatmanesh MA. The effect of Ferulic acid on motor-cognitive learning in Trimethyltin- induced hyperactivity model. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2021; 31(3): 307-318.

Correspondence to: Mohammad Amin Edalatmanesh

Tel: +98 36410041-071

E-mail: amin.edalatmanesh@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-7936-1145

Received: 16 Feb 2021; **Accepted:** 20 Apr 2021

اثر فرولیک اسید بر یادگیری حرکتی - شناختی در مدل بیش فعالی ناشی از تری متیل تین

حبیب الله خدابنده^۱، محمد امین عدالت منش^۲

^۱ دانشجوی دکتری زیست شناسی سلولی - تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
^۲ دانشیار فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز

چکیده

سابقه و هدف: تری متیل تین (Trimethyltin; TMT) اورگانوتین است که تجویز پرنیتال آن سبب تخریب انتخابی قشر مغز، هیپوکامپ و بروز بیش فعالی می شود. هدف این پژوهش، ارزیابی اثر فرولیک اسید بر بهبود اختلال در یادگیری حرکتی - شناختی در موش های صحرایی متعاقب مسمومیت پرنیتال با TMT بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۳۰ سر موش صحرایی باردار نژاد ویستار به صورت تصادفی در ۵ گروه تقسیم شدند: گروه های کنترل، دریافت کننده نرمال سالین (TMT+Saline) و دریافت کننده فرولیک اسید (TMT+FER25، TMT+FER50 و TMT+FER100). TMT به صورت درون صفاقی (۹ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به موشهای صحرایی باردار در روز ۱۴ بارداری تزریق شد. فرولیک اسید در دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم از روز ۱۲ تا ۱۸ بارداری تجویز شد. آزمون محفظه باز برای ارزیابی حرکات لوکوموتور و رفتار اضطرابی، آزمون راه رفتن شعاعی و شبکه ای جهت سنجش یادگیری حرکتی و آزمون ماز Y برای ارزیابی حافظه کاری در نوزادان انجام شد. داده ها با آزمون ANOVA و تعقیبی توکی تحلیل شدند.

یافته ها: افزایش رفتارهای شبه اضطرابی، کاهش یادگیری حرکتی و حافظه کاری در گروه TMT+Saline نسبت به گروه کنترل دیده شد. هرچند، تجویز فرولیک اسید سبب بهبود قابل توجهی در تناوب صحیح حرکتی، یادگیری حرکتی و کاهش اضطراب شد ($p < 0.05$). نتیجه گیری: مسمومیت پرنیتال با TMT، سبب اختلال در یادگیری و توجه در موش های صحرایی می شود و فرولیک اسید احتمالاً نواقص شناختی-رفتاری ناشی از آن را کاهش می دهد.

واژگان کلیدی: اختلال نقص توجه با بیش فعالی، تری متیل تین، فرولیک اسید، یادگیری حرکتی، موش صحرایی.

مقدمه

تری متیل تین (TMT) یک ارگانوتین سمی است که چهار ارگان اصلی شامل مغز، کبد، سیستم ایمنی و پوست را تحت تأثیر قرار می دهد. نتیجه اصلی این مسمومیت شامل سوزش چشم و پوست، اسهال، سردرد، تخریب حافظه،

تغییرات رفتاری مثل پرخاشگری، گم گشتگی شخصیت و رفتارهای غیر منطقی است. باتوجه به گوناگونی مکانیزم نورو توکسیک، مکانیسم عملکرد TMT هنوز ناشناخته باقی مانده است (۱). تری متیل تین، در پلیمرهای پلاستیکی و محصولات سیلیکونی مثل لوازم آشپزخانه، مواد بسته بندی غذا و قارچ کش ها وجود دارد. همچنین، ممکن است سبب آلودگی آب های آشامیدنی و محیط آبی شده و گونه های آبی را مسموم می سازد (۲). مسمومیت با TMT به دلیل وجود این ترکیب در محصولات پلاستیکی و کاربرد گسترده انسان از ظروف یک بار مصرف

آدرس نویسنده مسئول: شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی،

محمد امین عدالت منش (email: amin.edalatmanesh@gmail.com)

ORCID ID: 0000-0002-7936-1145

تاریخ دریافت مقاله: ۹۹/۱۱/۲۸

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱/۳۱

پلاستیکی به مسئله‌ای جهانی تبدیل شده است. با این حال، بیشترین مسمومیت در مواردی است که شغل افراد در صنایع پلاستیک سازی یا سایر مشاغلی است که نیازمند گرم کردن پلاستیک است (۳).

مطالعات نشان داده است که تجویز پیش از تولد TMT، سبب دژنراسیون سیستم عصبی مرکزی به ویژه تخریب نورون‌های هیپوکامپ شده و در پی این تجویز حیوانات آزمایشگاهی دچار اختلالات شناختی، بیش فعالی و پرخاشگری می‌شوند، به گونه‌ای که آن را به عنوان مدلی برای القاء بیش فعالی همراه با نقص توجه (ADHD) در نظر گرفته‌اند (۴). از طرفی، سلول‌های هرمی هیپوکامپ موش وقتی که در معرض TMT قرار می‌گیرند، دچار آپوپتوز می‌شوند. مرگ نورونی انتخابی در سیستم لیمبیک و به ویژه هیپوکامپ متعاقب مسمومیت با TMT منجر به بروز آسیب‌های شناختی و کاهش روند یادگیری در موش‌های صحرایی می‌شود (۵).

ADHD، یک اختلال رایج، طولانی مدت و تا حدودی قابل درمان در دوران کودکی است. کودکان مبتلا به ADHD در چندین دامنه عملکردی مانند حل مسائل، برنامه ریزی، تطبیق دادن، تمرکز، ممانعت از پاسخ شدید به تحریکات و حافظه عملکردی دارای مشکل هستند و از اختلالات حرکتی نظیر اختلال در هماهنگی محرکات حسی مانند دست خط ضعیف، شلخته واری و تأخیر قابل توجه در شروع حرکت و حرکات تکراری رنج می‌برند (۶). دو ماه بعد از تولد، موش‌هایی که در دوران جنینی در معرض TMT قرار داشته‌اند، اختلالات شناختی را نشان داده‌اند. همچنین، تزریق پیش از تولد این ارگانون‌تین به موش‌های صحرایی، باعث تسریع شروع رفلکس‌های نوزادی می‌شود که در کودکان دچار ADHD نیز دیده شده است (۴). حیوانات آزمایشگاهی که پیش از تولد در معرض TMT بوده‌اند، آسیب نورونی هیپوکامپ و اختلال در سیستم‌های نوروترانسمیتری مانند کولینرژیک، گاباژیک و گلوتاماترژیک را نشان داده‌اند. از طرفی فعال شدن کاسپاز ۳ که در پی تزریق TMT مشاهده شده است، منجر به همکاری دو فرایند زوال مغز و آپوپتوز در مغز حیواناتی که پیش از تولد در معرض TMT بوده‌اند، می‌شود (۷).

با توجه به نقش برجسته مخچه در پاتولوژی ADHD، کاهش حجم مخچه و آسیب نورون‌های پورکینز (۸)، بروز اختلالات حرکتی و اختلال در یادگیری حرکتی در مدل مسمومیت تری‌متیل‌تین می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. در واقع، محققین به این نتیجه رسیده‌اند که قرار گرفتن در

معرض TMT یکی از دلایل ابتلا به سندرم خاصی به نام سندرم مخچه‌ای- لیمبیک است (۹). قرار گرفتن سلول‌های گرانولی مخچه در معرض TMT باعث مرگ اولیه آنها شده و در صورت تجمع بیشتر TMT، باعث ایجاد جریان لاکتات دهیدروژناز سلولی و نکروز می‌شود (۱۰). نورون‌هایی که حاوی پروتئین استاتین در میتوکندری خود هستند، حساسیت بیشتری به TMT دارند (۱۱).

آسیب ناشی از TMT در سلول‌های حساس با فرایندهای نظیر استرس اکسیداتیو، افزایش کلسیم درون سلولی و آسیب میتوکندریایی همراه است. استرس اکسیداتیو با تولید اکسیژن و نیتروژن واکنشی و لیپو پراکسیداسیون مشخص می‌شود. در حالی که آسیب میتوکندریایی احتمالاً نتیجه برهم کنش TMT با پروتئین استاتین است که منجر به آزاد سازی سیتوکروم C و فعالیت کاسپازها می‌شود (۱۲). از آنجایی که دارو درمانی در DAHD با مشکل عوارض ناشی از داروها و عدم کارایی لازم مواجه است و از طرفی علت این اختلال، آسیب های مغزی جنین است، لذا توجه به تغذیه مادر و مصرف آنتی اکسیدان‌ها شاید بتواند راهگشای درمانی در ADHD باشد (۱۳).

فنول‌های گیاهی، آنتی اکسیدانت‌های قدرتمند و بخش اصلی از رژیم غذایی انسان هستند. به علاوه، از آنها در صنعت غذا به عنوان افزودنی مثل رنگ، چاشنی و نگهدارنده استفاده می‌شود. اغلب فنول‌ها در رژیم غذایی فلاونوئیدها و سینامیک اسید هستند و غذاهای گیاهی تنها منبع رژیم غذایی فلاونوئیدها هستند. بر اساس تخمین‌های موجود، دریافت آنتی اکسیدان‌ها از طریق فنول‌های رژیم غذایی قابل مقایسه با ویتامین E، C و کاروتنوئیدها است. بنابراین، فنول‌های رژیم غذایی به عنوان آنتی اکسیدان در پیشگیری از ابتلاء به بیماری‌ها اهمیت دارند (۱۴). مطالعات گذشته نقش آنتی اکسیدانی فرولیک اسید را در بهبود اختلالات شناختی از طریق افزایش فعالیت کولین استیل ترانسفراز در قشر مغز و هیپوکامپ موش‌های صحرایی نشان داده است (۱۵). همچنین، دیده شده است که فرولیک اسید، سیستم Nrf2/هم اکسیژناز-۱ را تنظیم می‌کند و از آسیب عصبی ناشی از TMT در سلولهای نوروبلاستوما انسانی ممانعت به عمل می‌آورد (۱۶).

هدف این پژوهش، بررسی رفتارهای مشابه ADHD در نوزادان موش صحرایی است که در دوران جنینی در معرض تری‌متیل‌تین قرار می‌گیرند. بدین منظور ضمن بررسی‌های تراژونیک رفتاری این ترکیب، بر اعتبار بخشی به مدل

ADHD تری متیل تین پرداخته می شود و اثر فرولیک اسید در کنترل رفتارهای اضطرابی، اختلالات حرکتی و شناختی در این مدل مورد بررسی قرار می گیرد.

مواد و روشها

حیوانات و گروه بندی

این مطالعه تجربی بر روی نوزادان نر حاصل از جفت گیری ۳۰ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار در محدوده وزنی 180 ± 10 گرم و سن تقریبی ۸ هفته و ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با میانگین وزنی 220 ± 10 گرم صورت گرفت. حیوانات از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه و قبل از انجام آزمایشات به منظور سازگاری با شرایط جدید، به مدت ۸ روز در محیط جدید نگهداری شدند. در طول دوره آزمایش، همه حیوانات از غذای استاندارد آزمایشگاهی مخصوص موش های صحرایی (محصول شرکت خوراک دام و طیور فارس، ایران) و آب به میزان دلخواه حیوانات برخوردار بودند. کلیه مراحل کار، تحت شرایط استاندارد دما (25 ± 2 درجه سانتی گراد) و رطوبت نسبی (50 ± 10 درصد) و چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته (۶ صبح تا ۶ عصر) انجام گرفت. تعداد ۷۵ نوزاد موش صحرایی در ۳۰ روزگی و به صورت تصادفی در گروه های مورد مطالعه ($n=15$) در هر گروه) استفاده شدند. رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی طبق قوانین بین المللی و ضوابط کمیته اخلاقی حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی شیراز (کد اخلاق: IR.IAUSHIRAZ.1397.27) صورت گرفت.

برای بالا بردن درصد موفقیت در جفت گیری، از موش های صحرایی ماده قبل از جفت گیری اسمیر واژینال تهیه شد و حیواناتی که در سیکل استروس قرار داشتند، با حیوان نر در ساعت ۶ عصر هم قفس شدند. پس از هم قفس شدن و جهت اطمینان از جفت گیری، صبح روز بعد، حیوانات جهت مشاهده پلاک واژنی و یا وجود سلول های اسپرماتوزوآ در اسمیر واژنی بررسی و آن روز به عنوان روز صفر بارداری تعیین شد.

پس از توزین اولیه، موش های صحرایی باردار به طور تصادفی در ۵ گروه ۶ تایی تقسیم شدند: گروه کنترل، گروه TMT+Saline (تزریق صفای تری متیل تین و گاوژ نرمال سالین به عنوان حلال فرولیک اسید)، TMT+FER25 (تزریق تری متیل تین و گاوژ دوز ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن فرولیک اسید)، TMT+FER50 (تزریق تری متیل تین و گاوژ دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم فرولیک اسید) و TMT+FER100 (تزریق تری-

متیل تین و گاوژ دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم فرولیک اسید). تری متیل تین در روز ۱۴ بارداری و به صورت تک دوز به تمامی مادران به جز گروه کنترل تزریق شد (۴) و گاوژ فرولیک اسید از روز ۱۲ تا ۱۸ بارداری انجام شد. سپس، مادران به صورت طبیعی زایمان کردند و فرزندان حاصل پس از شمارش، توزین و ارزیابی های مورفولوژیک تا ۲۴ روزگی با مادرانشان نگهداری شدند. سپس، از مادر جدا شده و در پایان یک ماهگی جهت مطالعات رفتاری مورد بررسی قرار گرفتند. از بین تمامی نوزادان حاصل از ۶ مادر در هر گروه، تعداد ۱۵ سر نوزاد نر (۲-۳ نوزاد نر از هر مادر در هر گروه) به طور تصادفی انتخاب شدند (در مجموع ۷۵ نوزاد ۳۰ روزه) و جهت مطالعات رفتاری مورد استفاده قرار گرفتند. مرگ و میر مادران در پی مسمومیت با TMT، سقط جنین، مرده زایی، زایمان زودرس، کاهش وزن و اختلالات فیزیکی نوزادان که از موارد محدودیت مطالعه حاضر هستند، معیار خروج حیوانات در نظر گرفته شدند.

آزمون های رفتاری

آزمون محفظه باز (Open Field)

این آزمون، به منظور سنجش و مقایسه میزان رفتارهای اکتشافی، فعالیت حرکتی و اضطراب در موش های صحرایی گروه های مختلف طی یک ماهگی انجام شد. این رفتارها، با استفاده از یک دستگاه محفظه باز مورد ارزیابی قرار گرفت که مجهز به دوربین فیلم برداری متصل به کامپیوتر (سیستم مانیتورینگ رفتار حیوانات) می باشد. تعداد دفعات عبور از مربع های کناری و مربع های مرکزی، به ترتیب به عنوان شاخص هایی برای ارزیابی فعالیت لوکوموتور و رفتارهای اکتشافی، تعداد دفعات دفع حیوان (شاخص سنجش اضطراب حیوان) و مدت زمان بی حرکتی در موش های صحرایی هر گروه، در طول دوره زمانی ۱۰ دقیقه ای، مورد بررسی قرار گرفتند. مدت زمان کل آزمایش در این بررسی، ۱۰ دقیقه (دو بازه زمانی ۵ دقیقه ای برای هر حیوان) می باشد (۱۷).

آزمون ماز Y

برای سنجش حافظه کاری و ثبت رفتارهای تنوبی از آزمون ماز Y در ۳۰ روزگی استفاده شد. این ماز از سه بازو با شرایط یکسان شبیه به حرف Y تشکیل شده است. هر بازو دارای ابعاد $15 \times 30 \times 40$ سانتی متر می باشد. بازوها از طریق یک محوطه مرکزی به هم متصل می شوند. موش های صحرایی به طور معمول ترجیح می دهند به بررسی بازوی جدید بپردازند و تمایلی برای بازگشت به بازویی که قبلاً بازدید کرده اند ندارند، مگر آن را فراموش کرده باشند. ابتدا حیوان به آرامی و بدون القاء استرس در یکی از سه بازو قرار داده شد و حرکات آن به مدت ۵ دقیقه

یافته‌ها

ارزیابی میزان مرگ و میر نوزادان

پس از به دنیا آمدن نوزادان، تعداد نوزادان زنده و مرده در هر گروه شمارش شد. نوزادان مرده شامل آن دسته از نوزادانی هستند که مرده به دنیا آمده‌اند یا پس از تولد و تا پایان دوره نوزادی (۱۴ روزگی) مرده‌اند. نتایج حاصل در جدول ۱ آمده است. مشاهدات حاکی از آن است که میزان مرگ و میر نوزادان در گروه TMT+Saline و نیز گروه TMT+FER25 بیشتر از دیگر گروه‌های مورد مطالعه بود. در گروه کنترل هیچ مرگ و میری مشاهده نشد.

جدول ۱. درصد مرگ و میر نوزادان در گروه‌های مختلف

گروه	تعداد مادران شده در هر گروه	تعداد مادران تلف	تعداد کل	درصد
کنترل	۶	-	۵۴	۰
TMT+Saline	۶	۱	۳۸	۲۶/۳۱
TMT+FER25	۶	۱	۴۱	۱۷/۰۷
TMT+FER50	۶	۰	۵۲	۹/۶۱
TMT+FER100	۶	۰	۴۶	۱۰/۸۶

ارزیابی فعالیت لوکوموتور، رفتار اکتشافی و اضطراب

نتایج حاصل از ارزیابی میزان فعالیت حرکتی (عبور از مربع‌های مرکزی) رفتارهای اکتشافی و شبه اضطرابی (عبور از مربع‌های کناری و مدت زمان بی‌حرکتی) در آزمون Open Field به تفکیک مورد بررسی قرار گرفت.

عبور از مربع‌های کناری

نتایج حاصل از آزمون ANOVA نشان داد که تعداد دفعات عبور از مربع‌های کناری در گروه TMT+Saline نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری دارد ($p < 0.01$). هرچند، بین گروه کنترل با گروه‌های TMT+FER25 و TMT+FER50 نیز اختلاف معنی‌داری (به ترتیب $p < 0.01$ و $p < 0.05$) دیده می‌شود. با این حال، نتایج نشان از کاهش میزان فعالیت حرکتی و هایپراکتیویته در گروه‌های TMT+FER50 و TMT+FER100 نسبت به گروه TMT+Saline دارد (به ترتیب $p < 0.05$ و $p < 0.01$). از طرفی، بین گروه TMT+FER100 با گروه TMT+FER25 اختلاف معنی‌دار دیده شد ($p < 0.05$) (نمودار ۱).

مشاهده شد. تعداد دفعاتی که حیوان وارد هر کدام از بازوها شد، ثبت گردید. ورود هر حیوان به داخل یک بازو زمانی است که پاهای عقبی حیوان به طور کامل در داخل بازو قرار گیرد. برای تعیین میزان حافظه کاری، درصد رفتارهای تناوبی از حاصل جمع ورودهای موفق تقسیم بر ورودی‌های کل بازو منهای ۲ ضرب در صد محاسبه گردید. منظور از ورودهای موفق، ورودهای متناوب و پشت سر هم و سریالی در هر سه بازو است (۱۸).

آزمون راه رفتن شعاعی (Beam walking)

آزمون راه رفتن شعاعی به منظور بررسی و مقایسه هماهنگی فعالیت حرکتی، در موش‌های صحرایی نر طی ۳۰ روزگی انجام گرفت. ابزار مورد نیاز برای این آزمون عبارت است از یک میله چوبی به قطر سه سانتی متر و طول یک متر که ۳۰ سانتی متر بالاتر از سطح زمین قرار دارد و در یک انتها به یک سکوی نجات ۴۰ سانتی متر مربع ختم می‌شود. حیوانات قبل از انجام آزمایش، چندین بار بر روی این میله چوبی قرار داده می‌شوند و به آن‌ها آموزش داده می‌شود که به سمت سکو حرکت کنند. در روز آزمون، هر حیوان سه بار و به فاصله یک ساعت بر روی این میله چوبی قرار گرفتند. مدت زمان رسیدن از ابتدا به انتهای این میله و نیز سرعت حرکت آن‌ها ثبت شد (۱۹).

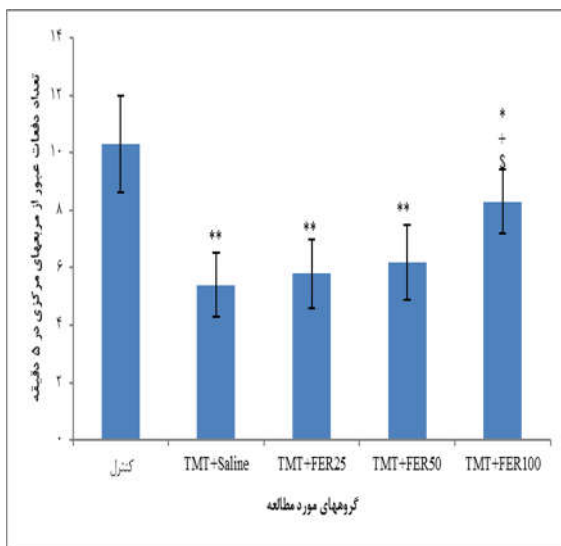
آزمون راه رفتن شبکه‌ای (Grid walking)

جهت ارزیابی و مقایسه هماهنگ بودن حرکت دست و پاها از این آزمون استفاده شد. در این آزمون از یک توری استیل ضد زنگ با طول ۴۰ و عرض ۲۰ سانتی متر استفاده شد که از مربع‌هایی به ضلع ۴ سانتی متر تشکیل شده و دارای پایه‌هایی به ارتفاع ۳۰ سانتی متر است جهت انجام آزمایش حیوان را بر روی آن قرار داده و طی مدت زمان یک دقیقه توسط دوربینی از زیر که به کل وسیله اشراف دارد تصویربرداری می‌شود. فاکتورهایی که در این آزمون مد نظر گرفته می‌شود، عبارتند از تعداد قدم‌های برداشته شده توسط هر دست و پا و تعداد خطاهای صورت گرفته توسط هر دست و پا. جهت ارزیابی درصد خطا، تعداد خطاهای صورت گرفته تقسیم بر تعداد کل قدم‌ها شده و در ۱۰۰ ضرب می‌شود. این آزمون در یک ماهگی با سه بار تکرار برای هر حیوان انجام گرفت (۲۰).

تحلیل آماری

تحلیل آماری بین گروه‌های مختلف با نرم افزار SPSS نسخه ۱۳ انجام شد. برای بررسی توزیع نرمال داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک استفاده شد. همچنین، به منظور تعیین اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد نظر، آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی صورت گرفت. از نظر آماری مقادیر $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

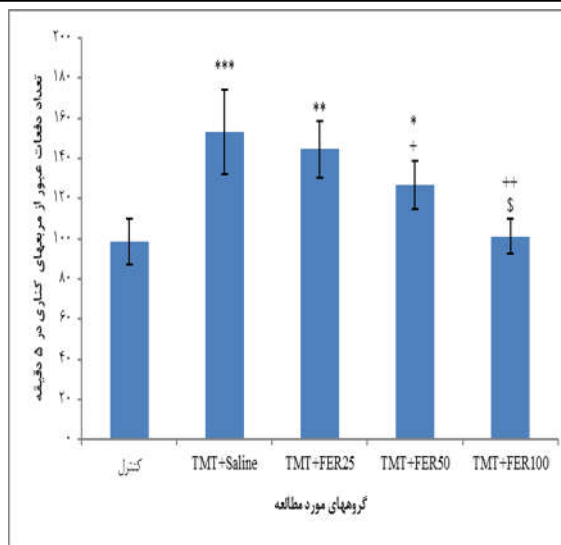
نشانه‌های اضطراب در گروه‌های دریافت کننده فرولیک اسید نسبت به گروه TMT+Saline، این اختلاف در هیچ یک از گروه‌های تیمار شده معنی‌دار نیست و تیمار با فرولیک اسید نتوانست در مدت زمان بی‌حرکتی تفاوت معنی‌داری در گروه‌های مورد مطالعه ایجاد کند (نمودار ۳).



نمودار ۲. مقایسه میانگین (± انحراف معیار) تعداد دفعات عبور از مربعات مرکزی در آزمون محفظه باز در گروه‌های مختلف. نتایج نشان داد که بین گروه کنترل با تمامی گروه‌های مورد اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.01$ و $p < 0.05$). همچنین، بین گروه TMT+Saline با گروه TMT+FER100 اختلاف معنی‌داری دیده شد ($p < 0.05$). بین گروه TMT+FER25 با گروه TMT+FER100 اختلاف معنی‌دار قابل مشاهده است ($p < 0.05$).

آزمون ماز Y (ارزیابی حافظه کاری)

نتایج حاصل از ANOVA و آزمون تعقیبی توکی نشان داد که درصد تناوب صحیح حرکتی در گروه TMT+Saline نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری دارد ($p < 0.01$). هرچند، بین گروه کنترل و گروه‌های TMT+FER25، TMT+FER50 و TMT+FER100 نیز اختلاف معنی‌داری (به ترتیب: $p < 0.01$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.05$) دیده شد، مقایسه بین گروه TMT+Saline با گروه‌های دریافت کننده فرولیک اسید نشان داد که بین گروه TMT+FER50 با گروه TMT+Saline ($p < 0.05$) و بین گروه TMT+FER100 با گروه TMT+Saline ($p < 0.05$) اختلاف معنی‌داری وجود دارد. در بین گروه‌های دریافت کننده فرولیک اسید بین گروه TMT+FER25 با گروه‌های



نمودار ۱. مقایسه میانگین (± انحراف معیار) تعداد دفعات عبور از مربع‌های کناری در آزمون محفظه باز در گروه‌های مختلف. نتایج نشان داد که بین گروه کنترل با گروه‌های TMT+Saline، TMT+FER25 و TMT+FER50 اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.001$ و $p < 0.01$ و $p < 0.05$). همچنین، بین گروه TMT+Saline با گروه TMT+FER50 و TMT+FER100 اختلاف معنی‌داری دیده می‌شود ($p < 0.01$ و $p < 0.05$). بین گروه TMT+FER25 با گروه TMT+FER100 نیز تفاوت معنی‌دار است ($p < 0.05$).

عبور از مربعات مرکزی

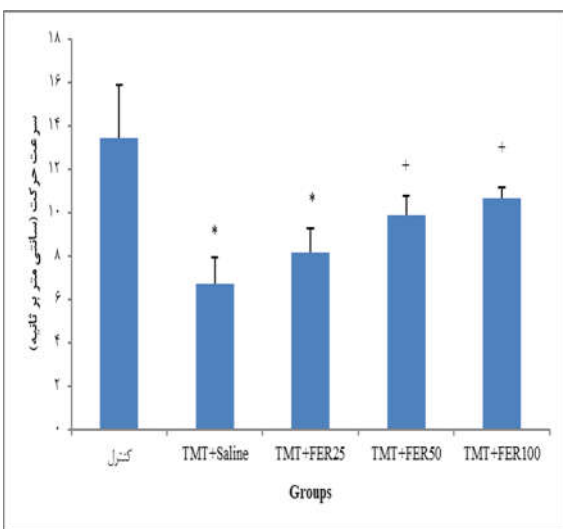
تعداد دفعات عبور از مربع‌های مرکزی در گروه TMT+Saline نسبت به گروه کنترل کاهش قابل توجهی نشان داد ($p < 0.01$). همچنین، بین گروه کنترل با گروه‌های TMT+FER25 و TMT+FER50 ($p < 0.01$) و گروه TMT+FER100 ($p < 0.05$) اختلاف معنی‌دار دیده شد. از طرف دیگر، نتایج نشان‌دهنده تاثیر تجویز فرولیک اسید در دوران جنینی بر کاهش اضطراب و افزایش رفتارهای اکتشافی (تعدد دفعات عبور از مربع‌های مرکزی) در گروه TMT+FER100 نسبت به گروه TMT+Saline است ($p < 0.05$). بین گروه TMT+FER100 با گروه TMT+FER25 اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p < 0.05$) (نمودار ۲).

مدت زمان بی‌حرکتی

نتایج حاصل نشان داد که مدت زمان بی‌حرکتی حیوان پس از قرار گرفتن در محفظه باز در گروه TMT+Saline نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری دارد ($p < 0.001$). همچنین، گروه کنترل با گروه‌های TMT+FER25، TMT+FER50 و TMT+FER100 نیز اختلاف معنی‌دار دارد ($p < 0.001$). این در حالی است که علیرغم کاهش

آزمون راه رفتن شعاعی

نتایج حاصل نشان دهنده کاهش معنی دار سرعت پیمایش مسیر در گروه های TMT+Saline و TMT+FER25 نسبت به گروه کنترل می باشد ($p < 0/05$). همچنین، گروه های TMT+Saline و TMT+FER50 و TMT+FER100 با گروه TMT+Saline با افزایش معنی داری نشان داد ($p < 0/05$). نتایج این آزمون نشان می دهد که میزان سرعت پیمایش مسیر که رابطه مستقیمی با تعادل حرکتی دارد در گروه های تیمار با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ فرولیک اسید نسبت به گروه TMT+Saline بهبود قابل توجهی دارد (نمودار ۵).

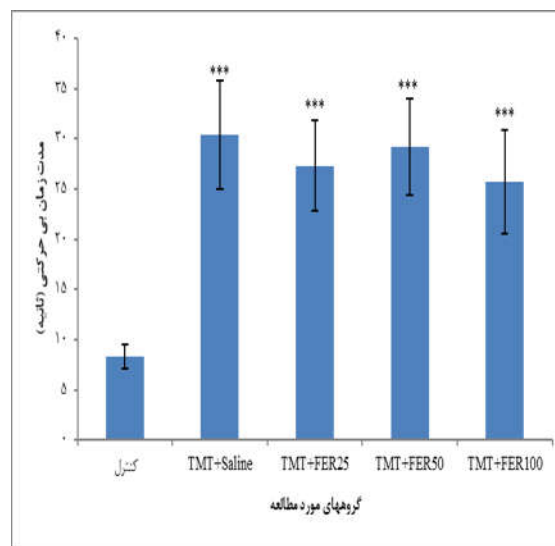


نمودار ۵. مقایسه میانگین ($\pm$ خطای معیار) سرعت پیمایش مسیر طی آزمون راه رفتن شعاعی. نتایج نشان داد که اختلاف معنی داری بین گروه های TMT+Saline و TMT+FER25 با گروه کنترل وجود دارد ($p < 0/05$). همچنین، بین گروه های TMT+Saline و TMT+FER50 و TMT+FER100 نیز اختلاف معنی دار است ($p < 0/05$).

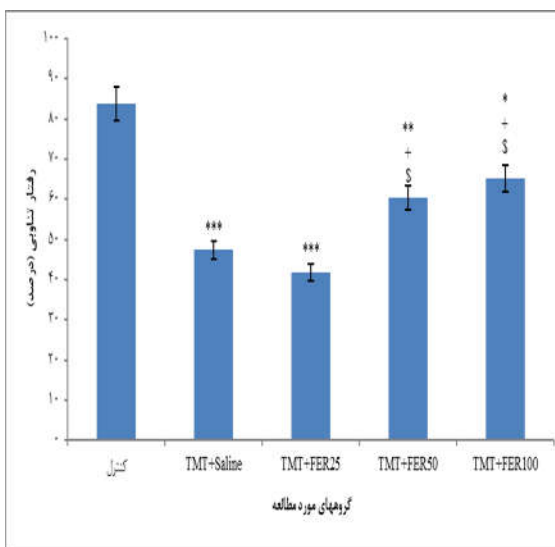
آزمون راه رفتن شبکه ای

نتایج حاصل از ANOVA و تست تعقیبی توکی در گروه های مختلف نشان داد که در درصد خطای دست راست افزایش معنی داری در گروه TMT+Saline با گروه کنترل دارد ($p < 0/01$). همچنین، بین گروه کنترل و گروه های TMT+FER25 و TMT+FER50 نیز اختلاف معنی دار است ($p < 0/01$). در گروه TMT+FER100 و در مقایسه با گروه TMT+Saline کاهش معنی داری در درصد خطای دست راست دیده شد ($p < 0/05$). در واقع، نتایج نشان دهنده اثر گذاری فرولیک اسید بر کاهش خطای دست راست در دوز

TMT+FER50 و TMT+FER100 نیز اختلاف معنی دار دیده شد (نمودار ۴، $p < 0/05$).



نمودار ۳. مقایسه میانگین ($\pm$ انحراف معیار) مدت زمان بی حرکتی در آزمون محفظه باز در گروه های مختلف. نتایج نشان داد که بین گروه کنترل با تمامی گروه های مورد مطالعه اختلاف معنی دار است ($p < 0/001$).



نمودار ۴. مقایسه میانگین ($\pm$ انحراف معیار) درصد تناوب صحیح حرکتی در گروه های مختلف. نتایج نشان داد که بین گروه کنترل با گروه TMT+Saline، TMT+FER25 و TMT+FER50 اختلاف معنی داری وجود دارد ($p < 0/001$) و بین گروه های TMT+FER50 و TMT+FER100 ($p < 0/05$) و TMT+Saline نیز اختلاف معنی دار دیده شد ($p < 0/05$). همچنین، بین گروه های TMT+FER50 و TMT+FER100 با گروه TMT+FER25 اختلاف معنی داری قابل مشاهده است ($p < 0/05$).

بحث

مطالعه حاضر اثر تجویز پری‌ناتال تری‌متیل‌تین (TMT) بر بروز اختلال شناختی، فعالیت لوکوموتور، اختلال حرکتی، رفتارهای شبه اضطرابی و اکتشافی در نوزادان یک ماهه موش‌های صحرایی را مورد ارزیابی قرار داد. متعاقب مسمومیت مادران با TMT (دوز ۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، نوزادان حاصل نشانه‌هایی از اختلال بیش‌فعالی همراه با نقص توجه (ADHD) دارند. اختلال در حافظه کاری، هایپراکتیویته، اضطراب، کاهش رفتارهای اکتشافی، نقص در تعادل و یادگیری حرکتی در نوزادان یک ماهه دیده شد. هر یک از این رفتارها به کمک آزمون‌های معتبر رفتاری و با چندین تکرار توسط آزمایشگر بررسی شد. از طرف دیگر، نتایج نشان داد که تجویز فرولیک اسید به عنوان یک آنتی اکسیدان می‌تواند اختلالات شناختی، رفتاری و حرکتی ناشی از مسمومیت پرناتال با TMT را در موش‌های صحرایی کاهش دهد.

هرچند، بروز علائم رفتاری- شناختی ناشی از مسمومیت با TMT در انسان و جوندگان از جمله گیجی، فراموشی، تشنج، بی‌خوابی و افسردگی به اثبات رسیده است (۲۱). با این حال، مطالعات اندکی اثرات مسمومیت پرناتال TMT و ارتباط آن را با پاتولوژی ADHD مورد بررسی قرار داده‌اند. مطالعات آزمایشگاهی مرگ انتخابی نورون‌ها در سیستم لیمبیک و به ویژه هیپوکامپ، نقصان حافظه و اختلال در روند یادگیری را متعاقب مسمومیت با TMT نشان داده‌اند و از این رو از آن به عنوان مدلی از اختلال شناختی نام برده‌اند (۲۲). در مطالعه حاضر نقص در عملکرد حافظه کاری با آزمون ماز Y (سنجش رفتار تناوبی) متعاقب مسمومیت پری‌ناتال با TMT دیده شد. نتایج نشان داد که در گروه TMT+Saline که در روز ۱۴ بارداری در مواجهه با TMT بودند و از روز ۱۲ تا ۱۶ بارداری، نرمال سالیان به آنها گواژ شده است، نسبت به گروه کنترل در عملکردهای شناختی و حافظه کاری نقص دارند.

حداکثر است. هرچند، در دوزهای پایین بهبودی در خطای دست راست دیده نشد (جدول ۲). بین گروه‌های TMT+FER25 و TMT+FER50 با گروه TMT+FER100 نیز اختلاف معنی‌داری دیده شد ($p < 0.05$).

در ارزیابی درصد خطای دست چپ، نتایج نشان داد که در گروه‌های TMT+Saline و TMT+FER25 نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری وجود دارد ($p < 0.001$). از طرفی، بین گروه TMT+Saline با گروه‌های TMT+FER50 و TMT+FER100 اختلاف معنی‌داری دیده می‌شود ($p < 0.001$). این امر نشان دهنده اثر فرولیک اسید بر کاهش میزان خطای دست چپ و هماهنگی بین دست‌ها طی آزمون راه رفت شبکه‌ای است. گروه TMT+FER25 با گروه‌های TMT+FER50 و TMT+FER100 افزایش معنی‌داری در این شاخص نشان داد ($p < 0.001$).

در ارزیابی درصد خطای پای راست بین گروه کنترل با گروه‌های TMT+Saline، TMT+FER25 و TMT+FER50 ($p < 0.001$) و با گروه TMT+FER100 ($p < 0.01$) اختلاف معنی‌داری قابل مشاهده است. کاهش میزان خطای پای راست در گروه‌های دریافت کننده فرولیک اسید در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم نسبت به گروه TMT+Saline دیده شد ($p < 0.01$).

درصد خطای پای چپ در گروه کنترل نسبت به گروه‌های TMT+Saline و TMT+FER25 کاهش معنی‌داری داشت ($p < 0.001$). هر چند این میزان در گروه‌های TMT+FER50 و TMT+FER100 با گروه TMT+Saline نیز با کاهش معنی‌داری روبرو بود ($p < 0.01$). همچنین، اختلاف معنی‌داری بین گروه TMT+FER25 با دو گروه دیگر تیمار با فرولیک اسید با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم دیده شد (جدول ۲) ($p < 0.05$).

جدول ۲. مقایسه میانگین $\pm$ خطای استاندارد درصد خطای دست و پا در آزمون راه رفتن شبکه‌ای در گروه‌های مختلف

گروه/پارامتر	خطای دست راست	خطای دست چپ	خطای پای راست	خطای پای چپ
کنترل	۵/۱۱ $\pm$ ۱/۴۳	۸/۴۳ $\pm$ ۱/۰۷	۱۰/۰۱ $\pm$ ۲/۴۵	۱۰/۱۸ $\pm$ ۲/۶۳
TMT+Saline	* ۱۱/۹۰ $\pm$ ۳/۰۶	* ۲۱/۳۶ $\pm$ ۳/۶۲	* ۳۴/۲۱ $\pm$ ۴/۵۲	* ۲۱/۴۲ $\pm$ ۳/۳۸
TMT+FER25	* ۱۰/۸۵ $\pm$ ۲/۷۶	* ۲۰/۴۶ $\pm$ ۵/۱۱	* ۳۱/۹۷ $\pm$ ۳/۸۴	* ۱۹/۰ $\pm$ ۳/۹۸
TMT+FER50	* ۹/۴۳ $\pm$ ۲/۶۳	† ۱۰/۸۷ $\pm$ ۲/۷۵	† ۲۶/۳۸ $\pm$ ۴/۲۹	† ۱۲/۱۰ $\pm$ ۳/۴۴
TMT+FER100	† ۶/۱۲ $\pm$ ۱/۲۷	† ۱۲/۲۵ $\pm$ ۳/۹۳	# ۱۹/۶۸ $\pm$ ۳/۶۷	† ۱۴/۲۱ $\pm$ ۳/۸۶
سطح معنی‌داری (ANOVA)	۰/۰۱۱	۰/۰۰۴	۰/۰۰۸	۰/۰۰۱

برای مقایسه گروه‌ها با هم از آنالیز تعقیبی Tukey استفاده شد. تعداد حیوانات در هر گروه ۱۵ سر موش صحرایی بود. سطح معنی داری در آزمون تحلیل واریانس یک طرفه $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. *: مقایسه با گروه کنترل، †: مقایسه با گروه TMT+Saline، # مقایسه با گروه TMT+FER25.

است برای جلوگیری از اختلال شناختی ناشی از TMT مفید باشد (۳۱).

هرچند، انتخاب مدل حیوانی ADHD به دلایل زیادی مانند عدم تعیین معیار مناسب برای جمعیت متجانس قابل تشخیص، ناشناخته بودن پاتولوژی و درجات متفاوت در شدت بیماری آسان نیست (۳۲). با این حال، Tamburella و همکارانش، این مدل را برای ارزیابی رفتاری ADHD در موش‌های صحرایی پیشنهاد می‌کنند (۴). به منظور بررسی اثرات سمیت TMT بر فعالیت لوکوموتور به عنوان شاخصه اصلی اختلال ADHD طی آزمون محفظه باز، بیش فعالی به همراه کاهش رفتارهای اکتشافی و در مدل حاضر و در گروه TMT+Saline نسبت به گروه کنترل دیده شد. مسمومیت با TMT احتمالاً سبب کاهش بیان فاکتور نوروتروفیک مغزی (BDNF) در هیپوکامپ می‌شود (۳۳). یکی از مکانیزم‌های اتیولوژیک بیماری ADHD، کاهش بیان فاکتور نوروتروفیک مغزی (BDNF) و گیرنده‌های TrKB در هیپوکامپ است (۳۴). BDNF دارای اثرات تروفیک در رشد و تکوین سیستم عصبی است (۳۴). با توجه به مشاهده رفتارهای شبه اضطرابی موش‌های صحرایی تیمار شده با TMT در دوران جنینی طی آزمون محفظه باز و بررسی کاهش محتوای BDNF در سرم خون و بافت هیپوکامپ در مطالعه قبلی ما (۳۳)، از این رو می‌توان اظهار داشت که احتمالاً یکی از دلایل بروز رفتارهای شبه اضطرابی، آسیب هیپوکامپ و کاهش محتوای نوروتروفینی BDNF در سطح خونی و هیپو کامپی حیوانات تیمار شده با TMT است.

هرچند، مطالعه‌ای در رابطه با اثر فرولیک اسید بر بهبود رفتارهای اضطرابی در مدل مسمومیت دوران پریناتال، نتوناتال یا بلوغ با TMT صورت نگرفته است، با این حال، اثرات ضد اضطرابی فرولیک اسید و ارتباط آن با مسیر سیگنالی NMDA دیده شده است. در واقع، گیرنده NMDA نقش تقویت کننده و تسهیل کننده در ارتباط با اثرات ضد اضطرابی فرولیک اسید در آزمون محفظه باز و ماز صلیبی مرتفع داشته است (۳۵).

مطالعه حاضر نشان داد که متعاقب مسمومیت پری‌ناتال با TMT، اختلال در تعادل، ناهماهنگی در حرکات دست و پا و اختلال در یادگیری حرکتی دیده می‌شود. در مطالعه قبلی ما دیده شد که مسمومیت با TMT سبب تخریب نورون‌های پورکینز و کاهش دانسیته نورونی سلولهای گرانولی به ویژه در فولیای V و VI می‌شود (۱۰). این بخش از مخچه با عملکردهای شناختی و یادگیری حرکتی در ارتباط هستند. همچنین، کاهش قابل توجه حجم مخچه و دانسیته نورونی

نتایج پژوهش‌های قبلی نشان داده است که فقدان نورنی و اختلال در عملکرد هیپوکامپ می‌تواند به آسیب در حافظه کاری منتج شود (۲۳). از طرفی، متعاقب مسمومیت با TMT، سلول‌های گرانولی ژيروس دندانهای و سپس سلول‌های هرمی در نواحی CA1، CA3 و CA4 هیپوکامپ تخریب می‌شوند (۲۴) که می‌تواند منجر به نقص در حافظه کاری شود. آسیب عصبی ایجاد شده در اثر TMT در نتیجه تولید گونه‌های اکسیژن و نیتروژن واکنشی است (۲۴). در واقع، TMT با فعال کردن کاسپاز ۳ سیگنالی را برای تخریب سلول نورون‌های هیپوکامپ، لوب بویایی و هسته پیشین بویایی در موش می‌فرستد (۲۵). مکانسیم‌های مولکولی TMT شامل اختلال در میتوکندری، استرس اکسیداتیو و اضافه بار کلسیم درون سلولی که منجر به ورود نتراسیون هیپوکامپ می‌شود (۲۴). اختلال در هموستاز آنزیم گلووتامین و عدم تعادل در وضعیت اکسیداتیو در پی تزریق TMT با دوز ۸/۵ میلی گرم برکیلوگرم وزن بدن موش صحرایی منجر به مرگ فزاینده نورون‌ها به ویژه در ناحیه هیپوکامپ می‌شود (۲۶). هرچند، تیمار با فرولیک اسید سبب بهبود قابل توجه در حافظه کاری گردید. در واقع با افزایش دوز فرولیک اسید، شدت اختلال شناختی ناشی از مسمومیت پریناتال TMT کاهش یافت. برخی از مطالعات علت ADHD را نقص در سیستم آنتی اکسیدانی، التهاب مزمن عصبی و آسیب اکسیداتیو نورونی عنوان می‌کنند و بنابراین، تعادل در سیستم آنتی اکسیدانی و تغذیه مبتنی بر آنتی اکسیدانها را در پیشگیری از بروز این اختلال موثر می‌دانند (۲۷). همچنین، از آنجایی که علت آسیب شناختی و رفتاری استرس اکسیداتیو ناشی از TMT است (۲۸)، لذا استفاده از فنول‌های گیاهی مانند فرولیک اسید می‌تواند در بهبود عوارض آن مفید واقع شود. حسن زاده و همکارانش نشان دادند که فرولیک اسید ضمن دارا بودن اثرات ضد تشنجی، از استرس اکسیداتیو و اختلالات شناختی ناشی از تجویز پنتیلن تترازول در مدل تشنج تونیک-کلونیک جلوگیری به عمل می‌آورد (۲۹). همچنین، فرولیک اسید دارای اثرات سودمندی در کاهش اختلال شناختی در مدل حیوانی بیماری دیابت است و با مهار سائتوکین‌های التهابی و کاهش بیان پروتئین تیروزین فسفاتاز ۱ بتا سهم قابل توجهی در بهبود آسیب سیگنالینگ انسولین در مغز دارد (۳۰). Kim و همکارانش بیان داشتند که اسید فرولیک باعث تخریب حافظه ناشی از مسمومیت با TMT می‌شود و همچنین، باعث کاهش فعالیت کولین استیل ترانسفراز در موش‌های صحرایی می‌شود. این مسئله نشان می‌دهد که فرولیک اسید ممکن

مخچه در بیماران مبتلا به ADHD (۳۶) اتیلوژی مشترک بین مسمومیت پری ناتال با TMT و ADHD را نشان می‌دهد. نقص عملکردی مخچه در بسیاری از اختلالات تکاملی عصبی از جمله اوتیسم و ADHD دیده شده است (۳۶). اختلال در روند تکوین مخچه اثرات دراز مدت بر حرکت، شناخت و یادگیری حرکتی دارد. از آنجایی که آسیب به مخچه در مراحل اولیه تکوین، با شدت اختلالات بیشتری نسبت به آسیب آن در دوران بلوغ همراه است؛ لذا نقش مخچه در دوران جنینی در پاتولوژی بیماری‌های تکاملی عصبی از جمله ADHD اهمیت بالایی دارد (۳۶).

از طرفی، قرار گرفتن در معرض دوز پایین TMT آسیب سلول‌های گرانولی مخچه و قطعه قطعه شدن DNA را از طریق مسیر آپوپتوز نشان می‌دهد و غلظت‌های بالاتر TMT باعث نکروزه شدن می‌شوند، که در آن گیرنده‌های گلوتاماتی NMDA و غیر NMDA درگیر هستند. سمیت تحریکی گلوتامات می‌تواند نقش مهمی را در آبشار سیگنالینگ مرتبط با آپوپتوز بازی کند (۳۷). بنابراین، در مطالعه حاضر، آسیب در یادگیری حرکتی احتمالاً ناشی از اختلال در عملکرد مخچه و آسیب سلول‌های پورکینژ است که تیمار با آنتی اکسیدان فرولیک اسید توانست شدت این آسیب را مشابه آنچه در آزمون راه رفتن شبکه‌ای دیده شد، کاهش دهد.

مطالعه حاضر برای نخستین بار اثرات پری‌ناتال TMT را بر یادگیری حرکتی، بروز رفتارهای شبه اضطرابی و اختلال در عملکردهای اکتشافی در موش‌های صحرایی نشان داد و با توجه به اثرگذاری TMT بر آسیب حافظه و شناخت این مدل را جهت ارزیابی رفتارهای شبه ADHD تایید می‌کند. همچنین، از آنجایی که تاکنون مطالعه‌ای درباره نقش فرولیک اسید در بهبود یادگیری حرکتی و شناختی پس از مسمومیت پری‌ناتال با TMT انجام نشده است، مطالعه حاضر نشان داد که تیمار با فرولیک اسید می‌تواند از شدت آسیب‌های شناختی، حرکتی و رفتاری در این مدل بکاهد و لذا می‌توان آنتی اکسیدان‌ها و مصرف آن را در دوران بارداری راهی برای پیشگیری از ابتلا به اختلالات شناختی و رفتاری نوزادان دانست. با توجه به نقش سیگنال درون سلول BDNF، آسیب به این مسیر متعاقب مسمومیت با TMT و نقش احتمالی آن در بروز علائم اضطرابی همراه با نواقص شناختی انجام مطالعات ملکولی مسیر سیگنال دهی BDNF-Akt-CREB پیشنهاد می‌شود.

تقدیر و تشکر

از زحمات حوزه محترم پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی شیراز جهت فراهم آوردن شرایط و امکانات تحقیق حاضر تقدیر به عمل می‌آید.

REFERENCES

1. Saary M, House R. Preventable exposure to trimethyltin chloride: a case Report. *Occup Med* 2002; 52:227-30.
2. Lee S, Yang M, Kim J, Kang S, Kim J, Kim JC, et al. Trimethyltin-induced hippocampal neurodegeneration: A mechanism-based review. *Brain Res Bull* 2016; 125:187-99.
3. Tanguay R, Dong Q, Chen J, Huang C, Zheng L, Simonich M, Bai C. Trimethyltin chloride (TMT) neurobehavioral toxicity in Embryonic zebrafish. *Neurotoxicol Teratol* 2011; 33: 721-26.
4. 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.
5. Corvino V, Marchese E, Michetti F, Geloso MC. Neuroprotective strategies in hippocampal neurodegeneration induced by the neurotoxicant trimethyltin. *Neurochem Res* 2013 ;38:240-53.
6. Ptacek R, Weissenberger S, Braaten E, Klicperova-Baker M, Goetz M, Raboch J, et al. Clinical Implications of the Perception of Time in Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD): A Review. *Med Sci Monit* 2019; 25:3918-3924.
7. Tanguay R, Dong Q, Chen J, Huang C, Zheng L, Simonich M, et al. Trimethyltin chloride (TMT) neurobehavioral toxicity in Embryonic zebrafish. *Neurotoxicol Teratol* 2011; 33: 721-26.
8. Bruchhage MMK, Bucci MP, Becker EBE. Cerebellar involvement in autism and ADHD. *Handb Clin Neurol* 2018; 155:61-72.
9. Gunasekar P, Li L, Prabhakaran K, Eybl V, Borowitz J, Isom G. Mechanisms of the apoptotic and necrotic actions of trimethyltin in cerebellar granule cells. *Toxicol Sci* 2001; 64: 83-9.
10. Shams-Alam S, Edalatmanesh MA. The Effete of Lithium Chloride on the Granular Cell Density in Cerebellar Folia V and VI in a Trimethyltin Intoxication Model. *Shefaye Khatam* 2015; 3:41-48. [In Persian]

11. Kraft AD, McPherson CA, Harry GJ. Association between Microglia, Inflammatory Factors, and Complement with Loss of Hippocampal Mossy Fiber Synapses Induced by Trimethyltin. *Neurotox Res* 2016; 30:53-66.
12. Fornai F, Trabucco A, Pietro P, Nori SL, Fulceri F, Fumagalli L, et al. Methylated tin toxicity a reappraisal using rodents models. *Arch Ital Biol* 2009;147:141-53.
13. Moghadas M, Essa MM, Ba-Omar T, Al-Shehi A, Qoronfleh MW, Eltayeb EA, et al. Antioxidant therapies in attention deficit hyperactivity disorder. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2019; 24:313-33.
14. El-Bassossy H, Badawy D, Neamatallah T, Fahmy A. Ferulic acid, a natural polyphenol, alleviates insulin resistance and hypertension in fructose fed rats: Effect on endothelial-dependent relaxation. *Chem Biol Interact* 2016; 254:191-7.
15. Zduńska K, Dana A, Kolodziejczak A, Rotsztein H. Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application. *Skin Pharmacol Physiol* 2018; 31:332-36.
16. Catino S, Paciello F, Miceli F, Rolesi R, Troiani D, Calabrese V, et al. Ferulic Acid Regulates the Nrf2/Heme Oxygenase-1 System and Counteracts Trimethyltin-Induced Neuronal Damage in the Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y. *Front Pharmacol* 2016; 6:305.
17. Edalatmanesh MA, Yazdani M, Davoodi A, Rafiei S. Anxiolytic Effect of Lithium Chloride in Model of PTZ-Induced Seizure. *Horizon Med Sci* 2018; 24:79-87. [In Persian]
18. Bagha N, Edalatmanesh M. Effectiveness of Erythropoietin on Working Memory, Passive Avoidance Learning and Anxiety- Like Behaviors in Prenatal Food Restriction Model. *Report of Health Care* 2018; 4: 36-43.
19. Edalatmanesh MA, Bahrami AR, Hosseini E, Hosseini M, Khatamsaz S. Neuroprotective effects of mesenchymal stem cell transplantation in animal model of cerebellar degeneration. *Neurol Res* 2011; 33:913-20.
20. Edalatmanesh MA, Nikfarjam H, Moghadas M, Haddad-Mashadrizheh A, Robati R, Hashemzadeh MR. Histopathological and behavioral assessment of toxin-produced cerebellar lesion: a potent model for cell transplantation studies in the cerebellum. *Cell J* 2014; 16:325-34.
21. Yoshikawa Y, Ago T, Kuroda J, Wakisaka Y, Tachibana M, Komori M, et al. Nox4 Promotes Neural Stem/Precursor Cell Proliferation and Neurogenesis in the Hippocampus and Restores Memory Function Following Trimethyltin-Induced Injury. *Neuroscience* 2019; 398:193-205.
22. Yuliani S, Widyarini S, Mustofa, Partadiredja G. Turmeric extract inhibits apoptosis of hippocampal neurons of trimethyltin-exposed rats. *Bratisl Lek Listy* 2017; 118:142-8.
23. Cheng H, Sun G, Li M, Yin M, Chen H. Neuron loss and dysfunctionality in hippocampus explain aircraft noise induced working memory impairment: a resting-state fMRI study on military pilots. *Biosci Trends* 2019;13:430-40.
24. Marchese E, Corvino V, Di Maria V, Furno A, Giannetti S, Cesari E, et al. The Neuroprotective Effects of 17 β -Estradiol Pretreatment in a Model of Neonatal Hippocampal Injury Induced by Trimethyltin. *Front Cell Neurosci* 2018; 12:385.
25. Kim J, Yang M, Kim SH, Kim JC, Wang H, Shin T, et al. Possible role of the glycogen synthase kinase-3 signaling pathway in trimethyltin-induced hippocampal neurodegeneration in mice. *PLoS One* 2013; 8: e70356.
26. Shin EJ, Nam Y, Tu TH, Lim YK, Wie MB, Kim DJ, et al. Protein kinase C δ mediates trimethyltin-induced neurotoxicity in mice in vivo via inhibition of glutathione defense mechanism. *Arch Toxicol* 2016; 90:937-53.
27. Verlaet AAJ, Maasackers CM, Hermans N, Savelkoul HFJ. Rationale for Dietary Antioxidant Treatment of ADHD. *Nutrients* 2018;10:405.
28. Edalatmanesh MA, Shahsavan S, Rafiei S, Khodabandeh H. The Effect of Gallic Acid on Depression Symptoms, Oxidative Stress Markers and Inflammatory Cytokines in Rats' Hippocampus after TMT Intoxication: An Experimental Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2018; 17:815-28. [In Persian]
29. Hassanzadeh P, Arbabi E, Atyabi F, Dinarvand R. Ferulic acid exhibits antiepileptogenic effect and prevents oxidative stress and cognitive impairment in the kindling model of epilepsy. *Life Sci* 2017; 179:9-14.
30. Wang H, Sun X, Zhang N, Ji Z, Ma Z, Fu Q, et al. Ferulic acid attenuates diabetes-induced cognitive impairment in rats via regulation of PTP1B and insulin signaling pathway. *Physiol Behav* 2017; 182:93-100.
31. Kim MJ, Choi SJ, Lim ST, Kim HK, Heo HJ, Kim EK, et al. Ferulic acid supplementation prevents trimethyltin-induced cognitive deficits in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71:1063-8.
32. Posner J, Polanczyk GV, Sonuga-Barke E. Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 2020; 395:450-62.

33. Edalatmanesh M A, Sheikholeslami M, Rafiei S. Evaluation of brain-derived neurotrophic factor expression and spatial memory after valproic acid administration in animal model of hippocampal degeneration. *Feyz* 2018; 22: 283-91. [In Persian]
34. Leo D, Sukhanov I, Zoratto F, Illiano P, Caffino L, Sanna F, et al. Pronounced Hyperactivity, Cognitive Dysfunctions, and BDNF Dysregulation in Dopamine Transporter Knock-out Rats. *J Neurosci* 2018; 38:1959-72.
35. Lorigooini Z, Nouri A, Mottaghinia F, Balali-Dehkordi S, Bijad E, Dehkordi SH, et al. Ferulic acid through mitigation of NMDA receptor pathway exerts anxiolytic-like effect in mouse model of maternal separation stress. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2020 May 6.
36. Stoodley CJ. The Cerebellum and Neurodevelopmental Disorders. *Cerebellum* 2016; 15:34-37.
37. Mundy WR, Freudenrich TM. Apoptosis of cerebellar granule cells induced by organotin compounds found in drinking water: involvement of MAP kinases. *Neurotoxicology* 2006; 27:71-81.