

The Effects of Thimerosal on Astrocytes Cell Number and Synaptic-Related Genes in the Prefrontal Cortex of Male Rats

Abdollah Amini¹, Zahra Namvarpour^{*2}

1. Department of Biology and Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2. Institute for Cognitive Science Studies (ICSS), Tehran, Iran.

Received: August 09, 2023; Accepted: September 18, 2023

Abstract

Background and Aim: Today, Thimerosal is used as a preservative in vaccines, pharmaceutical and health products. There is limited and conflicting information about the effects of this substance on the structure of cortical synapses. The aim of this study was to investigate the effects of Thimerosal on genes and molecules involved in the structure and function of synaptic connectivity, the number of astrocytes, and neurons in the prefrontal cortex of male rats.

Methods: In this experimental study, 18 male rats were randomly divided into three groups: 1) experimental group receiving a dose of 3000 µg/kg Thimerosal on days 7, 9, 11, and 15 after birth, 2) solvent group receiving phosphate-buffered saline according to the same pattern, and 3) control group receiving no injection. In the fourth week after birth, samples from the prefrontal cortex were collected for immunohistochemical, histological, and molecular studies. One-way analysis of variance (ANOVA) and LSD test were used to determine statistically significant differences between the groups, and the data were expressed as Mean ± SD.

Results: The results of this study revealed a significant decrease in the expression levels of Cadherin-8 (0.18 ± 0.079) and Synapsin-1 (0.36 ± 0.12) genes in the Thimerosal-exposed group compared to both control group (1 ± 0.01 for Cadherin-8 and 1 ± 0.009 for Synapsin-1) and solvent group (0.91 ± 0.097 for Cadherin-8 and 0.84 ± 0.10 for Synapsin-1) ($p < 0.001$). Furthermore, there was a significant decrease in the number of astrocytes in the Thimerosal-exposed group (10.66 ± 1.86) compared to the control group (6.43 ± 1.01) and the solvent group (6.93 ± 1.39), as well as a decrease in the number of neurons (194.66 ± 19.59) compared to the control group (267.99 ± 10.19) and the solvent group (252.33 ± 23.06) ($p < 0.01$).

Conclusion: It seems that Thimerosal causes abnormal changes in the expression levels of genes involved in the function and structure of synapses. Prolonged exposure to Thimerosal may lead to neurodevelopmental disorders.

Keywords: Prefrontal; Thimerosal; Synapses; Cadherin-8; Synapsin-1; Astrocyte; Rat

Please cite this article as: Amini A, Namvarpour Z. The Effects of Thimerosal on Astrocytes Cell Number and Synaptic-Related Genes in the Prefrontal Cortex of Male Rats. *Pejouhesh dar Pezeshki*. 2023;47(4):49-60.

*Corresponding Author: Zahra Namvarpour; Email: z.namvarpour@yahoo.com
Institute for Cognitive Science Studies (ICSS), Tehran, Iran.

بررسی اثر تیمروزال روی تعداد آستروسیت‌ها و بیان ژن‌های دخیل در ساختار و عملکرد سیناپس‌ها در قشر پره فرونتال موش‌های صحرایی نر

عبداله امینی^۱، زهرا نامورپور^{۲*}

۱- گروه بیولوژی و آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲- پژوهشکده علوم شناختی، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۱۸

چکیده

سابقه و هدف: امروزه تیمروزال (Thimerosal) به عنوان ماده نگهدارنده در واکسن‌ها و محصولات دارویی و بهداشتی استفاده می‌شود. با این حال درباره تأثیر این ماده روی ساختار سیناپس‌های قشر مغز، اطلاعات متناقض و کمی وجود دارد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر تیمروزال روی ژن‌ها و ملکول‌هایی است که در ساختار و عملکرد سیناپسی و تعداد سلول‌های آستروسیت و نورون‌ها در قشر پره فرونتال مغز موش‌های صحرایی نر مؤثرند.

روش کار: در این مطالعه تجربی ۱۸ موش صحرایی نر به طور تصادفی به سه گروه زیرتقسیم شدند: ۱- گروه تجربی که در روزهای ۱۵، ۱۱، ۹، ۷ بعد از تولد، یک دوز $3000 \mu\text{g/kg}$ تیمروزال دریافت کرد. ۲- گروه حلال نیز طبق الگوی مشابه، فسفات بافر سالین دریافت کرد. ۳- گروه کنترل تزریقی دریافت نکرد. در هفته چهارم پس از تولد، نمونه‌های قشر پره فرونتال جمع‌آوری شده و مورد مطالعه‌های ایمونوهیستوشیمی، استریولوژی و مولکولی قرار گرفتند و در نهایت برای تعیین وجود اختلاف معنادار میان گروه‌ها، از روش تحلیل واریانس یک‌راهه (One - Way ANOVA) و آزمون Test (LSD) استفاده و داده‌ها به صورت $\text{MEAN} \pm \text{SD}$ بیان شدند.

یافته‌ها: مطالعه‌های حاضر نشان داد که میزان بیان ژن‌های Cadherin-8 (0.118 ± 0.079) و Synapsin-1 (0.36 ± 0.12) به طور معناداری در گروه دریافت‌کننده تیمروزال نسبت به گروه کنترل (1 ± 0.1 برای Cadherin-8 و 1 ± 0.09 برای Synapsin-1) و حلال (0.91 ± 0.097) برای Cadherin-8 و 0.10 ± 0.10 برای Synapsin-1) کاهش پیدا کرد ($P < 0.001$). همچنین، کاهش معناداری در تعداد سلول‌های آستروسیت در گروه دریافت‌کننده تیمروزال ($66/86 \pm 10/1$) نسبت به گروه‌های کنترل ($1/01 \pm 6/43$) و حلال ($1/39 \pm 6/93$) و نیز تعداد نورون‌ها ($19/59 \pm 194/66$) نسبت به گروه‌های کنترل ($267/10 \pm 99/19$) و حلال ($252/33 \pm 23/06$) مشاهده شد ($P < 0.01$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که تیمروزال سبب تغییرهای غیر طبیعی در میزان بیان ژن‌های دخیل در عملکرد و ساختار سیناپس‌ها می‌شود. تداوم این شرایط ممکن است منجر به بیماری‌های تکامل عصبی شود.

واژگان کلیدی: قشر پره فرونتال؛ تیمروزال؛ سیناپس؛ Cadherin-8؛ Synapsin-1؛ آستروسیت؛ موش صحرایی

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Amini A, Namvarpour Z. The Effects of Thimerosal on Astrocytes Cell Number and Synaptic -Related Genes in the Prefrontal Cortex of Male Rats. Pejouhesh dar Pezeshki. 2023;47(4):49-60.

* نویسنده مسئول مکاتبات: زهرا نامورپور؛ آدرس پست الکترونیکی: z.namvarpour@yahoo.com

پژوهشکده علوم شناختی، تهران، ایران.

مقدمه

بیماری‌های تکاملی عصبی، مانند اختلال طیف اتیسم (ASD)، اختلال کم‌توجهی و بیش‌فعالی (ADHD) و ناتوانی ذهنی (ID)، در سال‌های اخیر توجه و تحقیق‌های قابل‌توجهی را به خود جلب کرده‌اند. این بیماری‌ها بر تمامی جوانب شناختی، اجتماعی و عاطفی زندگی افراد تأثیرگذارند و بنابراین درک علل و عوامل ممکن در بروز این اختلال‌ها الزام اجتماعی دارد. در بین تئوری‌های مختلفی که در ارتباط با علل بیماری‌های تکاملی عصبی مطرح می‌شوند، ارتباط بین عوامل آسیب‌زای محیطی به عنوان فاکتورهای فراژن‌شناسی یا اپی‌ژنتیک در بروز این اختلال‌ها، نظر پژوهشگران متعددی را به خود معطوف ساخته است. جیوه و مشتقات آن (مانند تیمروزال) به عنوان یکی از این فاکتورها مطرح هستند (۳-۱).

تیمروزال، به عنوان یکی از ترکیب‌های دارای جیوه ارگانیک، با برداشتن حدوداً ۴۹ درصد جیوه در واحد وزن، سال‌هاست که به عنوان ماده نگه‌دارنده در بسیاری از داروها و واکسن‌های نوزادان استفاده می‌شود (۴، ۵). در حقیقت، تیمروزال نام تجاری اتیل مرکوری (سدیم اتیل مرکوری تیوسالسیلات) است و با فرمول مولکولی $C_9H_9-HgNaO_2S$ نمایش داده می‌شود و سریعاً در محلول نمکی تبدیل به هیدروکسید اتیل جیوه و کلرید اتیل جیوه می‌شود که به سرعت در مغز و سایر اندام‌های حیاتی رسوب می‌کند (۶). مطالعه‌های گسترده محققان نشان داده است که تمامی انواع جیوه به شدت سمی هستند و اثر مخرب بسیاری بر ساختار مغز به جای می‌گذارند (۷-۵). گلووتامین و سایر آنتی‌اکسیدان‌ها را از بین می‌برند، دفاع آنتی‌اکسیدانی را نابود می‌کنند، آنزیم‌ها و عملکرد گیرنده‌ها را متأثر می‌سازند، میتوکندری را دچار سمیت می‌کنند، تغییرهای گسترده‌ای در ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها ایجاد می‌کنند که گاهی سبب تبدیل آنها به آنتی‌ژن درونی در جهت آسیب به سیستم ایمنی می‌شود (۸، ۹). میزان قابل‌توجهی از جیوه در خون نوزادانی که واکسن‌های دارای تیمروزال دریافت کرده‌اند، یافت شده است. مطالعه‌های انجام شده بر نوزادان میمون نشان می‌دهد که جیوه موجود در واکسن‌های تزریقی جمع‌یافته در مغز به مراتب

بیشتر از جیوه موجود در خون است و ممکن است برای ماه‌ها و حتی سال‌ها باقی بماند (۱۰). میزان جیوه تجمع یافته در مغز نوزادان در حدی بالاست که اثر سمیت عصبی ایجاد می‌کند و ممکن است سبب نابودی سلول‌های عصبی و کاهش سیناپس‌ها شود. این مواجهه زود هنگام با فرآورده‌های جیوه، خصوصاً تیمروزال، به عنوان یکی از فاکتورهای مشکوک در پاتوژنز انواع اختلال‌های تکامل عصبی شناخته می‌شود (۱۱، ۱۲).

نتایج حاصل از سلسله مطالعه‌ها در این حوزه که اثر ارائه بدو تولد تیمروزال بر پاتولوژی مغز را بررسی کرده بودند، نشان‌دهنده تغییرهای پاتولوژیک متعددی در مغز موش‌ها بود (۱۳، ۱۴). بخشی از این تغییرها عبارتند از: دژنراسیون ایسکیمیک نورون‌ها و وجود نورون‌های تاریک در کورتکس پری فرنرال و تمپورال، هیپو کامپ و مخچه، تغییرهای پاتولوژیک در عروق خونی کورتکس تمپورال، ناپدید شدن واکنش شاخص‌های وزیکولی سیناپسی در هیپوکامپ، آتروفی آستروگلیاها در هیپوکامپ و مخچه، واکنش مثبت caspas-3 در astroglia (۱۴-۱۷). در واقع این پژوهش‌ها سمیت عصبی تیمروزال در دوزی برابر یا بالاتر از دوز ارائه شده در واکسن‌های کودکان، در مغز در حال رشد موش را گزارش کردند که احتمال مشارکت این ماده در اختلال‌های تکامل عصبی را بیشتر می‌کند.

با توجه به اینکه مطالع‌های محدودی در ارتباط با اثر سمی جیوه خصوصاً تیمروزال در مولکول‌های دخیل در تشکیل، عملکرد و ساختار سیناپس‌های مغزی در ناحیه پره فرنرال وجود دارد (۱)، بنابراین در این تحقیق بر آن شدیم که فرضیه تأثیر سمیت عصبی ناشی از تیمروزال را بر بیان ژن‌های مرتبط بر ساختار سیناپسی (Synapsin1، Cadherin-8) و نیز تعداد نورون‌ها و سلول‌های آستروسیت ناحیه پره فرنرال مغز، بررسی کنیم.

برای اجرای این پژوهش، ابتدا لازم بود تغییرهای رفتاری مشابه اختلال‌های تکامل عصبی در انسان به دنبال مصرف تیمروزال تأیید شود، بنابراین بعد از بررسی و تأیید وجود این اختلال‌های رفتاری در سال‌های ۱۳۹۹-۱۳۹۶ در مرکز تحقیق‌های پژوهشکده علوم شناختی تهران و گروه بیولوژی و علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و نیز چاپ داده‌های به دست

آمده از این پژوهش‌ها در مجله‌های معتبر (۱۱، ۱۲، ۱۸)، مطالعه پیش‌رو که شامل بررسی‌های بافت‌شناسی و ملکولی در این حوزه است، در سال‌های ۱۴۰۱-۱۴۰۰ در گروه بیولوژی و علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام و نتایج گزارش شد.

روش کار

این مطالعه تجربی، روی ۱۸ سر موش صحرایی جوان نر انجام شد که در روزهای ابتدایی پس از تولد تحت درمان با تیمروزال به صورت تزریقی قرار گرفتند. موش‌های مادر باردار از انیستیتو پاستور تهیه و از یک نژاد (ویستار) انتخاب شدند و تحت شرایط استاندارد در دمای 22 ± 3 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. چرخه روشنایی و تاریکی به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی برقرار بود. در این مطالعه موش‌ها به صورت تصادفی به سه گروه شش تایی تقسیم شدند. موش‌های هر گروه در قفس‌های مخصوص و مشابه به ابعاد $40 \times 20 \times 20$ سانتی‌متر قرار گرفتند. پس از اتمام آزمایش‌های، موش‌ها به روش استاندارد OUT شدند. این پژوهش در چارچوب شیوه‌نامه کار با حیوانات آزمایشگاهی که از سوی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی ایران چاپ و ارائه شده است انجام شد (کد اخلاق IR.SBMU.MSP.REC.1398.403 (۱۹)).

گروه‌بندی

در این تحقیق ۱۸ موش صحرایی به صورت تصادفی در سه گروه شش‌تایی به صورت زیر تقسیم‌بندی شدند.

۱- گروه تجربی در معرض تیمروزال (THIM):

در این گروه، داروی تیمروزال (Sigma, Germany) در دوز $3000 \mu\text{g}/\text{Hg}/\text{kg}$ (با توجه به وزن) و در روزهای ۱۵، ۱۱، ۹، ۷ پس از تولد (مشابه جدول زمانی واکسیناسیون در کودکان) به صورت داخل عضلانی در عضله Glutei Maximi موش‌ها تزریق شد (۱۱).

۲- گروه حلال: به موش‌های گروه‌های حلال نیز فسفات بافر سالین (phosphate - buffered saline) (حلال تیمروزال) طبق جدول زمانبندی مشابه تزریق شد.

۳- گروه کنترل: گروه موش‌های صحرایی نر که تزریقی دریافت نداشته‌اند.

در این تحقیق، با در نظر گرفتن اینکه حجم تجمعی جیوه تزریق شده در ماه‌های اول تا شش ماه پس از تولد در نوزادان $187/5 \mu\text{g}$ است و موش‌های صحرایی نسبت به سموم در مقایسه با انسان‌ها تأثیرپذیری کمتری نشان می‌دهند، بنابراین دوز برای تیمروزال برای بررسی اثر سمیت عصبی این ماده انتخاب شد (۱۱، ۱۹).

پس از بلوغ جسمی موش‌ها، در هفته چهارم پس از تولد، حیوانات در گروه‌های مورد مطالعه توسط کلروفورم بیهوش شدند. سپس وزن موش‌ها در قبل از کالبد شکافی و انجام تست اندازه‌گیری و ثبت شد. (وزن موش‌ها با ترازوی دیجیتالی با دقت ± 0.01 گرم اندازه‌گیری شد). پس از کشتن موش‌ها سر آنها با استفاده از گیوتین جدا و ناحیه پره فرنال به محلول فیکساتیو فرمالین ۱۰ درصد (برای بررسی بافتی و یا به یخچال منهای ۸۰ درجه برای بررسی ملکولی منتقل شد (۱۱، ۲۱-۱۹)).

مطالعه‌های بافت‌شناسی

در مطالعه‌های مربوط به استریولوژی، از همه گروه‌ها (شش سر از هر گروه) نمونه بافتی تهیه شد. این نمونه‌ها بلافاصله بعد از انجام پرفیوژن در محلول فیکساتیو پارافمالدئید ۴ درصد بافر شده، قرار گرفتند تا فیکس شوند. سپس با یک برش، منطقه پره فرنال را جدا کرده و آن را به دو نیم کرده و یکی از نیمکره‌ها برای بررسی بافتی و نیمکره دیگر برای بررسی ملکولی بلافاصله به منهای ۸۰ منتقل شد. برای انجام تست‌های بافت‌شناسی، نمونه‌های حاصله توسط غلظت‌های افزایشی اتانول آبگیری شده و قالب‌های پارافینی تهیه شدند.

پس از تهیه بلوک‌های پارافینی، نمونه‌های قشر پری فرنال موش‌ها، برش‌گیری کورونال با استفاده از دستگاه میکروتوم روتاری در ضخامت پنج میکرون به شرح زیر صورت پذیرفت: روی هر لام سه سکشن قرار گرفت. سه برش اول روی لام‌های آلبومن گذاشته شد و برش چهارم روی لام ژلاتینه قرار گرفت و این عمل سکشن‌گیری تا اتمام بافت ادامه یافت. نهایتاً از هر بلوک ۱۰ لام و روی هر لام ۳ سکشن قرار گرفت. برای رنگ‌آمیزی

برای آماده‌سازی لام‌ها در روش ایمونوهیستوشیمی، از هر بلوک ۱۰ لام و روی هر لام چهار سکشن قرار گرفت (۱۲، ۱۹، ۲۳).

استخراج RNA و سنتز cDNA (۲۴)

استخراج توتال RNA با استفاده از (Qiagen, Germany) RNeasy Mini Kit طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد. مقدار و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین و نسبت جذب نوری (Optical Density: OD) RNA در طول موج‌ای ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد. از نمونه‌هایی که نسبت OD ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر آنها بین ۱/۸ تا ۲/۲ بود برای سنتز cDNA استفاده شد. در این مطالعه مقدار ۱ میکروگرم از RNA را با استفاده از پرایمر Random Hexamer (Fermentas RevertAid™ First Strand cDNA synthesis Kit طبق پروتکل شرکت سازنده به cDNA تک رشته‌ای تبدیل کردیم (۱۸). در اینجا دو مرحله انکوباسیون وجود داشت: در ابتدا مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و انکوباسیون دوم ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در نهایت، واکنش با ۱۰ دقیقه حرارت در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به پایان رسید. cDNA سنتز شده در ۷۰- درجه سانتی‌گراد برای مصارف بعدی نگهداری شد (۲۵، ۱۹، ۱۲).

پرایمرها

در این تحقیق ژن‌های Cadherin-8, Synapsin-1 و ژن GAPDH (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase) به ترتیب به عنوان ژن‌های هدف و مرجع بررسی شدند (۲۵، ۲۱).

سپس توسط نرم‌افزار GENERUNNER و پایگاه اطلاعاتی NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) طراحی پرایمرها انجام شد (۲۶، ۲۵).

واکنش Real-time-PCR

تمام واکنش‌های Real-time-PCR در دستگاه (Corbett Research; Qiagen; Germany) انجام شد. برنامه زمانی-گرمایی دستگاه در سه مرحله تنظیم شد.

هماتوکسیلین اتوزین از لام‌های آلومینه استفاده شد و لام‌های ژلاتینه برای رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی استفاده شد (۱۹، ۲۲).

روش انجام استریولوژی

از روش ارزیابی استریولوژی برای مطالعه اسلایدهای بافت‌شناسی استفاده شد (۱۹، ۲۲، ۲۳). برای محاسبه تعداد نورون‌ها از روش Optical dissector استفاده کردیم. هم‌چنین از دستگاه میکروکیتور (Heidenhain Main ND221B, Germany) و فریم مخصوص شمارش استفاده شد. برای محاسبه تعداد نورون‌ها، برش‌هایی به روش (SURS) Systematic uniform random sampling) انتخاب کردیم، به این ترتیب که به طور تصادفی ۱۰ برش انتخاب شد. سپس تمام میدان دید هر برش با استفاده از میکروسکوپ (Nikon E200, Japan) و با ۴۰obj بررسی شد. بر اساس روش شمارش روی فریم مخصوص شمارش، نورون‌هایی انتخاب می‌شوند که هسته آنها در داخل فریم شمارش و یا روی خطوط قابل پذیرش باشند، مواردی که با خطوط ممنوعه تماس دارند، مورد قبول نیستند و بنابراین شمارش نمی‌شوند. سپس دانسیته نورون‌ها طبق رابطه زیر محاسبه شد (۱۹، ۲۲، ۲۳):

Cell number estimate:

$$Nv = \Sigma Q / (\Sigma p \times a/f \times h)$$

ΣQ = cell counts; h = distance between slices; a/f = total area of the counted frames; and Σp = total number of counting frames.

رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی

برای نشان دادن تعداد سلول‌های آستروسیت از ایمونوهیستوشیمی علیه مارکرهای GFAP استفاده شد (۱۲، ۱۹، ۲۳). ابتدا مغزموش‌ها از جمجمه خارج شده و به محلول فیکساتیو برای فیکس منتقل می‌شود. سپس فرایند پروسس بافتی و قالب‌گیری و برش‌گیری انجام شده و پس از دیپارافینه کردن و فرایند بازیابی آنتی‌ژن، نمونه‌ها در آنتی‌بادی اولیه anti-GFAP به میزان ۱:۵۰۰، به مدت یک شب انکوبه شده و پس از شست‌وشو، نمونه‌ها در آنتی‌بادی ثانویه انکوبه می‌شود و پس از رنگ‌آمیزی هسته‌ها، نمونه‌ها با میکروسکوپ بررسی می‌شوند.

هر ژن و عدم حضور محصولات غیر اختصاصی و جفت شدن پرایمرها انجام شد.

نهایتاً پس از انجام واکنش، CT value مربوط به ژن‌ها ثبت شد تا آنالیز شود و با استفاده از روش $\Delta\Delta CT$ به بررسی تفاوت میزان بیان نسبی ژن در سه گروه درمان و خلال و کنترل پرداخته شد. لازم به ذکر است واکنش Real-Time PCR در مورد هر ژن سه بار انجام و از میانگین نتایج استفاده شد (۲۶، ۲۴).

$$\Delta CT (\text{test or control}) = CT (\text{target}) - CT (\text{refrence})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{test}) - \Delta CT (\text{control})$$

$$\text{Fold change} = (1 + \text{efficiency})^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

روش تجزیه و تحلیل آماری

برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS21 استفاده شد. برای تعیین وجود اختلاف معنادار میان گروه‌های آزمایشی از روش تحلیل واریانس یک راهه (One-Way ANOVA) و برای مقایسه تفاوت بین دو گروه از آزمون (LSD) Test استفاده شد و داده‌ها به صورت $MEAN \pm SD$ بیان شدند. در تمام مقایسه‌ها سطح $P < 0.001$ ، $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ به عنوان معیار اختلاف معنادار مد نظر قرار گرفت.

یافته‌ها

تأثیر تیمروزال بر تعداد سلول‌های آستروسیت (شکل و نمودار ۱)

نتایج حاصله از این تحقیق نشان داد که بیشترین پاسخ و یا به عبارتی افزایش تعداد سلول‌های آستروسیت در گروه‌های دریافت‌کننده تیمروزال مشاهده شد. تعداد آستروسیت‌ها در گروه کنترل با میانگین $1/10 \pm 6/43$ با تعداد آن در گروه خلال (vehicle) با میانگین $1/39 \pm 6/93$ تفاوت آماری معناداری نداشت. در حالی که تفاوت تعداد آستروسیت‌ها در گروه تیمروزال با میانگین $1/86 \pm 10/66$ با سایر گروه‌ها (کنترل و خلال) از نظر آماری معنادار بود ($P < 0/01$).

مرحله اول که منجر به واسرشتگی (Denaturation) مولکول‌های Cdna می‌شود، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، مرحله دوم ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه برای واسرشتگی، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه برای جفت شدن (Annealing) و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ثانیه برای کشیدگی (Extension) در ۴۰ سیکل متوالی انجام شد و در مرحله نهایی برای ترسیم منحنی ذوب، (Melting Curve) در هر تکرار از ۵۰ تا ۹۹ درجه سانتی‌گراد، هر پنج ثانیه یک درجه افزایش یافت. این واکنش‌ها در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر به صورت تکرار دوتایی در میکروتیوب‌های ۰/۱ میلی لیتری انجام شد.

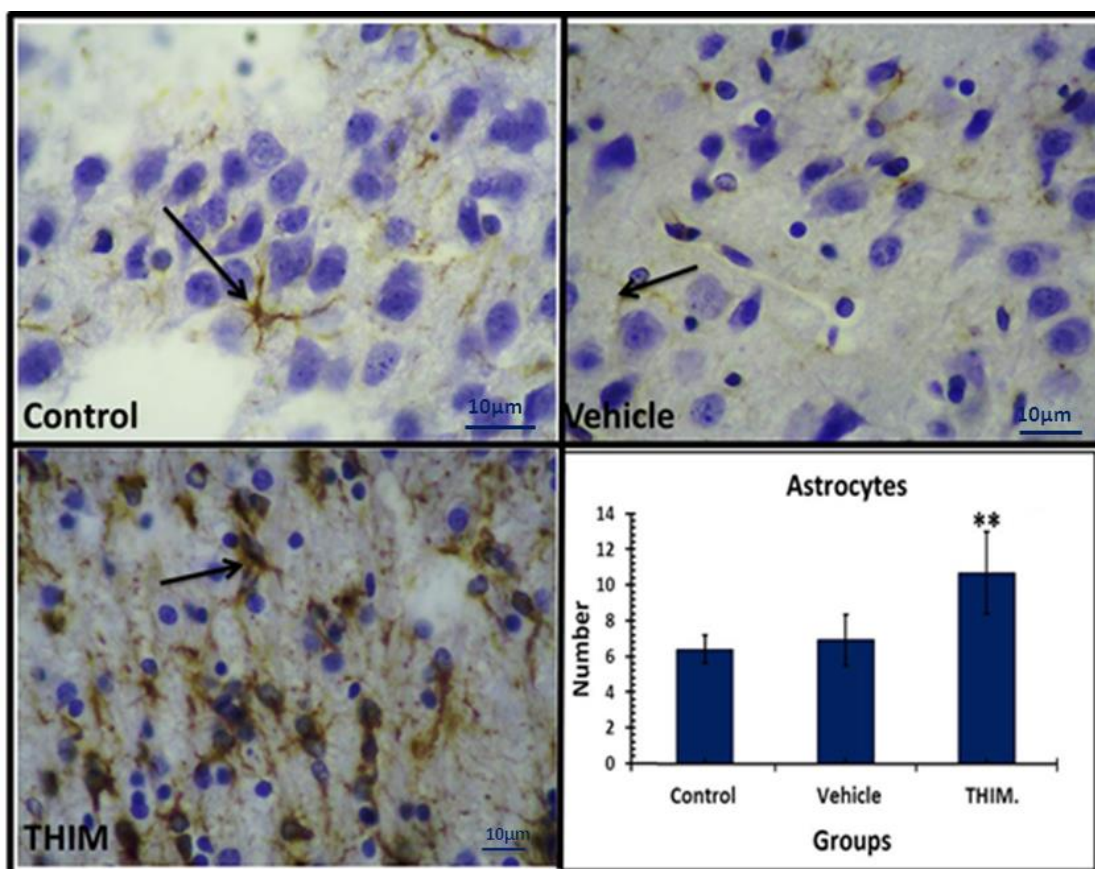
ترکیب‌های هر واکنش شامل ۵ میکرولیتر از 2X QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومولار، ۲ میکرولیتر آب فاقد RNase ۲ میکرولیتر cDNA الگو بود (۲۶-۲۴).

رسم منحنی استاندارد (۲۴)

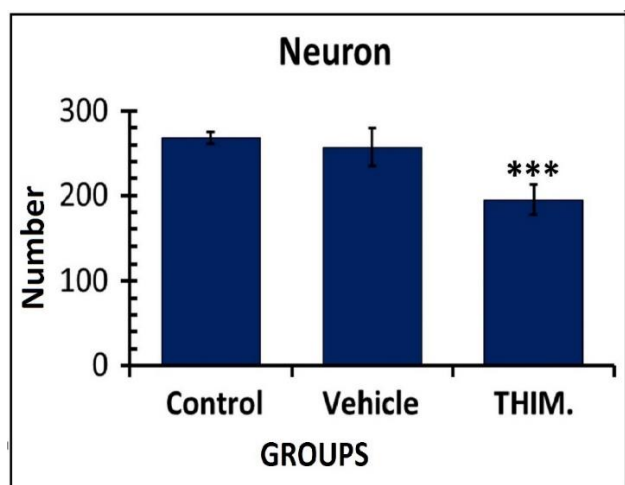
یکی از cDNA های کنترل دارای غلظت مناسب، انتخاب شد و سپس رقت‌های متوالی از آن را برای رسم منحنی استاندارد استفاده کردیم. منحنی استاندارد بر اساس لگاریتم غلظت cDNA (محور افقی) و سیکل آستانه (CT) (محور عمودی) برای هر ژن ترسیم شد. میزان بازده PCR بر اساس منحنی استاندارد برای هر ژن تعیین شد. از نمونه فاقد cDNA الگو به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای هر واکنش یک منحنی تکثیر (Amplification Curve) رسم شد. تجزیه و تحلیل بر اساس مقایسه سیکل‌های آستانه (Ct values) نمونه‌های دریافت‌کننده تیمورسال و نمونه‌های کنترل و خلال انجام شد.

الکتروفورز با ژل آگارز (Agarose Gel Electrophoresis) (۲۶، ۲۷)

ژل آگارز ۱/۵ درصد مخلوط با رنگ اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) را آماده کرده و سپس محصولات تکثیر شده ژن هدف و مرجع طی Real-Time PCR روی ژل آگارز الکتروفورز شد. این مرحله برای تأیید تکثیر قطعه‌های اختصاصی



شکل و نمودار ۱- شکل بالا نشان می‌دهد که تزریق تیمروزال سبب افزایش معنادار در تعداد سلول‌های آستروسیت در مقایسه با گروه کنترل و حلال می‌شود ($P < 0.01$)، این در حالی است که این کاهش در گروه کنترل نسبت به گروه حلال معنادار نبود ($P > 0.05$).

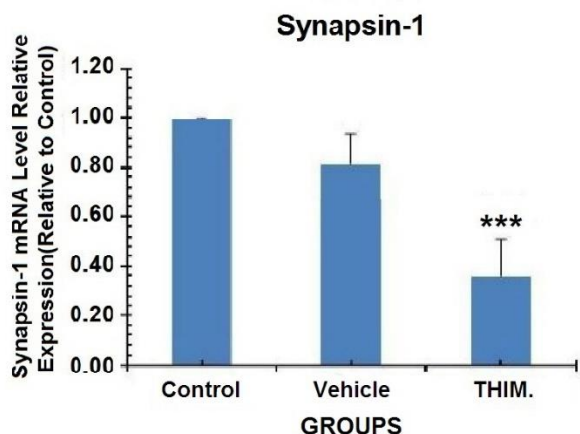


نمودار ۲- تعداد سلول‌های عصبی در قشر پره فرونتال در گروه‌های مورد آزمایش.

همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود موش‌های دریافت‌کننده تیمروزال سبب افزایش مرگ سلولی در نورون‌ها نسبت به گروه

تأثیر تیمروزال بر تعداد نورون در قشر پره فرونتال (نمودار ۲)

نتایج حاصله از این تحقیق نشان داد که بیشترین پاسخ و یا به عبارتی کاهش تعداد سلول‌های عصبی در گروه‌های دریافت‌کننده تیمروزال مشاهده شد. تعداد سلول‌های عصبی در گروه کنترل با میانگین $(267/99 \pm 10/19)$ با تعداد آن در گروه حلال با میانگین $(252/33 \pm 23/06)$ تفاوت آماری معناداری نداشت. در حالی که تفاوت تعداد سلول‌های عصبی در گروه تیمروزال با میانگین $(194/66 \pm 19/59)$ با سایر گروه‌ها از نظر آماری معنادار بود ($P < 0.001$).



نمودار ۴- بیان نسبی Synapsin-1 در قشر پره فرونتال مغز موش‌های نر.

بیان نسبی Synapsin-1 mRNA در قشر پره فرونتال مغز در چهار هفته بعد از تولد مطابق نمودار نشان می‌دهد که بیان نسبی Synapsin-1 بعد از تزریق آخر تیمروزال در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم به طور قابل توجهی کاهش یافته است ($P < 0.001^{***}$).

بحث

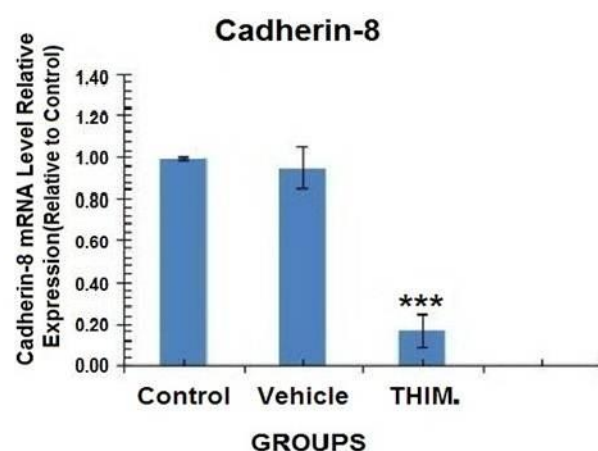
پژوهش حاضر نشان می‌دهد که با دریافت $3000 \text{ g/kg}\mu$ تیمروزال در چهار نوبت در الگوی زمانبندی مشابه برنامه واکسیناسیون کودکان (۱، ۱۲، ۱۹)، میزان بیان ژن‌های Synapsin-1، Cadherin-8 به طور معناداری کاهش پیدا میکند. همچنین در این پژوهش، ناحیه قشر پره فرونتال به عنوان یکی از نواحی هدف تیمروزال، برای ایجاد تخریب در ساختار و عملکرد سیناپسی شناخته شده است. این نتایج در تأیید نتایج به دست آمده از پژوهش‌های دیگران است که نشان می‌دهند دژنراسیون سلول‌های عصبی به دنبال القا با دوزهای متفاوت تیمروزال ایجاد می‌شود (۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۹).

در پژوهشی که توسط Olzack و همکاران انجام شد، اثر ارائه بدو تولد تیمروزال (چهار تزریق ۱۲ یا $240 \mu\text{g Hg/Kg}$ در روزهای ۹، ۷، ۱۱ و ۱۵ پس از تولد) بر پاتولوژی مغز بررسی شد و تغییرهای پاتولوژیک متعددی در تأیید پژوهش حاضر در مغز موش‌ها مشاهده شد (۱۳، ۱۴). از جمله این تغییرها عبارتند از:

کنترل و حلال می‌شود. تفاوت میانگین تعداد نورون‌ها در گروه کنترل با گروه حلال (Vehicle) از نظر آماری معنادار نبود.

اثر تیمروزال روی بیان ژن Cadherin-8 در قشر پره فرونتال موش‌های نر در دوره نوزادی

آنالیز نمونه‌های جدا شده از قشر پره فرونتال نشان داد که سطوح بیان نسبی mRNA، Cadherin-8 بین گروه دریافت‌کننده تیمروزال (0.079 ± 0.11) در مقایسه با گروه‌های حلال (0.91 ± 0.097) و کنترل (1 ± 0.01) به طور قابل توجهی معنادار بود ($P < 0.001$)، نمودار ۳.



نمودار ۳- بیان نسبی Cadherin-8 در قشر پره فرونتال مغز موش‌های نر.

نتایج حاصل نشان داد که میزان بیان Cadherin-8 در قشر پره فرونتال مغز در چهار هفته بعد از تولد در گروه دریافت‌کننده تیمروزال در مقایسه با گروه‌های کنترل و حلال به طور قابل توجهی کاهش یافته است ($P < 0.001^{***}$) در مقایسه با گروه کنترل و حلال).

اثر تیمروزال روی بیان ژن Synapsin-1 در قشر پره فرونتال موش‌های نر در دوره نوزادی

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بیان نسبی Synapsin-1 در هفته چهارم بعد از تولد، در گروه دریافت‌کننده تیمورسال (0.36 ± 0.12)، در مقایسه با گروه‌های کنترل (1 ± 0.009) و حلال (1.00 ± 0.084) به طور قابل توجهی کاهش یافته است ($P < 0.001$)، (نمودار ۴).

کاملاً مشخص نیست (۱)، اما مطالعه‌های فارماکوکینتیک نشان داده‌اند که جیوه ناشی از تزریق i.m تیمروزال، می‌تواند بعد از عبور از سد خونی- مغزی، به سرعت در مغز موش‌ها تجمع پیدا کرده و در عرض چند روز پس از تزریق به حداکثر میزان خود برسد و برای چندین هفته و احتمالاً ماه‌ها در مغز باقی بماند (۱، ۲۱). این افزایش غیر طبیعی در ادامه سبب ایجاد آسیب در سیستم‌های اکسیداتیو از طریق تاثیر بر ساختار میتوکندری و مسیر ملکولی The c-Jun N-terminal kinase (JNK) و Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) می‌شود (۳۰). این تغییرها در بیان این ژن‌ها و مسیرهای ملکولی سبب تأثیر بر بسیاری از رویدادهای سلولی، از جمله کنترل رشد، تبدیل و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوز) مرتبط با این ژن‌ها می‌شود. گزارش شده است که تغییرهای سمیت عصبی/پاتولوژیک/اختلال‌های رفتاری احتمالاً چند روز پس از تزریق جیوه، زمانی که غلظت مغز آن بالاتر است، آغاز می‌شود، اما همان‌طور که توسط نتایج آزمایش‌های نوروپاتولوژی و رفتاری قبلی ما تأیید شده است، این آسیب‌ها ممکن است به مدت چند ماه ادامه یابد یا دائمی شود (۱، ۱۱، ۲۱). با توجه به این یافته‌ها، افزایش مداوم جیوه در مغز ممکن است سبب ایجاد مشکلاتی در مهاجرت سلولی، تمایز آنها و جداسازی سلول‌های عصبی و نیز القای دژنراسیون در سلول‌های عصبی و مسیرهای ملکولی و در نهایت مرگ سلول شود (۱).

تیمروزال برای نوروهای کورتیکال و رشد نوروها در محیط کاملاً سمی است (۳۲-۳۰) این ماده در غلظت بین ۵ تا ۱۰۰ نانومتر سبب ۵۰ درصد مرگ سلولی پس از ۴۸ ساعت می‌شود که این به میزان فاکتورهای رشد عصبی وابسته است. مکانیسم اثر این ماده در مرگ سلولی، ممکن است به دلیل فعال‌سازی پروسه آپپتوز و ژن‌های دخیل در این مسیر باشد (۳۰، ۳۳، ۳۴). در عین حال، جیوه موجود در تیمروزال می‌تواند از طریق اثر تجمیعی خود با افزایش استرس اکسیداتیو (افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن) تخریب عصبی خود را ایجاد کند (۳۴).

دژنراسیون ایسکیمیک نوروهای مخچه و آتروفی آستروگلیاها در هیپوکامپ و مخچه، واکنش مثبت caspase-3 در astroglia را می‌توان نام برد. در واقع این پژوهش سمیت عصبی تیمروزال در دوزی برابر یا بالاتر از دوز ارائه شده در واکنش‌های کودکان، در مغز در حال رشد موش را گزارش کرد که احتمال مشارکت این ماده در اختلال‌های تکامل عصبی را بیشتر می‌کند (۱۶). این گروه تحقیقاتی در مطالعه‌ای مشابه، اثر مخرب تیمروزال روی سطوح خارج سلولی اسیدهای آمینه نورواکتیو در قشر پره فرنثال موش صحرایی را بررسی و افزایش سطح گلوتامات و آسپاراتات در این ناحیه را گزارش کردند (۲۸).

در مطالعه دیگری در محیط آزمایشگاهی، اثر (methyl-mercury)، نوع دیگری از جیوه ارگانیک بر سیستم عصبی بررسی شد. سلول‌های عصبی از جنین ۱۴ روزه موش‌های صحرایی و سلول‌های گانگلیونی ciliary از جنین‌های هشت روزه جوجه استخراج و بعد از ۳۶ ساعت، غلظت‌های متفاوتی از methyl-mercury برای بررسی تغییرهای مورفولوژیک سلول‌های عصبی به محیط‌های کشت اضافه شد. دژنراسیون سلولی و مرگ در سیستم عصبی مرکزی (CNS) و در غلظت‌های بالاتر، دژنراسیون فیبرهای اکسونی و عصبی، از دست دادن سیناپس‌ها و مهار رشد سلولی در CNS مشاهده شد؛ ساختار بندی جدید و تخریب در سیستم عصبی محیطی (PNS) نیز از یافته‌های این پژوهش بود (۲۹). نتایج مطالعه حاضر و سلسله مطالعه‌های مشابه پیرامون انواع گوناگون جیوه موید دژنراسیون نوروها و متعاقب آن آسیب به ساختار و عملکرد سیناپسی در مواجهه با این فلز سنگین است.

به طور خلاصه می‌توان چنین نتیجه گرفت که مسمومیت با جیوه می‌تواند منجر به تغییر هومئوستاز گلوتاماترژیک و نیز فعال‌سازی سیستم ایمنی مغزی (که با افزایش در تعداد آستروسیت‌ها خود را نشان می‌دهد) در مناطق مختلف مغز شود که در مغز افراد مبتلا به ASD نیز دیده می‌شود (۱۸). سازوکاری که توسط آن تیمروزال سبب کاهش بیان ژن‌های دخیل در ایجاد ساختار و عملکرد سیناپسی (Cadherin-8, Synapsin-1) و کاهش بیان BDNF شده است،

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل اجرای طرح تحقیقاتی مصوب در معاونت پژوهشی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با کد ثبت ۸۰۷۰ است. به این وسیله نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از مسئولان و کارکنان محترم معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی کمال تشکر و قدردانی را به عمل آورند.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافی را گزارش نکرده‌اند.

در مطالعه حاضر، شواهد تجربی ارائه می‌شود که بیان می‌دارد قرار گرفتن در معرض تیمروزال در شرایطی مشابه برنامه واکسیناسیون دوران کودکی، منجر به بیان غیر طبیعی ژن‌های درگیر در ایجاد ساختار و عملکرد سیناپسی و کاهش تعداد نورون‌ها و آستروسیت‌ها در ناحیه پره فرنرال مغز موش‌های صحرایی نمی‌شود که در بیماری‌های تکامل عصبی نظیر اوتیسم نیز قابل مشاهده است. علاوه بر این، برای اولین بار مشاهده شد که پلاستیسیته سیناپسی در ناحیه پره فرنرال مغز موش‌های در معرض تیمروزال دچار تغییر و آسیب می‌شود. این یافته‌ها فرضیه‌ای را حمایت می‌کنند که تیمروزال ممکن است یکی از عوامل مؤثر در پاتوژنز اختلال‌های تکامل عصبی باشد. عدم بررسی مکانیسم‌های بیولوژیکی در بردارنده سمیت ناشی از تیمروزال، در جمعیتی که به لحاظ ژنتیکی در برابر اثر جیوه حساسیت بالاتری دارند جزو محدودیت‌های پژوهش حاضر است و پیشنهاد می‌شود بررسی این مکانیسم‌ها که ممکن است منجر به بروز علائمی مشابه اختلال‌های تکامل عصبی شود، در مطالعه‌های بالینی بررسی شود. در نهایت، با توجه به توانایی تیمروزال برای ایجاد سمیت عصبی در مغز در حال رشد، باید حداکثر تلاش را برای از بین بردن این عنصر غیر ضروری از بسیاری از واکسن‌ها و دیگر محصولات پزشکی انجام داد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر در کنار مطالعه‌های پیشین نشان می‌دهد که قرار گرفتن مکرر در معرض جیوه و انواع مشتقات آن، در دوره نوزادی می‌تواند سبب تغییرهای غیر طبیعی در سیناپس‌ها و ساختار و عملکرد آنها و احتمال بروز برخی علائم اختلال‌های تکامل عصبی شود.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بررسی و با کد اخلاق IR.SBMU.MSP.REC.1398.639 ثبت شده است.

References

1. Azevedo LF, Karpova N, Rocha BA, Barbosa Junior F, Gobe GC, Hornos Carneiro MF. Evidence on neurotoxicity after intrauterine and childhood exposure to organomercurials. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2023;20(2):1070.
2. Morris G, Puri B, Frye R, Maes M. The putative role of environmental mercury in the pathogenesis and pathophysiology of autism spectrum disorders and subtypes. *Molecular neurobiology*. 2018;55:4834-56.
3. Ijomone OM, Olung NF, Akingbade GT, Okoh CO, Aschner M. Environmental influence on neurodevelopmental disorders: Potential association of heavy metal exposure and autism. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2020;62:126638.
4. Geier DA, King PG, Hooker BS, Dórea JG, Kern JK, Sykes LK, et al. Thimerosal: clinical, epidemiologic and biochemical studies. *Clinica Chimica Acta*. 2015;444:212-20.
5. Ijaz MU, Batool M, Ashraf A, Siddique MH, Zafar S, Muzammil S, et al. A study on the potential reprotoxic effects of thimerosal in male albino rats . *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020;27(10):2798-802.
6. Barregard L, Rekić D, Horvat M, Elmberg L, Lundh T, Zachrisson O. Toxicokinetics of mercury after long-term repeated exposure to thimerosal-containing vaccine. *Toxicological Sciences*. 2011;120(2):499-506.
7. Dorea JG, Marques RC, Isejima C. Neurodevelopment of Amazonian infants: antenatal and postnatal exposure to methyl-and ethylmercury. *BioMed Research International*. 2012;2012.
8. Sulkowski Z, Chen T, Midha S, Zavacki A, Sajdel-Sulkowska EM. Maternal thimerosal exposure results in aberrant cerebellar oxidative stress, thyroid hormone metabolism, and motor behavior in rat pups; sex-and strain-dependent effects. *The Cerebellum*. 2012;11(2):575-86.
9. de Magalhães Silva M, de Araújo Dantas MD ,da Silva Filho RC, dos Santos Sales MV, de Almeida Xavier J, Leite ACR, et al. Toxicity of thimerosal in biological systems: Conformational changes in human hemoglobin, decrease of oxygen binding capacity, increase of protein glycation and amyloid's formation. *International journal of biological macromolecules*. 2020;154:661-71.
10. Hewitson L, Lopresti BJ, Stott C, Mason NS, Tomko J. Influence of pediatric vaccines on amygdala growth and opioid ligand binding in rhesus macaque infants: A pilot study. *Acta neurobiologiae experimentalis*. 2010;70(2):147-64.
11. Namvarpour Z, Nasehi M, Amini A, Zarrindast M-R. Protective role of alpha-lipoic acid in impairments of social and stereotyped behaviors induced by early postnatal administration of thimerosal in male rat. *Neurotoxicology and Teratology*. 2018;67:1-9.
12. Afsordeh K, Sadeghi Y, Amini A, Namvarpour Z, Abdollahifar M-A, Abbaszadeh H-A, et al. Alterations of neuroimmune cell density and pro-inflammatory cytokines in response to thimerosal in prefrontal lobe of male rats. *Drug and chemical toxicology*. 2019;42(2):176-86.
13. Olczak M, Duszczyk M, Mierzejewski P, Bobrowicz T, Majewska MD. Neonatal administration of thimerosal causes persistent changes in mu opioid receptors in the rat brain. *Neurochemical research*. 2010;35(11):1840-7.
14. Olczak M, Duszczyk M, Mierzejewski P, Wierzb-Bobrowicz T, Majewska MD. Lasting neuropathological changes in rat brain after intermittent neonatal administration of thimerosal. *Folia neuropathologica*. 2010;48(4).
15. Olczak M, Duszczyk M, Mierzejewski P, Meyza K, Majewska MD. Persistent behavioral impairments and alterations of brain dopamine system after early postnatal administration of thimerosal in rats. *Behavioural brain research*. 2011;223(1):107-18.
16. Laurente J, Remuzgo F, Ávalos B, Chiquinta J, Ponce B, Avendaño R, et al. Neurotoxic effects of thimerosal at vaccines doses on the encephalon and development in 7 days-old hamsters. *An Fac Med Lima*. 2007;68(3):222-37.
17. de Oliveira Souza VC, de Marco KC, Laure HJ , Rosa JC, Barbosa Jr F. A brain proteome profile in rats exposed to methylmercury or thimerosal (ethylmercury). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2016;79(12):502-12.
18. Namvarpour Z, Amini A, Nasehi M, Zarrindast M-R. The effects of early exposure to thimerosal on impairments of social and stereotyped behaviors and the number of Purkinje cells of cerebellum in rats. *Journal of Applied Biotechnology Reports*. 2018;5(3):105-11.
19. Noshadian M, Namvarpour Z, Amini A, Raoofi A, Atabati H ,Sadeghi Y, et al. Alpha lipoic acid ameliorates THIM-induced prefrontal cell loss and

abnormal enzymatically contents in the developing rat. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2020;103:101727.

20. Hornig M, Chian D, Lipkin WI. Neurotoxic effects of postnatal thimerosal are mouse strain dependent. *Molecular psychiatry*. 2004;9(9):833.

21. Afsordeh K, Sadeghi Y, Amini A, Namvarpour Z, Abdollahifar M-A, Abbaszadeh H-A, et al. Alterations of neuroimmune cell density and pro-inflammatory cytokines in response to thimerosal in prefrontal lobe of male rats. *Drug and chemical toxicology*. 2018;1-11.

22. Teimouri M, Heidari MH, Amini A, Sadeghi Y, Abdollahifar M-A, Aliaghaei A, et al. Neuroanatomical changes of the medial prefrontal cortex of male pups of Wistar rat after prenatal and postnatal noise stress. *Acta histochemica*. 2020;122(6):151589.

23. Ebrahimpour-Malekshah R, Amini A, Mostafavinia A, Ahmadi H, Zare F, Safaju S, et al. The stereological, immunohistological, and gene expression studies in an infected ischemic wound in diabetic rats treated by human adipose-derived stem cells and photobiomodulation. *Archives of Dermatological Research*. 2023;1-18.

24. Chen Z, Halford NG, Liu C. Real-time quantitative PCR: Primer design, reference gene selection, calculations and statistics. *Metabolites*. 2023;13(7):806.

25. Amini A, Soleimani H, Abdollahifar MA, Moradi A, Ghoreishi SK, Chien S, et al. Stereological and gene expression examinations on the combined effects of photobiomodulation and curcumin on wound healing in type one diabetic rats. *Journal of cellular biochemistry*. 2019;120(10):17994-8004.

26. Fallahi F, Mostafavinia A, Shalmani LM, Amini A, Ahmadi H, Omidi H, et al. Effects of photobiomodulation on mitochondrial function in diabetic adipose-derived stem cells in vitro. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2023;285:121835.

27. Ziaiepour S, Ahrabi B, Naserzadeh P, Aliaghaei A, Sajadi E, Abbaszadeh H-A, et al. Effects of Sertoli cell transplantation on spermatogenesis in azoospermic mice. *Cell Physiol Biochem*. 2019;52(3):421-34.

28. Duszczuk-Budhathoki M, Olczak M, Lehner M, Majewska MD. Administration of thimerosal to infant rats increases overflow of glutamate and aspartate in the prefrontal cortex: protective role of

dehydroepiandrosterone sulfate. *Neurochemical research*. 2012;37(2):436-47.

29. Ariano P, Erriquez J, Gilardino A, Ferraro M, Lovisollo D, Distasi C. Calcium signals and the in vitro migration of chick ciliary ganglion cells. *Cell Calcium*. 2006;40(1):63-71.

30. Herdman ML. Thimerosal-Induced Neurotoxicity: Apoptosis Occurs Through A Mitochondrial-Mediated Pathway Via the JNK Signaling Pathway. 2006.

31. Mrozek-Budzyn D, Majewska R, Kieltyka A, Augustyniak M. Neonatal exposure to Thimerosal from vaccines and child development in the first 3 years of life. *Neurotoxicology and Teratology*. 2012;34(6):592-7.

32. Laudati G, Mascolo L, Guida N, Sirabella R, Pizzorusso V, Bruzzaniti S, et al. Resveratrol treatment reduces the vulnerability of SH-SY5Y cells and cortical neurons overexpressing SOD1-G93A to Thimerosal toxicity through SIRT1/DREAM/PDYN pathway. *Neurotoxicology*. 2019;71:6-15.

33. Geier D, King P, Geier M. Mitochondrial dysfunction, impaired oxidative-reduction activity, degeneration, and death in human neuronal and fetal cells induced by low-level exposure to thimerosal and other metal compounds. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 2009;91(4):735-49.

34. Liu W, Yang T, Xu Z, Xu B, Deng Y. Methylmercury induces apoptosis through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial apoptosis pathways activation in rat cortical neurons. *Free Radical Research*. 2019;53(1):26-44.