

Trimethyltin에 의한 랫드 해마의 신경세포 사멸과 iNOS의 연관성

장석원¹ · 최성영¹ · 박창남¹ · 안미정² · 신태균^{1,*} · 김승준^{3,*}

¹제주대학교 수의과대학, ²제주대학교 의학전문대학원, ³경북대학교 수의과대학

(접수: 2011년 6월 3일, 수정: 2011년 8월 22일, 게재승인: 2011년 8월 22일)

Inducible nitric oxide synthase is involved in neuronal death induced by trimethyltin in the rat hippocampus

Sukwon Jang¹, Sungyoung Choi¹, Changnam Park¹, Meejung Ahn², Taekyun Shin^{1,*}, Seungjoon Kim^{3,*}

¹College of Veterinary Medicine and Veterinary Medical Research Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

²Department of Anatomy, School of Medicine, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

³College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

(Received: June 03, 2011; Revised: August 22, 2011; Accepted: August 22, 2011)

Abstract : Trimethyltin chloride (TMT) has been used as a neurotoxin for inducing brain dysfunction and neuronal death. Neuronal death in the hippocampus by TMT may generate excessive nitric oxide, but there are few studies about nitric oxide synthase enzyme involved in the synthesis of nitric oxide. The purpose of present study is to analyze the TMT toxicity in each region of rat hippocampus. To evaluate the involvement of nitric oxide, we analyzed the effects of aminoguanidine known as a selective inhibitor for inducible nitric oxide synthase on behavioral changes and the hippocampus of rat by TMT toxicity. 6-week-old male Sprague-Dawley rats were administered with a single dose of TMT (8 mg/kg b.w., i.p.) and the control group was similarly administered with distilled water. TMT + aminoguanidine-treated groups were administered with aminoguanidine (10 mg/kg or 100 mg/kg b.w., i.p.) for 3 days prior to TMT injection. The rats were sacrificed 2 days after TMT administration. In the TMT-treated group, a number of cell losses were seen in CA1, CA3 and the dentate gyrus. In the TMT + aminoguanidine-treated group, neuronal death was seen in CA1 and CA3, but reduced in the dentate gyrus compared to the TMT-treated group. Western blot analysis showed that cleaved caspase-3 expression was increased in the TMT-treated group compared to the control group. However, the expression significantly declined in the TMT + aminoguanidine-treated group. The present findings suggest that inducible nitric oxide synthase is involved in neuronal death induced by TMT.

Keywords : aminoguanidine, hippocampus, iNOS, trimethyltin

서 론

Trimethyltin chloride(TMT)는 신경세포의 사멸과 신경계의 기능손상을 유도할 수 있는 신경독성제로 알려져 있다 [13]. TMT을 실험적으로 랫드에 복강내 주입하면 꼬리를 쫓는 행동, 자학행동, 발성, 경련, 학습장애와 같은 여러 가지 증상들을 나타내며 이러한 증상들을 총괄하여 “TMT 증후군”이라고 보고되어 있다 [5]. TMT가

투여된 동물의 경우 해마의 신경세포 사멸이 특징적으로 관찰된다고 알려져 있다 [14]. 이와 같은 신경세포의 사멸은 hydrogen peroxide 또는 nitric oxide와 같은 산화적 stress와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있고, catalase 와 같은 항산화제에 의해 세포사멸이 억제될 수 있음이 알려져 있다 [8]. 그러나 아직까지 nitric oxide가 TMT에 의한 행동변화 및 세포사멸에 어떤 영향을 미칠 수 있는지에 관한 실험적 연구는 많지 않다.

*Corresponding authors

Tel: +82-64-754-3363, Fax: +82-64-702-9920 (Taekyun Shin)

E-mail: shint@jeju.ac.kr

Tel: +82-53-950-5971, Fax: +82-53-950-5955 (Seungjoon Kim)

E-mail: kjoon00@knu.ac.kr

Nitric oxide는 뇌에서 신경전달과 같은 중요한 역할을 하며 [3, 6], L-arginine으로부터 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 생성되며 NOS는 초기 발견된 세포형에 따라 신경세포 유래의 neuronal NOS, 혈관 내피세포 유래의 endothelial NOS, 감각된 macrophage에서 관찰되는 inducible NOS로 나눌 수 있다 [15]. 정상적인 동물에서 생성된 nitric oxide는 항상성 유지에 필수 불가결한 물질이지만 [2], 염증 시 과다하게 생성된 nitric oxide는 생체에 해로울 수 있다고 한다 [7]. TMT에 의한 해마 신경세포의 사멸도 과다하게 생성된 nitric oxide가 관련되어 있을 개연성이 높으나 nitric oxide 생성과 관련이 있는 NOS 효소에 관한 연구는 많지 않다.

본 연구의 목적은 TMT 독성에 의한 rat의 해마손상을 부위별로 분석하고, 다음으로 nitric oxide의 관여 여부를 확인하기 위하여 inducible NOS의 억제제로 알려진 aminoguanidine [1]이 TMT 독성에 의한 rat의 행동 변화 및 해마조직에 어떤 영향을 미치는지 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물과 실험약물

실험동물은 6주령 수컷 Sprague-Dawley 랫드(오리엔트바이오, 한국)를 구입하여 사육상자에 넣어 사육하였다. 실험기간 동안의 사육환경은 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기횟수 10~15회/h, 인공조명(12시간 점등, 12시간 소등), 조도 150~300 lux의 조건을 유지하였다. 사육 관리는 실험동물전용 고품 사료(pellet chew: 5L79 diets; PMI Nutrition, USA)를 급여하였고, 음수는 제한 없이 공급하였다. 본 연구의 모든 동물실험은 제주대학교 동물실험윤리위원회에 의해 승인을 받아 수행되었다. Trimethyltin chloride와 aminoguanidine은 Sigma Chemical(USA)에서 구입하였다.

TMT 적정용량 측정

해마에 적절한 손상을 줄 수 있는 TMT 용량을 확인하기 6주령 수컷 Sprague-Dawley 랫드를 그룹(TMT 6 mg/kg 투여군, 8 mg/kg 투여군, 10 mg/kg 투여군, 12 mg/kg 투여군)당 3마리씩 나누었고, 48시간 후에 희생시켰다.

TMT 투여 후 적정 희생시간 측정

실험에 적합한 적정 희생 시간을 측정하기 위해 TMT(8 mg/kg)를 복강 투여한 후 24시간, 48시간 및 72시간 희생군으로 그룹당 3마리씩 나누고, 각 실험군을 희생시킨 후 해마의 조직학적 변화를 관찰하였다.

행동학적 평가

TMT를 복강 투여하고 48시간 후 동물을 희생시키기 전 1분간 앞발을 드는 횟수를 측정하였다. 랫드가 앞발을 드는 행동은 먹이를 찾거나, 몸단장을 하고, 호기심에 의한 행동으로 신경증상이나 행동학적 이상을 확인할 수 있으며 본 연구에서 앞발을 드는 횟수 측정을 신경학적 활동 평가로 사용하였다. 해마의 크기가 정서불안과 같은 행동이상을 보이고 [9], 이러한 증상은 해마의 구성세포들의 세포사에 의한 결과와도 일치한다고 생각된다.

실험군의 구성

Aminoguanidine이 해마에 미치는 영향을 평가하기 위해 실험동물은 PBS를 단독으로 투여한 대조군(control), TMT를 단독으로 투여한 실험군(vehicle), TMT 투여 전 aminoguanidine을 주입한 실험군은 10 mg/kg 투여군(TMT + AG10), 100 mg/kg 투여군(TMT + AG100)으로 나누었다(n = 3, per group).

TMT 투여와 조직표본 준비 및 조직검사

TMT는 실험동물의 복강에 8 mg/kg의 용량으로 투여하였고, aminoguanidine은 10 mg/kg 및 100 mg/kg의 용량으로 TMT 투여 전 3일간 복강 내로 투여하였다. 실험동물은 에테르로 마취하여 방혈하였고, 대뇌의 해마 부분을 적출하여, 각 조직의 일부분은 단백질 발현을 보기 위한 웨스턴 샘플로 급속 냉동하여 사용까지 -70°C 의 deep freezer에 보관하였다. 조직염색용 조직은 4% paraformaldehyde 용액에 고정하고, ethanol과 xylene으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 5 μm 의 두께로 조직절편을 만들어 hematoxylin-eosin 염색 및 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling(TUNEL)을 실시하였다. Cresyl violet 염색용 조직절편은 10 μm 의 두께를 사용하였다.

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling(TUNEL)

적출한 장기 조직은 TMT 투여 후 48시간 후에 적출되었다. 조직은 PBS에 녹인 4% paraformaldehyde 용액에 고정한 후 파라핀에 포매하고, 슬라이드 글라스에 5 μm 두께로 조직 절편을 만들었다. DNA 분열은 in situ nick end-labeling을 통해 검출되었고, 염색 방법은 제조사(Calbiochem, Germany)의 지시사항에 따라 시행되었다. 파라핀 절편은 파라핀을 제거, 수세 후 Proteinase K(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 15분간 상온에서 반응시킨 후, 0.15 U/ μL 의 TdT와 0.0004 nmol/ μL 의 digoxigenin-dUTP를 포함한 TdT 반응완충용액(140 mM sodium cacodylate, 1 mM CoCl_2 , 30 mM Tris-HCl, pH 7.2)에 60분간 37°C 에서 반

용시켰고, 10분간 TBS용액(300 mM NaCl, 30 mM sodium citrate)에 담가두었다. 그 후 30분간 상온에서 peroxidase-labeled anti-digoxigenin antibody로 반응시킨 후, diaminobenzidine으로 발색을 하고 광학 현미경을 이용하여 관찰하였다. 현미경 시야에서 dentate gyrus의 세포사멸사를 확인하였고, dentate gyrus에서의 TUNEL-양성 세포들의 숫자는 각 그룹별 평균 \pm 표준편차의 표준오차(mean \pm SEM)로 표시하였다. 각 실험군의 데이터 분석은 Student-Newman-Keuls test를 이용하여 통계처리를 한 후 통계학적 유의성($p < 0.05$)을 검정하였다.

Western blot analysis

적출한 장기 조직은 leupeptin(0.5 μ g/mL), PMSF(1 mM), aprotinin(5 μ g/mL) 등의 protein inhibitor가 포함된 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, 120 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40(polyoxyethylene [9] p-t-octyl phenol)의 buffer에 넣어 완전히 파쇄한 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 이들을 단백질 정량하여 변형시킨 후 동량(20 μ g/20 μ L)으로 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에서 전기영동하고, gel 상의 단백질을 다시 nitrocellulose membrane에 100 V에서 2시간 동안 이동시켰다. 옮겨진 membrane을 5% skim milk로 blocking한 후, 1차 항체로 rabbit anti-cleaved caspase-3(1 :

1,000; Cell Signaling Technology, USA)을 실온에서 1시간 반응시킨 후 2차 항체는 horseradish peroxidase-conjugated horse anti-rabbit IgG(Vector Laboratories, USA)를 실온에서 60분간 반응시켰다. 면역반응이 끝난 membrane은 Amersham ECL reagents(Amersham Life Science, UK)로 반응시켜, X-ray 필름에 노출시키고, 그 결과를 densitometer(M GS-700 Imaging Densitometer, Bio-Rad laboratories, USA)를 사용하여 측정하였다.

결 과

TMT 적정용량 측정

TMT의 용량에 따른 해마 신경세포의 손상을 연구한 결과, 6 mg/kg 용량의 실험군은 신경세포의 손상이 나타나지 않았으며, 8 mg/kg 용량의 실험군은 CA1 부위, CA3 부위 및 dentate gyrus에서 유의성 있는 신경세포 사멸이 관찰되었다. 10 mg/kg 용량의 실험군은 해마 각 부위 세포층의 현저한 뉴런의 손실이 나타났고, 12 mg/kg 용량의 실험군은 투여 후 24시간 내에 실험동물이 폐사하였다. 이러한 실험결과에 따라 본 실험에서는 TMT에 의한 신경세포의 사멸에 inducible nitric oxide synthase가 연관됨을 연구하기 위해 적정 TMT의 용량을 뉴런 사멸이 유의성 있게 증가하는 8 mg/kg으로 정하였다(Fig. 1).

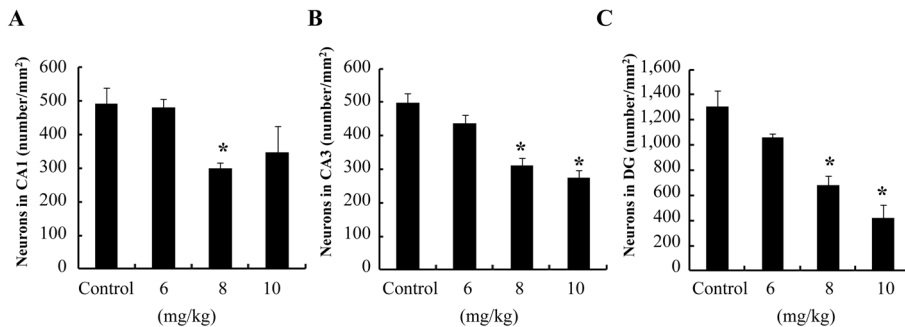


Fig. 1. Dose dependent changes in rat hippocampus after Trimethyltin chloride (TMT) injection. * $p < 0.01$ vs. normal control.

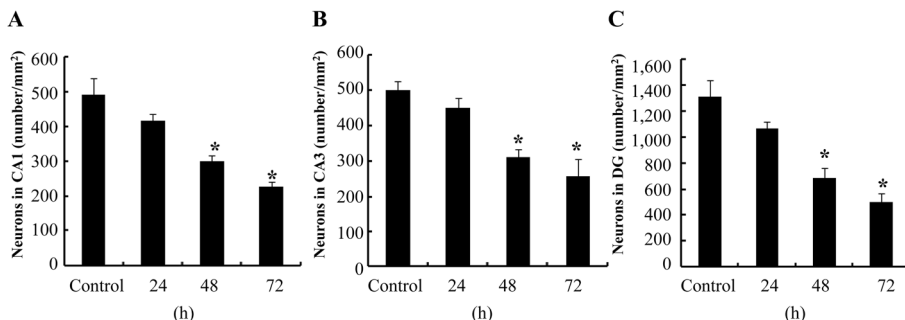


Fig. 2. Time course of changes in rat hippocampus after TMT injection. * $p < 0.01$ vs. normal control.

TMT 투여 후 적정 희생시간 측정

TMT 투여 후 24시간 희생 실험군은 해마 신경세포의 뚜렷한 손실이 관찰되지 않았다. 48시간 희생 실험군은 해마 신경세포 유의성 있는 손상이 CA1 부위, CA3 부위 및 dentate gyrus에서 관찰되었다. 72시간 실험군은 해마 세포층 전체에서 현저한 신경세포 손상을 나타내었다. 따라서 본 실험에서는 각 부위별 유의성 있는 해마 신경세포 손상이 관찰되는 TMT 투여 후 48시간 후가 적절하다고 판단하였다(Fig. 2).

앞발을 드는 횟수의 변화

1분 동안 랫드가 앞발을 드는 횟수를 측정하여 비교한 결과, TMT를 투여하지 않은 정상군에 비하여 TMT를 복용 투여한 실험군은 앞발을 드는 횟수가 유의하게 증가되었고, TMT와 aminoguanidine을 병용 투여한 실험군은 TMT 대조군에 비하여 횟수가 유의하게 감소되었다(Fig. 3).

Dentate gyrus에서의 TUNEL 염색

형태학적 소견상 CA1 부위, CA3 부위 및 dentate gyrus에서 관찰된 pyknotic 세포가 세포자멸사에 의한 것인지 확인하기 위해 TUNEL 염색을 실시한 결과, 정상군은

양성 세포가 관찰되지 않았고, dentate gyrus에서 TMT를 투여한 실험군은 유의성 있는 양성 세포의 증가를 나타내었다. 그러나 TMT와 10 mg/kg 용량의 aminoguanidine을 병용 투여한 실험군에서는 TMT 실험군에 비해 양성세포가 확연히 감소되었다. TMT와 100 mg/kg 용량의 aminoguanidine을 병용 투여한 실험군에서도 10 mg/kg 용량을 투여한 실험군과 같은 양상을 나타내었다(Fig. 4). 그러나 CA1 부위와 CA3 부위에서는 TMT 투여군과 aminoguanidine 병용군에서 큰 차이를 보이지 않았다.

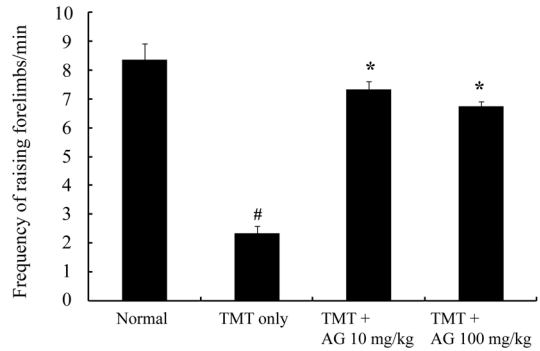


Fig. 3. Frequency of raising forelimbs for a min. #*p* < 0.05 vs. normal control and **p* < 0.05 vs. TMT-treated group.

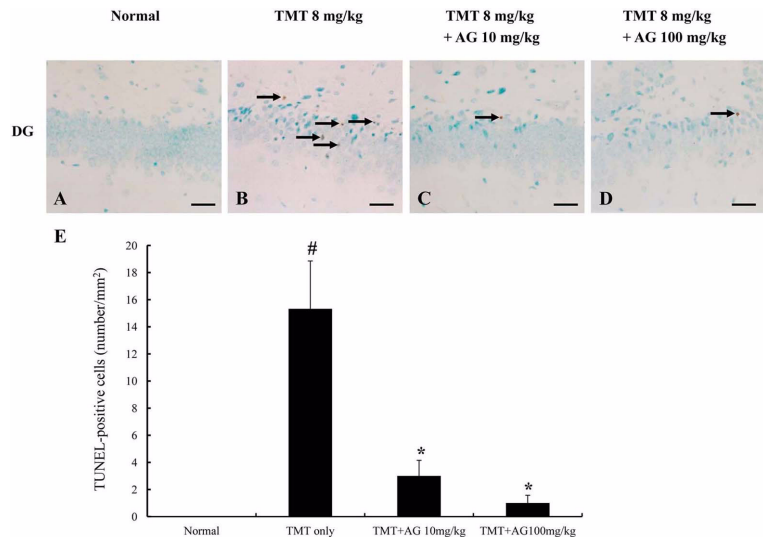


Fig. 4. TUNEL staining of rat hippocampus with normal control (A), TMT-treated group (B), TMT + aminoguanidine (10 mg/kg) group (C), TMT + aminoguanidine (100 mg/kg) group (D). In normal DG (A), no apoptotic cell was found. Many apoptotic cells (arrows) were seen in the TMT-treated rat hippocampus (B). Some apoptotic cells (arrows) were seen in TMT + aminoguanidine (10 mg/kg) group (C) and TMT + aminoguanidine (100 mg/kg) group (D). The number of apoptotic cells was reduced in the dentate gyrus of the TMT + aminoguanidine group compared to the TMT-treated group (E). The number of apoptotic cells (mean SEM) is indicated for four groups: the control rats (N-3), TMT-treated rats (N-3), TMT + aminoguanidine (10 mg/kg)-treated rats (N-3) and TMT + aminoguanidine (100 mg/kg)-treated rats (N-3). #*p* < 0.05 vs. normal control and **p* < 0.05 vs. TMT-treated group. AG: aminoguanidine, DG: Dentate gyrus. Scale bars = 30 μm.

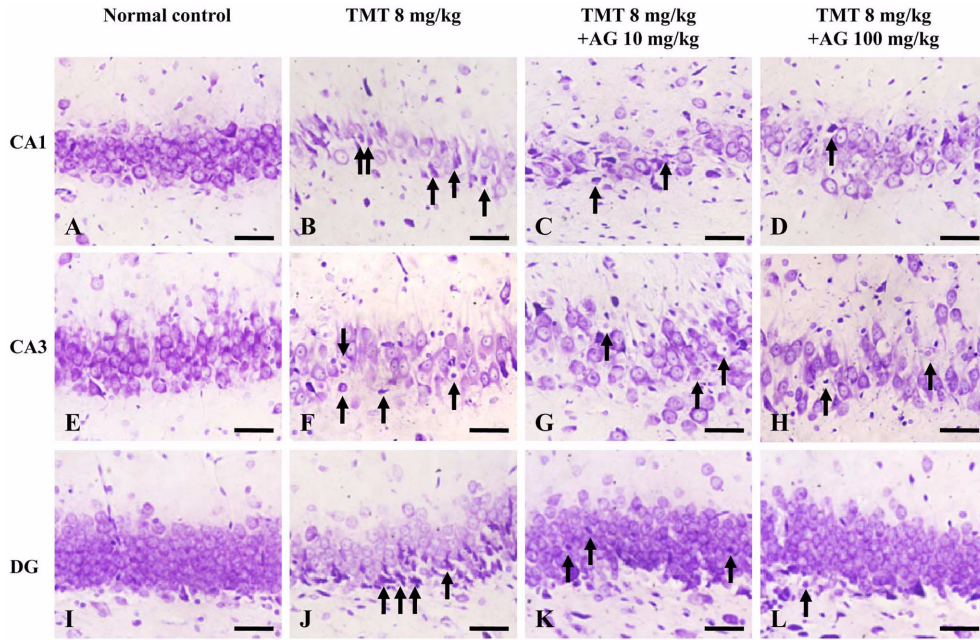


Fig. 5. Cresyl violet staining of rat hippocampus with normal control (A, E, I), TMT (8 mg/kg, 48 h)-treated group (B, F, J), TMT + aminoguanidine (10 mg/kg)-treated group (C, G, K), TMT + aminoguanidine (100 mg/kg)-treated group (D, H, L). The loss of neurons in CA1 and CA3 regions was seen in the TMT-treated rat hippocampus (B and F). Some pyknotic cells (arrows) were seen in the TMT-treated rat dentate gyrus (J). The loss of neurons in CA1 and CA3 regions was seen in the TMT + aminoguanidine (10 mg/kg)-treated group (C and G) and TMT + aminoguanidine (100 mg/kg)-treated group (D and H). AG: aminoguanidine, DG: Dentate gyrus, CA: Cornu ammonis. Scale bars = 30 μ m.

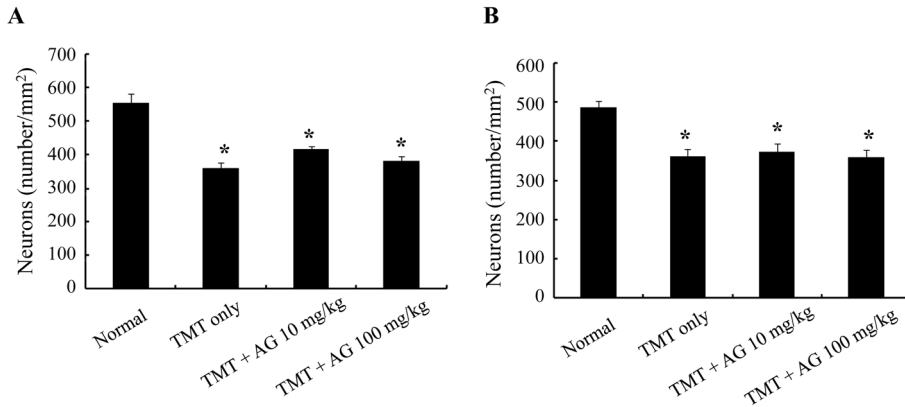


Fig. 6. Number of surviving neurons in CA1 (A) and CA3 (B) regions of normal control and experimental group. The number of surviving cells (mean \pm SEM) is indicated for four groups: the control rats (N-3), TMT-treated rats (N-3), TMT + aminoguanidine (10 mg/kg)-treated rats (N-3) and TMT + aminoguanidine (100 mg/kg)-treated rats (N-3). * p < 0.05 vs. normal control. AG: aminoguanidine, CA: Cornu ammonis.

해마의 조직학적 변화 및 CA1 부위와 CA 3 부위에서의 세포수 측정

해마의 조직학적 관찰 결과는 최종적으로 신경세포에 특징적으로 염색이 잘되는 cresyl violet 염색을 실시하

였으며, 정상군은 해마의 CA1 부위, CA3 부위 및 dentate gyrus에서 신경세포 손실이 없는 정상적인 조직소견을 나타내었고, TMT를 투여한 실험군은 CA1 부위, CA3 부위 및 dentate gyrus에서 다수의 뉴런 손실이 관찰되

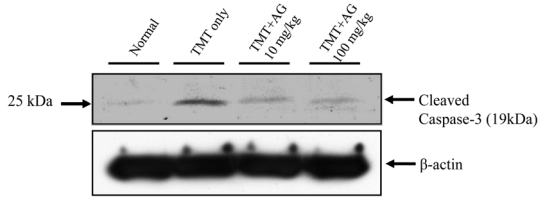


Fig. 7. Western blot analysis of cleaved caspase-3 in the whole hippocampus of normal control, TMT-treated group, TMT + aminoguanidine (10 mg/kg)-treated group and TMT + aminoguanidine (100 mg/kg)-treated group. Arrows indicate the position of cleaved caspase-3 (19 kDa) and β -actin.

었다. TMT와 10 mg/kg 용량의 aminoguanidine을 투여한 실험군은 CA1 부위와 CA3 부위에서 뉴런 손실이 관찰되었으나, 형태학적 소견은 aminoguanidine 병용효과가 뚜렷하게 관찰되었다. TMT와 100 mg/kg 용량의 aminoguanidine을 투여한 실험군에서도 10 mg/kg 용량을 투여한 실험군과 같은 조직 양상을 나타내었다(Fig. 5).

CA1 부위와 CA3 부위에서 양성 세포의 숫자를 측정 한 결과, 정상군에 비해 TMT 실험군과 TMT와 aminoguanidine을 병용 투여한 실험군에서 세포의 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 6). TMT와 aminoguanidine 병용 투여한 실험군에서는 TMT 단독 투여군에 비해 유의성 있는 차이는 없었지만 신경세포 손실이 좀더 미미한 수준으로 관찰되었다.

Western blot analysis

Caspase-3 단백질은 TMT 독성에 의한 산화적 stress에 관여한다고 보고되어 있다 [11]. 본 실험에서 cleaved caspase-3 단백질의 발현 양상을 Western blot 을 이용하여 관찰한 결과, 정상군에 비해 TMT 실험군은 발현이 유의하게 증가하였고, TMT와 aminoguanidine을 병용 투여한 실험군 모두에서 TMT 실험군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 7).

고 찰

본 연구에서는 TMT독성에 의한 랫드의 해마손상을 부위별로 분석하였고, nitric oxide의 관여 여부를 확인하기 위하여 inducible NOS의 억제제로 알려진 aminoguanidine [4]이 TMT 독성에 의한 rat 의 행동변화 및 해마조직에 어떤 영향을 미칠 수 있는지 분석하였다.

랫드에서 TMT독성에 의한 해마손상 연구는 많이 이루어져 있으나, CA1 부위, CA3 부위 및 dentate gyrus를 각 부위별로 차이점을 분석한 연구는 아직 없다. 이번 연구는 8 mg/kg의 용량으로 48시간 후 랫드 해마의 각 부위별 차이점을 분석한 첫번째 논문이다.

TMT독성에 의한 랫드의 해마손상은 CA1 부위와 CA3 부위에서 일어난다고 보고되어 있다 [10]. 본 연구에서 조직학적으로 확인한 TMT독성에 의한 랫드의 CA1 부위와 CA3 부위의 해마손상도 이와 일치한다. 그리고 TMT독성에 의한 랫드의 dentate gyrus에서의 손상에 대한 연구의 결과는 [16], 본 연구에서 확인한 TMT독성에 의한 dentate gyrus의 조직학적 변화 소견과 유사하다.

TMT독성에 의한 신경세포의 사멸은 hydrogen peroxide 또는 nitric oxide 와 같은 산화적 stress와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다 [8]. 그러나 아직까지 nitric oxide가 TMT에 의한 행동변화 및 세포사멸에 어떤 영향을 미칠 수 있는지에 관한 실험적 연구는 많지 않다.

본 연구의 결과, TMT실험군에서 행동학적으로 꼬리를 쫓는 행동, 발성, 경련과 같은 증상이 발생되었으며, 앞발을 드는 횟수를 측정 한 결과 aminoguanidine을 투여함에 따라 TMT에 의한 증상이 완화되는 효과를 확인할 수 있었으며 이러한 행동학적 결과는 해마의 전체적인 양적 크기에 의한 행동학적 이상으로 생각된다 [9]. 아울러 조직병리학적으로도 TMT 실험군과 TMT와 aminoguanidine을 병용 투여한 실험군간에 dentate gyrus에서 차이점이 큰 것으로 보아 TMT에 의한 dentate gyrus에서의 신경세포 사멸에 inducible nitric oxide synthase의 선택적 inhibitor인 aminoguanidine이 관여하는 것으로 사료된다. 또한 본 연구의 cleaved caspase-3 western blotting 결과는 inducible nitric oxide synthase의 inhibitor인 aminoguanidine이 세포사멸사에 관여하는 caspase-3의 작용을 줄여준다는 [12] 보고와 같은 결과이다.

결 론

6주령의 Sprague-Dawley 랫드에서 8 mg/kg 용량의 TMT에 의한 48시간 후 해마의 신경세포의 사멸은 CA1 부위, CA3 부위와 dentate gyrus에 일어나며, 특히 세포사멸사는 dentate gyrus에서 크게 나타나는 것으로 사료된다. 본 실험의 결과로 보아 이러한 신경손상은 산화적 stress에 의해 생성되는 nitric oxide와 관련된 inducible nitric oxide synthase가 높은 연관성을 갖는다고 생각된다. TMT에 의한 신경세포의 사멸이 각 부위에 따라 신호전달경로의 정도가 다를 것으로 여겨지나, 구체적인 신호전달 경로의 차이를 규명하기 위해서 추가적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

감사의 글

이 연구는 한국연구재단의 일부 지원에 의해 이루어진 것임(Grant No. 2010-0007585).

참고문헌

1. **Ara C, Karabulut AB, Kirimlioglu H, Yilmaz M, Kirimliglu V, Yilmaz S.** Protective effect of aminoguanidine against oxidative stress in an experimental peritoneal adhesion model in rats. *Cell Biochem Funct* 2006, **24**, 443-448.
2. **Berdeaux A.** Nitric oxide: an ubiquitous messenger. *Fundam Clin Pharmacol* 1993, **7**, 401-411.
3. **Bredt DS, Snyder SH.** Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 1992, **8**, 3-11.
4. **Byun JS, Lee SH, Jeon SH, Kwon YS, Lee HJ, Kim SS, Kim YM, Kim MJ, Chun W.** Kainic acid-induced neuronal death is attenuated by aminoguanidine but aggravated by L-NAME in mouse hippocampus. *Korean J Physiol Pharmacol* 2009, **13**, 265-271.
5. **Dyer RS, Walsh TJ, Wonderlin WF, Bercegeay M.** The trimethyltin syndrome in rats. *Neurobehav Toxicol Teratol* 1982, **4**, 127-133.
6. **Garthwaite J, Boulton CL.** Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 1995, **57**, 683-706.
7. **Gross SS, Wolin MS.** Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 1995, **57**, 737-769.
8. **Gunasekar P, Li L, Prabhakaran K, Eybl V, Borowitz JL, Isom GE.** Mechanisms of the apoptotic and necrotic actions of trimethyltin in cerebellar granule cells. *Toxicol Sci* 2001, **64**, 83-89.
9. **Kalisch R, Schubert M, Jacob W, Kebler MS, Hemauer R, Vigger A, Landgraf R, Auer DP.** Anxiety and Hippocampus Volume in the rat. *Neuropsychopharmacology* 2006, **31**, 925-932.
10. **Morita M, Imai H, Liu Y, Xu X, Sadamatsu M, Nakagami R, Shirakawa T, Nakano K, Kita Y, Yoshida K, Tsunashima K, Kato N.** FK506-protective effects against trimethyltin neurotoxicity in rats: hippocampal expression analyses reveal the involvement of periarterial osteopontin. *Neuroscience* 2008, **153**, 1135-1145.
11. **Shuto M, Higuchi K, Sugiyama C, Yoneyama M, Kuramoto N, Nagashima R, Kawada K, Ogita K.** Endogenous and exogenous glucocorticoids prevent trimethyltin from causing neuronal degeneration of the mouse brain in vivo: involvement of oxidative stress pathways. *J Pharmacol Sci* 2009, **110**, 424-436.
12. **Sun M, Zhao Y, Gu Y, Xu C.** Neuroprotective actions of aminoguanidine involve reduced the activation of calpain and caspase-3 in a rat model of stroke. *Neurochem Int* 2010, **56**, 634-641.
13. **Thompson TA, Lewis JM, Dejneka NS, Severs WB, Polavarapu R, Billingsley ML.** Induction of apoptosis by organotin compounds in vitro: neuronal protection with antisense oligonucleotides directed against stannin. *J Pharmacol Exp Ther* 1996, **276**, 1201-1216.
14. **Tsutsumi S, Akaike M, Arimitsu H, Imai H, Kato N.** Circulating corticosterone alters the rate of neuropathological and behavioral changes induced by trimethyltin in rats. *Exp Neurol* 2002, **173**, 86-94.
15. **Wang Y, Marsden PA.** Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv Pharmacol* 1995, **34**, 71-90.
16. **Whittington DL, Woodruff ML, Baisden RH.** The time-course of trimethyltin-induced fiber and terminal degeneration in hippocampus. *Neurotoxicol Teratol* 1989, **11**, 21-33.