Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.43; No.1; 2019

Effects of Thimerosal on Cerebellum Tissue and Neurodevelopmental Disorders Related Behaviors in Rats

Zahra Namvarpour[1,2], Abdollah Amini[1*], Reza Masteri Farahani[1], Mohammad Nasehi [2]

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

(Received: 2018/10/15 Accept: 2018/11/3)

Abstract

Background: *Thimerosal (THIM) is one of the most important and inexpensive preservatives in many pharmaceutical and health products. The current knowledge on the impact of this substance on fetal neurodevelopment and incidence of behavioral and tissue defects is very controversial. Here we investigated neonatal administration of THIM on behaviors and cerebellar tissue, which are important in movement, balance, and sensory integration and which are more typically altered in Autism spectrum disorder (ASD) ASD.*

Methods: *The experiments were directed on 40 young adult male and female Wistar rats, in groups of 10, which were randomly divided into four groups: groups 2 & 1: male and female experimental groups (which received THIM (300µg Hg/kg), Intramuscular injections (im) on postnatal days (15 ,11 ,9 ,7) and groups 3 4 &: male and female control groups (which received saline in the same pattern). On the fourth week after birth, rats were examined with open field test and in the 8th post natal week, three-chamber paradigm test was conducted on the animals. After the end of the behavioral tests, histological studies were perfromed.*

Results: *Adult male and female rats, which were exposed to THIM, demonstrated impairments of locomotors activity and their social affiliation, social memory, and novelty reduced ($p<0.001$). During freezing, grooming, as the stereotyped behavior, increased significantly ($p<0.05$). The results of histological studies showed a significant decrease in the number of purkinje cells in the groups treated with THIM ($p<0.001$).*

Conclusion: *These data document that probably the early postnatal THIM administration causes lasting neurobehavioral and histological impairments and these conditions could contribute to neurodevelopmental disorders.*

Keywords: *Thimerosal; Behavioral Impairments; Neurodevelopmental Disorders; Cerebellum*

**Correspondinauthor:Abdollah Amini*
Email: d.amini2008@yahoo.com

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-17]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ۴۳، شماره ۴، ۱۹۸، صفحات ۱۵ تا ۲۲

بررسی آثار تیمروزال بر ساختار بافتی مخچه و رفتارهای مرتبط با ختلال‌های تکامل عصبی در موش‌های صحرایی

زهرا نامورپور[۱و۲]، عبداله امینی[۱*]، رضا ماستری فراهانی[۱]، محمد ناصحی[۲]

۱- گروه بیولوژی و آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲- گروه فارماکولوژی، پژوهشکده علوم شناختی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۷/۲۳ تاریخ پذیرش مقاله:۱۳۹۷/۰۸/۱۲

چکیده:

سابقه‌وهدف: تیمروزال یکی از مواد نگه‌دارنده مهم و ارزان قیمت در بسیاری از فرآورده‌های دارویی و بهداشتی است. در مورد تاثیر این ماده در رشد و تکامل جنین اطلاعات بسیار متناقض و کمی وجود دارد. این مطالعه برای تعیین اثر تیمروزال در بدو تولد بر رفتارها و بافت‌هایی مانند مخچه که نقش مهمی در حرکت و تعادل و یکپارچه‌سازی حسی دارند و در طیف اوتیستیک دچار آسیب می‌شوند، طراحی شد.

روش کار: در این مطالعه تجربی از ۴۰ سر نوزاد موش صحرایی با نژاد ویستار که به طور تصادفی و به چهار گروه ۱۰ سری شامل ۱- کنترل نر ۲- گروه کنترل ماده ۳- گروه تجربی نر ۱و ۴- گروه تجربی ماده تقسیم شدند، استفاده شد. گروه‌های تجربی یک و دو، تیمروزال را با دوز ۳۰۰ $\mu g/kg$ در روزهای ۷،۹،۱۱،۱۵ پس از تولد به صورت تزریق عضلانی دریافت کردهاند. مطالعه‌های رفتاری شامل آزمون‌های *Open Filed* در هفته چهارم و *Social Interaction Test* درهفته هشتم پس از تولد انجام شد. پس از اتمام مطالعه‌های رفتاری، بررسی‌های بافتی انجام شد.

یافته‌ها: موش‌های نر و ماده دریافت‌کننده تیمورسال علایمی از اختلال در فعالیت‌های حرکتی نشان دادند و میزان اجتماعی شدن، حافظه و ترجیح اجتماعی کاهش یافته بود ($p<0.001$). در حالی که طول مدت رفتارهای کلیشه‌ای و تکرار شونده به شکل چشمگیری افزایش یافته بود. ($p<0.05$) نتایج حاصل از مطالعه‌های بافتی نیز نشان داد که تعداد سلول‌های پورکنژ به میزان قابل توجهی در گروه تیمار شده با تیمروزال نسبت به کنترل در هر دو جنس کاهش می‌یابد ($p<0.001$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که شاید قرارگیری در معرض تیمروزال موجود در واکسن‌ها، طی دوره تکوینی می‌تواند باعث آثار سوءرفتاری و بافتی شده و منجر به اختلال‌های تکامل عصبی در آینده شود.

واژگان کلیدی: تیمروزال، آسیب‌های رفتاری، ،اختلال‌های تکامل عصبی، مخچه

مقدمه:

تیمروزال۱ یکی از ترکیب‌های جیوه ارگانیک است که حاوی ۴۹ درصد جیوه در واحد وزن است. این ماده برای سال‌هاست که به عنوان ماده نگه‌دارنده در بسیاری از واکسن‌های نوزادان استفاده می‌شود(۱).

در حقیقت، تیمروزال نام تجاری اتیل مرکوری۲ (سدیم اتیل مرکوری تیوسالسیلات۳) است و با فرمول مولکولی C9H9-HgNaO2S نمایش داده می‌شود و خیلی زود در محلول نمکی تبدیل به هیدروکسید اتیل جیوه و کلرید اتیل جیوه می‌شود که به سرعت در مغز و سایر اندام‌های حیاتی رسوب می‌کند(۲-۴).تحقیق‌ها نشان داده است که تمامی انواع جیوه سمی هستند و آثار مخرب بسیاری بر ساختارهای مختلف از جمله مغز به جای می‌گذارند. عملکرد گیرنده‌ها و آنزیم‌ها را متاثر می‌سازد، میتوکندری را دچار سمیت می‌کند، تغییرات گسترده‌ای در ساختار سه بعدی پروتین‌ها ایجاد می‌کند که گاهی باعث تبدیل آن‌ها به آنتی‌ژن درونی برای آسیب به سیستم خود ایمنی می‌شود(۵) میزان قابل توجهی از جیوه در خون نوزادانی که واکسن‌های دارای تیمروزال دریافت کرده‌اند یافت شده است. مطالعه‌های انجام شده بر نوزادان

1 Thimerosal(THIM)
2 Ethylmercury
3 sodium ethyl-mercurithiosalicylate

نویسنده مسئول: عبداله امینی
پست الکترونیک: *d.amini2008@yahoo.com*

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-17]

میمون نشان می‌دهد که جیوه موجود در واکسن های تزریقی تجمیع یافته در مغز به مراتب بیشتر از جیوه موجود در خون است و ممکن است برای ماه‌ها و حتی سال‌ها باقی بماند(۶). میزان جیوه تجمع یافته در مغز نوزادان در حدی بالاست که آثار سمیت عصبی ایجاد می‌کند و ممکن است باعث نابودی سلول‌های عصبی شود. این مواجهه زود هنگام با فرآورده‌های جیوه، به خصوص تیمروزال، به عنوان یکی از فاکتورهای مشکوک در علل ایجاد انواع اختلال‌های تکامل عصبی۴ از جمله اختلال‌های طیف اتیستیک یا اتیسم۵ شناخته می‌شود(۷, ۸). اتیسم یا اختلال طیف اتیستیک یک اختلال پیچیده تکامل عصبی است که ترکیبی از علایم مختلف و گسترده با شدت‌های گوناگون را در بر می‌گیرد وآسیب‌هایی در سه حیطه وسیع، روابط اجتماعی، ارتباطات کلامی و رفتارها و علایق کلیشه‌ای وتکرار شونده هسته اصلی تشخیصی آن است(۹, ۱۰). اگر جیوه نقشی در علل ایجاد اختلال‌های طیف اتیسم داشته باشد، باید نشانه‌های اتیسم مشابه عوارض ناشی از مسمومیت با جیوه باشد(۱۱-۱۳). در سال ۲۰۰۰، Bernard و همکارانش مشابهت‌های بین علایم اتیسم و مواجهه با جیوه را گزارش کردند و تغییرات مغزی مشترک بین این دو اختلال را شرح دادند. بر اساس این مطالعه‌ها، بسیاری از علایم بالینی ناشی از مسمومیت با جیوه مثل اختلال در روابط اجتماعی، افسردگی، اضطراب، تماس چشمی محدود، از دست دادن توانایی‌های گفتاری، مشکلات متعدد حسی و حرکتی و نقایص بارز شناختی و رفتارهای تکراری و کلیشه‌ای با علایم اختلال طیف اتیستیک مشترک است و در عین حال مشابهت‌های بیوشیمیایی، سیستم ایمنی و نوروشیمیایی بسیاری نیز وجود دارد.(۱۴). پژوهش‌های مختلف در شرایط آزمایشگاهی نیز این فرضیه را مورد آزمون قرار دادند. Olczak و همکارانش طی چند پژوهش مرتبط آثار مختلف نورو بیولوژیکال تیمروزال را در موش‌های رت بررسی کردند. در نخستین پژوهش، آثار تیمروزال بر روی گیرنده‌های اوپیوئیدی در نواحی خاکستری دور قناتی، هسته کودیت و پوتامن و هیپوکامپ مغز موش‌هایی که در هفته دوم پس از تولد چهار تزریق از چهار غلظت مختلف تیمروزال (۱۲و۲۴۰و۱۴۴۰و۳۰۰۰ µg Hg/Kg)را دریافت داشتند، سنجیده شد. نتایج نشان‌دهنده افزایش چشمگیر غلظت گیرنده‌های اوپیوئیدی در نواحی خاکستری دور قناتی،هسته کودیت و پوتامن و نیز کاهش چگالی آن در شیار دندانه‌ای بود که این کاهش غلظت، تخریب پس رونده نورون‌ها و کاهش شاخص‌های وزیکولی سیناپسی۶را به همراه داشت که همه شواهدی از آسیب‌های رشد مغزی به شمار می‌روند(۱۵). در مطالعه بعدی، آثار ارائه بدو تولد تیمروزال(۴ تزریق ۱۲ یا ۲۴۰ µg Hg/Kg در روزهای ۷،۹،۱۱ و ۱۵ پس از تولد) برپاتولوژی مغز بررسی شد و تغییرات پاتولوژیک متعددی در مغز موش‌ها مشاهده شد. این تغییرات عبارتند از: دژنراسیون ایسکیمیک نورون‌ها، تغییرات پاتولوژیک در عروق خونی کورتکس تمپورال، ناپدید شدن واکنش شاخص‌های وزیکولی سیناپسی در هیپوکامپ، آتروفی آستروگلیاها در هیپوکامپ. در واقع این پژوهش سمیت عصبی تیمروزال در دوزی برابر یا بالاتر از دوز ارائه شده در واکسن‌های کودکان، در مغز در حال رشد موش را گزارش کرد که احتمال مشارکت این ماده در اختلال‌های تکامل عصبی را بیشتر می‌کند(۱۶). در مطالعه دیگراین تیم تحقیقاتی، آثار درمان بدو تولد با تیمروزال(در دوزهای ۱۲و۲۴۰و۱۴۴۰و۳۰۰۰ µg Hg/Kg) بر رفتارهایی که به طور شاخص از نشانه‌های اتیسم به شمار می‌روند مانند فعالیت حرکتی، اضطراب، تعاملات اجتماعی درموش‌های رت در دو جنس نر و ماده بررسی شدند. در هر دو جنس نر و ماده موش‌های تحت درمان با تیمروزال نقص در فعالیت‌های حرکتی، افزایش اضطراب و ترس از مکان‌های نا آشنا مشاهده شد. رفتارهای تعاملی کاهش یافت و خود را به شکل تعاملات ضد اجتماعی نشان داد. این مطالعه بیان داشت که موش‌های نر تحت درمان، رفتارهای ضداجتماعی شدیدتری از خود نشان دادند اما کاهش رفتارهای اجتماعی در موش‌های ماده مشاهده شد و در واقع آسیب‌های رفتاری پایدار مشابه آنچه در اختلال اتیسم بروز می‌یابد در هر دو جنس مشاهده شد(۱۷).

این سلسله مطالعه‌ها نشان دادند که تیمروزال می‌تواند باعث بروز ناهنجاری‌های رفتاری، نورو شیمیایی و نوروپاتولوژیکال مشابه آنچه در اتیسم بروز می‌کند، شود. در عین حال، شواهد بسیاری مبنی بر دژنراسیون و تخریب سلول‌های مغزی در اثر مواجهه با جیوه وجود دارد. این آسیب‌ها شامل: تغییرهای پسرونده، تجمع جیوه و از بین رفتن قابل توجه سلول‌هاست(۱۸). با توجه به اینکه پایدارترین اختلال‌های نورولوژیکی یافت شده در مبتلایان به اتیسم از بین رفتن آتروفی مخچه‌ای است و مطالعه‌های محدودی در ارتباط با آثار سمی تیمروزال بر ساختار بافتی و تعداد سلول های پورکنژ مخچه به خصوص از نظر تاثیر جنس وجود دارد ، بنابراین در این تحقیق سعی شد فرضیه تاثیر سمیت عصبی ناشی از تیمروزال بر سلول های پورکنژ در مخچه و بروز ناهنجاری‌های رفتاری مشابه اتیسم و احتمال بروز تفاوت میزان آسیب در بین جنسیت نر و ماده در این پژوهش بررسی شود. این تحقیق در قالب طرح تحقیقاتی در دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و در سال‌های ۲۰۱۶-۲۰۱۷ با کد ثبت ۸۰۷۰ انجام شد. در ضمن بخش رفتاری در مرکز تحقیقات اعتیاد بیمارستان فارابی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد.

روش کار:

این مطالعه تجربی، بر روی ۴۰ سر موش صحرایی جوان نر و ماده انجام شد که در روزهای ابتدایی پس از تولد تحت درمان با تیمروزال به صورت تزریقی قرار گرفتند. موش‌های مادر باردار از یک نژاد انتخاب شدند و تحت شرایط استاندارد در دمای ±3 ۲۲ 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 چهارگروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. موش‌های هر گروه در قفس‌های مخصوص و مشابه به ابعاد ۴۰×۲۰×۲۰ سانتی‌متر قرار گرفتند. دو گروه به عنوان گروه شاهد و دو گروه دیگر به عنوان گروه‌های تجربی در نظر گرفته شدند(در تمام طول آزمایش پروتکل اخلاقی کار با حیوانات رعایت شد تا کمترین درد یا زجری متحمل نشوند (کد اخلاق ۱۳۹۵,۴,۳.R.SBMU.MSP.REC).

گروه‌بندی:

گروه‌بندی به‌صورت تصادفی و مطابق تحقیق‌های قبلی به‌صورت زیر انجام شد

۱- گروه موش‌های صحرایی نر در معرض تیمروزال ۲- گروه موش‌های صحرایی ماده در معرض تیمروزال ۳- گروه موش‌های صحرایی نر شاهد و ۴-گروه موش‌های صحرایی ماده شاهد. به هر کدام از گروه‌های تجربی در معرض تیمروزال، داروی تیمروزال (Sigma, Germany) در دوز۳۰۰(µg/Hg /kg) (با توجه به وزن) در روزهای۷،۹،۱۱،۱۵ پس از تولد (مطابق جدول زمانی شبیه‌سازی واکسیناسیون کودکان ابداع شده توسط (Horning(۱۹ به صورت im در عضله Glutei Maximi تزریق شد. با توجه به اینکه حجم تجمعی جیوه تزریق شده در ماه‌های اول تا ۶ پس از تولد در نوزادان ۱۸۷,۵ µg است، علت انتخاب دوز ۳۰۰(µg/Hg /kg) برای تیمروزال بررسی آثار سمیت عصبی این ماده در غلظتی بالاتر از دوز تیمروزال ارائه شده در واکسن‌های کودکان است. به موش‌های گروه‌های شاهد نیز سالین نرمال طبق جدول زمانبندی مشابه به صورت im در عضله Glutei Maximi تزریق شد. پس از بلوغ جسمی موش‌ها، در هفته چهارم پس از تولد، تست open field برای بررسی میزان فعالیت حرکتی و در هفته هشتم پس از تولد از Test Social Interaction برای بررسی روابط اجتماعی استفاده شد. پس از اتمام تست‌های رفتاری، حیوانات در گروه‌های مورد مطالعه توسط کلروفرم بیهوش شدند. سپس وزن موش‌ها در قبل از کالبد شکافی و انجام تست اندازه‌گیری و ثبت شد. (وزن موش‌ها با ترازوی دیجیتالی با دقت ±0.01گرم اندازه‌گیری شد). پس از کشتن موش‌ها سر آن‌ها با استفاده از گیوتین جدا و مخچه به محلول فیکساتیو فرمالین ۱۰ درصد منتقل شد. مراحل پاساژ بافتی توسط دستگاه میکروپروسسور که شامل فیکساسیون، آبگیری، شفاف سازی و آغشتگی انجام شد. برای بررسی و شمارش سلول‌های پورکنژ از نمونه‌های حاصله برش‌های سریالی به ضخامت ۱۰ میکرونی و سریالی برای ساژیتال از ناحیه ورمیس مخچه توسط دستگاه میکروتوم دوار (Shandon -UK) تهیه شد، سپس مقاطع انتخاب شده توسط روش رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو و هماتوکسیلین و ائوزین (Hematoxylin and Eosin)رنگ‌آمیزی شدند. در اینجا تعداد سلول‌های پورکنژ به‌عنوان تراکم خطی سلول‌های پورکنژ

4 neurodevelopmental desorders

5 Autistic spectrum disorders(ASD)

6 Synaptophysin

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-17]

بیان شدند. از مقاطع موردنظر با استفاده از میکروسکوپ نوری Zeiss Axiovert (200M Cell Observer System,) (Gottingen, Germany عکس‌هایی تهیه و به کامپیوتر منتقل شدند. سپس برای شمارش سلول‌های پورکنژ از نرم‌افزار موتیک و (Motic Images Software 2000, Version 1.2) گراتیکول شطرنجی استفاده شد. به این صورت که از هر مقطع بافتی چهار ناحیه به طور تصادفی مشخص و میانگین سلول‌ها در هر میلی‌متر مربع محاسبه شد و شمارش سلولی در هر نمونه از هر گروه بر روی ۱۰ مقطع بافتی انجام شد.

تست‌های رفتاری:

Open Field Test

در هفته چهارم پس از تولد، حیوانات با این تست بررسی شدند. تست در اتاقی با نور ضعیف و در سکوت بدون هر گونه خوگیری قبلی انجام شد. حیوانات ابتدا به مدت ۱۵ دقیقه پیش از شروع آزمون به اتاق انتقال داده شدند تا به فضای اتاق عادت کنند. اتاقک تست سفید رنگ و چهار ضلعی با ابعاد ۳۶*۷۲ سانتی‌متر است که در کف به ۱۶ مربع ۱۸*۱۸ سانتی‌متری تقسیم شده است. هر آزمون ۱۵ دقیقه به طول انجامید و پارامترهایی مانند: کل مسافت طی شده، مدت زمانی که موش در وسط صفحه قرار دارد، دفعاتی که موش از کناره‌ها به وسط صفحه برمی‌گردد، مشاهده و به وسیله کورنومتر و به صورت دستی شمارش و ثبت شد. تست براساس پروتکل Crawley J و همکارانش اجرا شد(۲۱).

Social Interaction (Three Chamber Paradigm) Test

تست سه اتاقکی تعاملات اجتماعی که به پروتکل روابط اجتماعی و ترجیح روابط جدید اجتماعی Crawley معروف است، برای اولین بار توسط وی و همکارانش با هدف مطالعه تمایلات اجتماعی و حافظه اجتماعی در انواع مختلفی از موش‌ها به کار برده شد. این تست در هفته هشتم پس از تولد در فاز تاریک در چرخه ۱۲ ساعت روشنایی – ۱۲ ساعت تاریکی انجام شد. حیوانات براساس حداقل تفاوت وزن به صورت تصادفی در گروه‌های دوتایی دسته‌بندی شدند. حیوانات از زایمان‌های مختلف انتخاب شدند که هرگز یکدیگر را ندیده بودند، گروه‌های کنترل با کنترل و گروه‌های تیمروزال با تیمروزال جفت شدند تا از مخدوش شدن اطلاعات و اثرگذاری موش‌های گروه کنترل بر موش‌های تحت درمان با تیمروزال جلوگیری شود.(فرض بر این بود که موش‌های تحت درمان با تیمروزال در تعاملات اجتماعی دچار اختلال هستند.). دو موش کنترل در هر آزمایش لازم بود، یکی برای مرحله اول و دیگری برای مرحله دوم آزمون استفاده شد. تست تعاملات اجتماعی به مدت پنج دقیقه در فضای مستطیل شکلی با ابعاد ۱۹*۴۳ سانتی‌متر که به وسیله دیواره‌هایی با ارتفاع ۲۲ سانتی‌متر به سه قسمت تقسیم شده است، انجام شد.(این فضا برای حیوانات ناآشنا بوده و هیچ‌گونه خوگیری وجود ندارد)، دو محفظه لیوان مانند سیمی با در قابل جدا شدن که آنقدر بزرگ باشد که موش در آن قرار گیرد در دو اتاقک جانبی قرار گرفت که در آن‌ها موش ناآشنا قرار داشت. آزمون در فاز روشنایی و با نور ۶۵۰ lux انجام شد. مشاهده‌گر پارامترهای مورد نظر را به دقت مشاهده کرده و ثبت شد.

مرحله خوگیری:

در این مرحله دو بخش راست و چپ اتاقک با پوشاندن خروجی‌ها مسدود شد و در هر بخش محفظه‌های سیمی خالی قرار گرفت. موش مورد آزمون در محدوده میانی قرار گرفت و برای پنج دقیقه در آنجا ماند تا خوگیری حاصل شود.

مرحله اول آزمون: جنبه تمایلات اجتماعی

در این بخش از آزمون رفتاری، هدف بررسی میزان تمایلات اجتماعی موش است. فرض آزمون بر این اساس است که حیوان آزمودنی طبیعی تمایل بیشتری به برقراری ارتباط با حیوانی دیگردارد تا تعامل و ارتباط با محفظه خالی. در این مرحله یکی از موش‌های کنترل (غریبه یک) در یکی از محفظه‌ها قرار گرفت. درپوش مسدودکننده بین محدوده‌ها برداشته شد تا موش آزمودنی قرار گرفته در محدوده میانی بتواند بین محدوده‌ها حرکت کند. پارامترهای زیر بررسی و مشاهده دقیق شد:

الف. طول مدت تماس مستقیم (فعال) با موش (غریبه یک) داخل محفظه

ب. طول مدت رفتارهای نا متعارف تکرار شونده موش مانند:

Self - Grooming،Freezing

۴. طول مدت مرحله یک آزمون ۱۰ دقیقه بود.

مرحله دوم آزمون: روابط اجتماعی جدید/ترجیح

در مرحله دوم آزمون، میزان تمایل حیوان به برقراری روابط اجتماعی جدید و نوع ترجیح آن بررسی می‌شود. فرض بر این است که آزمودنی سالم تمایل و ترجیح بیشتری به برقراری ارتباط با حیوان جدید از خود نشان می‌دهد. بنابراین حیوان موش دوم(غریبه دو) را داخل محفظه خالی دیگر قرار داده و پارامترهای بیان شده در مرحله قبل مشاهده و بررسی شد و تفاوت‌های رفتاری موش در تعامل با غریبه یک و مقایسه با غریبه دو مد نظر و مشاهده شد. طول مدت این مرحله آزمون نیز ۱۰ دقیقه است.

آنالیز یافته‌ها:

برای بررسی نتایج تست رفتاری Open field test بر فعالیت‌های حرکتی، از آزمون آماری one-way ANOVA و برای بررسی نتایج آزمون Three-chamber paradigm test بر رفتارهای اجتماعی نیز آزمون آماری Student's t test استفاده شد. رفتارهای تکرار شونده‌ای که در زمان آزمون Three-chamber paradigm test انجام شده بود نیز توسط آزمون one-way ANOVA بررسی شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از بررسی‌های بافتی نیز، از آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه و توکی، کروسکال– والیس(Kruskal-Wallis) استفاده شد. در این تحقیق سطح معنادار P<0/05در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

نتایج حاصل از فعالیت های حرکتی:

نتایج حاصل از فعالیت حرکتی در موش نشان دهنده این امر است که تیمروزال با دوز300µg/kg در هر دو جنس نر و ماده فعالیت حرکتی را کاهش داده است (P<0.001). البته تفاوت معناداری بین این کاهش فعالیت حرکتی در بین دو جنس نر و ماده وجود ندارد(جدول۱).

گروه های آزمایشی	تعداد دفعات عبور از خطوط درمدت زمان پنج دقیقه
شاهد (موش های صحرایی نر)	۳۷,۶±۴,۲
شاهد (موش های صحرایی ماده)	۳۶,۲±۴,۲
تیمروزال۳۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن (موش های صحرایی نر)	***۸,۵±۲,۷
تیمروزال۳۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن (موش های صحرایی ماده)	۱۰,۳±۳,۲###

جدول ۱) نتایج حاصل از فعالیت های حرکتی: همان طوری که در جدول مشخص است، تیمروزال سبب تغییر در فعالیت حرکتی در هر دوجنس (جنس نر و ماده) مشاهده می‌شود. در این جدول مقادیر به صورت میانگین± انحراف معیار ارائه شده‌اند، *** تفاوت معنادار (P<0/001) بین دو گروه تیمروزال ۳۰۰(موش‌های صحرایی نر) و گروه شاهد(موش‌های صحرایی نر)، ### تفاوت معنادار(P<0/001)

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-17]

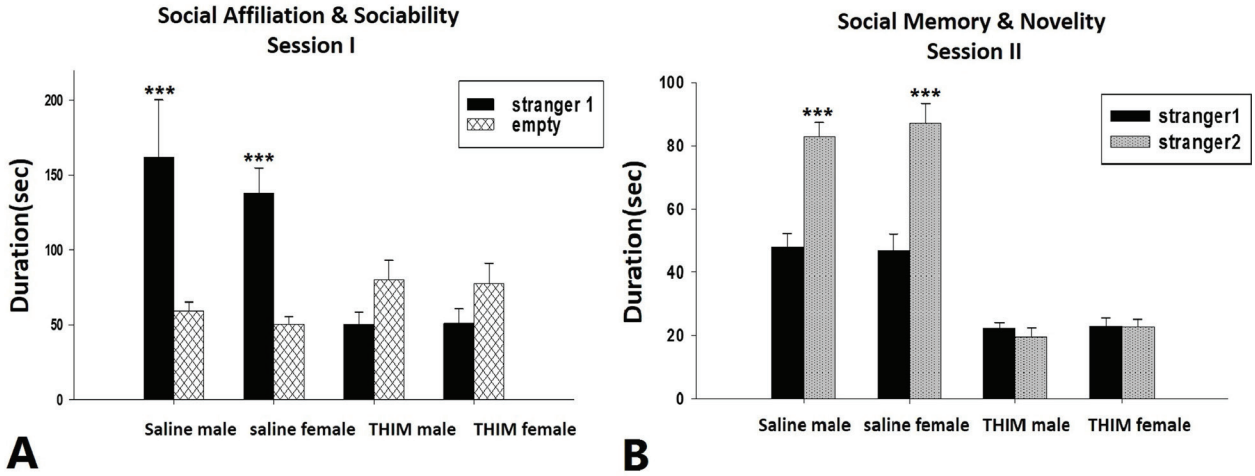
بین دو گروه تیمروزال ۳۰۰(موش‌های صحرایی ماده) و گروه شاهد(موش‌های صحرایی ماده).

رفتارهای اجتماعی به دنبال مصرف دوز بالای تیمروزال:

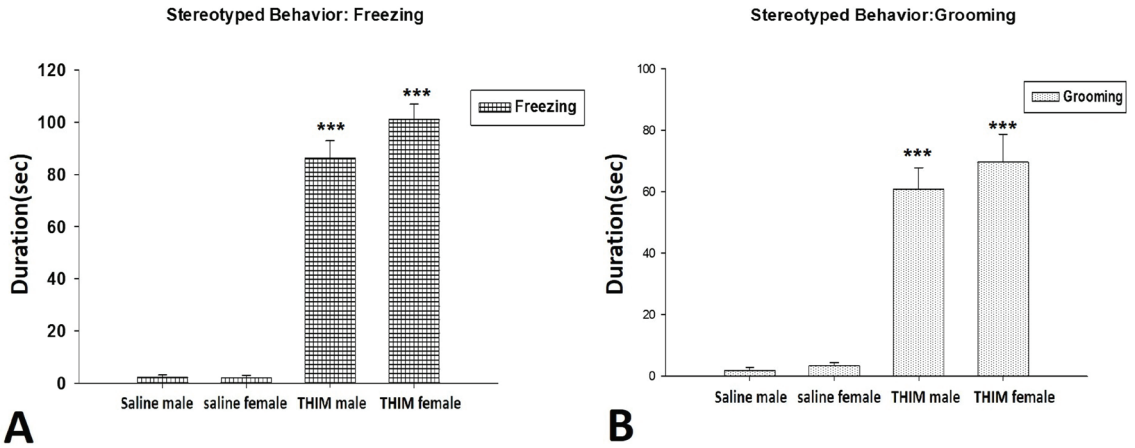
مرحله اول آزمون:

نتایج آزمونT-test مستقل در تصویر 1A نشان می‌دهد که هیچ تفاوت معناداری بین میزان ارتباط موش‌های نر و ماده تحت درمان با تیمروزال(300µg/kg) با موش غریبه یک و محفظه خالی وجود ندارد.(موش‌های نر p=0.07)،(موش‌های ماده p=0.143). این نتایج نشان‌دهنده تمایل طبیعی کمتر این حیوانات به برقراری روابط تعامل داشته و شناخته است(غریبه یک) و موشی که به تازگی وارد محفظه خالی شده است (غریبه دو) را دارد. براین اساس، تمایل حیوان به برقراری ارتباط با موش جدیدتر، نشان‌دهنده حافظه اجتماعی سالم و تمایل به برقراری ارتباط جدید است. نتایج آزمون در تصویر1B نشان می‌دهد که موش‌های نر و ماده‌ای که تیمروزال با دوز /300µg) kg) دریافت کرده‌اند، تمایلی به تعامل بیشتر با موش جدید ندارند و تفاوت معناداری بین ارتباط با موش غریبه یک و غریبه دو مشاهده نمی‌شود. (موش‌های نر p=0.45)،(موش‌های ماده p=0.47).

وجود تفاوت معنادار بین میزان ارتباط در گروه های کنترل با موش جدیدتر(غریبه دو)



شکل ۱) تاثیر تیمروزال بر رفتارهای اجتماعی در تست Three-Chamber Paradigm Test، A) جلسه اول آزمون، فاز آشنایی اجتماعی و اجتماعی شدن. در موش‌های نر و ماده گروه‌های شاهد، مدت زمانی که با موش غریبه سپری می‌شد به شکل معناداری نسبت به مدت زمانی که در کنار محفظه خالی می‌گذراندند افزایش نشان می‌داد در حالی‌که در موش‌های آزمودنی نر و ماده تحت درمان با تیمروزال این تمایل به برقراری رابطه اجتماعی با موش دیگر مشاهده نشد و تفاوت معناداری بین میزان ارتباط با دو محفظه وجود نداشتB.) جلسه دوم آزمون، فاز حافظه اجتماعی و ترجیح. برخلاف گروه موش‌های شاهد، موش‌های آزمودنی نر و ماده تحت درمان با تیمروزال در نشان دادن ترجیح به برقراری رابطه اجتماعی با موش جدید نسبت به موشی که پیشتر آشنا شده بودند، ناموفق عمل کردند. مقادیر به صورت میانگین± انحراف معیار ارائه شده‌اند، *** تفاوت معنادار (P<0/001) بین دو زمان سپری شده برای هر گروه را نشان می‌دهد.



شکل ۲) رفتارهای کلیشه‌ای تکرار شونده به دنبال مصرف تیمروزال:
همان‌طوری که در شکل بالا نشان داده شده است، رفتارهای کلیشه‌ای و تکرار شونده Freezing و Grooming در موش‌های نر و ماده تحت درمان با تیمروزال به شکل معناداری افزایش داشته است* P). p<0.001 نشان‌دهنده تفاوت گروه‌ها نسبت به کنترل است). (P*<0.001).

اجتماعی است. در گروه‌های کنترل که نرمال سالین دریافت کرده‌اند، این تفاوت معنادار در ارتباط بین موش غریبه یک و محفظه خالی مشاهده می‌شود. (p<0.001)

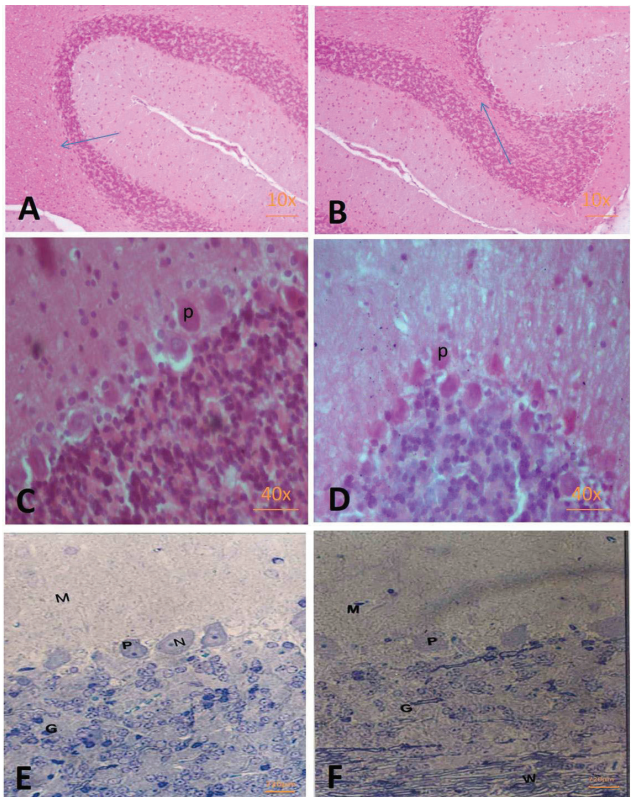
مرحله دوم آزمون:

در مرحله دوم، موش آزمودنی حق انتخاب برقراری ارتباط با موشی که پیشتر با آن نسبت به موش آشنا(غریبه یک)، نشان‌دهنده حافظه اجتماعی دست نخورده و تمایلات بیشتر به برقراری روابط اجتماعی جدید است.p<0.001

رفتارهای کلیشه‌ای تکرار شونده به دنبال مصرف تیمروزال:

نتایج آزمون آماری one-way ANOVA نشان‌دهنده این است که میزان رفتارهای

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-17]



شکل ۳) تاثیر تیمروزال بر رفتارهای کلیشه ای و تکرار شونده(freezing & grooming) در تست the social interaction (هر دو جلسه). A) طول مدت freezing در موش های آزمودنی نر و ماده تحت درمان با تیمروزال نسبت به گروه‌های شاهد تفاوت معناداری را نشان می‌دهد.B) طول مدت grooming در موش‌های آزمودنی نر و ماده تحت درمان با تیمروزال نسبت به گروه‌های شاهد تفاوت معناداری را نشان می‌دهد. مقادیر به صورت میانگین± انحراف معیار ارائه شده‌اند، *** تفاوت معنادار (P<0/001) بین زمان سپری شده هر گروه آزمودنی نسبت به گروه شاهد خود را نشان می‌دهد.

کلیشه‌ای و تکرار شونده Freezing و Grooming در موش‌های نر و ماده تحت درمان با دوز تیمروزال به شکل معناداری افزایش داشته است p<0.001، البته این میزان تفاوت بین دو جنس معنادار نیست p>0.05.

بررسی تعداد سلول‌های پورکنژ در مخچه:

شکل A,C,E3، قسمتی از مخچه را در گروه‌های شاهد نشان می‌دهد. به طوری‌که در تصویر مشاهده می‌شود سه لایه قشر مخچه، شامل: لایه ملکولر(M) با سلول‌های دارای هسته گرد و کوچک و محیطی‌ترین لایه قشر است که این لایه در رنگ‌آمیزی کم رنگ دیده می‌شود. لایه سلول‌های پورکنژ (P)در این شکل، واضح دیده می‌شود. این سلول‌ها با هسته روشن و هستک مشخص و سیتوپلاسمی یکنواخت و وسیع به طور منظم در یک ردیف قرار گرفته‌اند. همان‌طور که در تصویر دیده می‌شود تنه این سلول‌ها بزرگ و گلابی شکل بوده و بین دو لایه ملکولر و گرانولر قرار دارد. لایه گرانولر(G) با هسته‌های کوچک و متراکم از سلول‌های فشرده به هم تشکیل شده که در تصویر مشاهده می‌شود. ماده سفید(W) حاوی رشته‌های عصبی میلین‌دار و سلول‌های گلیال پراکنده است.

شکل B,D و F 3، قسمتی از مخچه را در گروه‌های تجربی موش‌های تحت درمان با تیمروزال، با بزرگنمایی مشابه گروه شاهد نشان می‌دهد. همان‌طور که در تصویر مشاهده می‌شود، در قشر مخچه سه لایه قابل تشخیص است. لایه‌های ملکولر و گرانولر تفاوت قابل ملاحظه‌ای با گروه شاهد ندارند. تفاوتی که در این گروه مشاهده شد کاهش تعداد سلول‌های پورکنژ نسبت به گروه شاهد است. میانگین سلول‌های پورکنژ در این گروه آزمایشی نر ۱/۰۵ ± ۵/۱۸ در گروه شاهد نر ۱/۵۲ ± ۶/۰۶ است. بررسی آماری نشان داد که این تفاوت تعدادی معنادار است.(P<0.01) میانگین سلول‌های پورکنژ در گروه تجربی موش‌های ماده تحت درمان با تیمروزال، ۰/۷۳ ± ۵/۲۴ و در گروه شاهد ماده ۰/۰۷۹ ± ۶/۳۱ است که این تفاوت نیز به لحاظ آماری معنادار است(P<0.01). این مقدار در دو گروه آزمایشی تفاوت قابل ملاحظه‌ای نداشت(0.11P>).

بحث:

ژوهش حاضر نشان می‌دهد که فعالیت‌های حرکتی در موش‌های تحت درمان با تیمروزال در هر دو جنس به شکل معناداری کاهش یافته است. همچنین حرکت‌های تکرار شونده و کلیشه‌ای در موش‌های تحت درمان با تیمروزال در هر دو جنس به شکل معناداری افزایش یافته است. امروزه بخش محدودی از مطالعه‌های تاثیر انواع مختلف جیوه بر سیستم عصبی در حال رشد، بر تاثیر تیمروزال بر رفتارهای حرکتی، رفتارهای اجتماعی، حرکت‌های تکرار شونده و کلیشه‌ای نامتعارف اختصاص دارد، البته تا کنون مطالعه‌ای تاثیر دوز بالای این ماده را بر ویژگی‌های رفتاری و بافت شناسی موش‌های نر و ماده بررسی نکرده است. پژوهش حاضر نشان می‌دهد که فعالیت‌های حرکتی در موش‌های تحت درمان با دوزبالای تیمروزال در هر دو جنس به شکل معناداری کاهش یافته است. نتایج حاصله در تایید نتایج به‌دست آمده از پژوهش‌های دیگری‌است که این کاهش فعالیت حرکتی را در دوزهای متفاوت تیمروزال نشان داده‌اند(۱۵, ۱۶, ۱۸, ۲۱).

مطالعه Olczak و همکاران نقص و کاهش فعالیت‌های حرکتی و اضطراب و ترس از مکان‌های ناآشنا را در موش‌های نر گزارش داده‌اند(۱۶). مشابه این نتایج در مطالعه Hornig و همکاران بر روی موش‌های سوری تحت درمان زود هنگام با دوز پایین تیمروزال نیز مشاهده می‌شود(۱۹). نتایج مطالعهSulkowski و همکارانش روی مواجهه پیش از تولد موش‌های نر و ماده با تیمروزال نیز موید آسیب به مخچه به واسطه oxidative stress و کاهش فعالیت حرکتی در هر دو جنس است(۲۲). چنین به نظر می‌رسد که اثر انواع مختلف جیوه بر نقصان فعالیت‌های حرکتی در مطالعه‌های مختلف اثبات شده است(۲۲). Olczak و همکاران در مطالعه دیگری، آسیب سلول های پورکنژ مخچه را در موش‌های تحت درمان با تیمروزال نشان داده‌اند(۱۵).

مطالعه دیگری القای(mRNA) Metallothionein (MT) را پس از مواجهه مغز موش با دوز پایین تیمروزال گزارش کرده است(۲۳). با توجه به نتایج این پژوهش‌ها و مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد که مخچه نسبت به تیمروزال حساسیت بالایی دارد و ممکن است اختلال در فعالیت‌های حرکتی پس از مواجهه با تیمروزال ناشی از آسیب به مخچه باشد.

مطالعه حاضر نشان داد که مواجهه زودهنگام با دوز بالای تیمروزال باعث کاهش میزان تمایلات اجتماعی در مرحله اول آزمون Social interaction (three chamber paradigm) test و نیز کاهش معنادار حافظه اجتماعی و ترجیح به برقراری رابطه جدید در مرحله دوم در هر دو جنس نر و ماده می‌شود. این نتایج در راستای نتایج مطالعه Olczak و همکاران است که آسیب در روابط اجتماعی را تنها در دوز بالای تیمروزال(3000µg/kg) گزارش می‌دهد(۱۵, ۱۷). نتایج این پژوهش و نیز مطالعه‌هایی که از وجود دژنراسیون نورونی ناشی از مواجهه با تیمروزال خبر می‌دهد(۲۴). چنین به نظر می‌رسد که تیمروزال در دوزهای بالا با مکانیسم ایجاد دژنراسیون عصبی باعث بروز انواع اختلال‌های رفتاری مشابه اختلال‌های تکاملی عصبی مانند اتیسم می‌شود.

این پژوهش، نخستین مطالعه تاثیر دوز بالای تیمروزال بر رفتارهای نامتعارف کلیشه‌ای و تکرار شونده است و نتایج آن بیانگر افزایش چشمگیر رفتارهایی مانند freezing, grooming در هر دو جنس نر و ماده در مقایسه با گروه‌های شاهد است. البته مشاهده‌های بالینی ما از وجود رفتارهای پرخاشگرانه شدید در موش‌های تحت درمان با تیمروزال با دوز بالا خبر می‌دهد و بررسی دقیق این اختلال رفتاری با آزمون‌های مدون در تحقیق‌های آتی ضروری به نظر می‌رسد. به هر حال، با توجه به اینکه وجود رفتارهای کلیشه‌ای و تکرار شونده ناشی از اختلال در سیستم گلوتامینرژیک مغزی است(۲۵) و با در نظر داشتن این نکته که بروز اختلال در نوروترانسمیترهای گلوتامینرژیک از ویژگی‌های مسمومیت با تیمروزال(۲۶, ۲۷) و

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-17]

نیز اختلال‌های طیف اتیسم(۱۳, ۲۸) است، می‌توان نتیجه گرفت که این رفتارهای کلیشه‌ای و تکرا رشونده ناشی از آسیب سیستم گلوتامینرژیک مغزی و نیز بافت مغز یا مخچه به دنبال مصرف دوز بالای تیمروزال است(۲۹).

همچنین یافته‌های بررسی حاضر نشان داد که در مخچه تحت تاثیر تیمروزال تعداد سلول‌های پورکنژ نسبت به مخچه شاهد کاهش یافته است که این کاهش اندازه می‌تواند ناشی از کاهش فعالیت هسته، کاهش فعالیت سلول و افزایش مرگ برنامه‌ریزی شده سـلول و آپـوپتوز باشد. در مورد مکانسیم اثر تیمروزال عقیده بر این است که جیوه از طریق اثر تجمیعی تاثیر خود را از طریق افزایش موضعی رادیکال‌های آزاد اعمال می‌کند.

مشابه این مطالعه، در مطالعه‌ای که توسط Olzack و همکاران انجام شد، آثار ارائه بدو تولد تیمروزال(۴ تزریق ۱۲ یا ۲۴۰ µg Hg/Kg در روزهای ۷،۹،۱۱ و ۱۵ پس از تولد) برپاتولوژی مغز بررسی شد و تغییرهای پاتولوژیک متعددی در تایید پژوهش حاضر در مغز موش‌ها مشاهده شد. از جمله این تغییرها از دژنراسیون ایسکیمیک نورون‌های مخچه وآتروفی آستروگلیاها در هیپوکامپ و مخچه، واکنش مثبت Caspas-3 در Astroglia را می‌توان نام برد. در واقع این پژوهش سمیت عصبی تیمروزال در دوزی برابر یا بالاتر از دوز ارائه شده در واکسن‌های کودکان، در مغز در حال رشد موش را گزارش کرد که احتمال مشارکت این ماده در اختلال‌های تکامل عصبی را بیشتر می‌سازد(۱۶, ۱۷). Laurente و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷، طی مطالعه‌ای روی آثار تیمروزال روی سیستم عصبی و مخچه در همستر نشان دادند که تیمروزال می‌تواند باعث کاهش تعداد سلول، دمیلینه شدن آکسون‌های سلول‌های عصبی، نکروز سلول‌های پورکنز و دانه‌دار و نیز گلیوژیس در تمام لایه‌های مخچه شود(۱۸) که این یافته‌ها در تایید یافته‌های مطالعه حاضر است.

نتیجه‌گیری:

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که مواجهه زود هنگام با تیمروزال در جدول زمانی مشابه جدول زمانی واکسیناسیون کودکان موجب کاهش فعالیت حرکتی و اختلال در رفتارهای تعامل اجتماعی و ایجاد رفتارهای تکرار شونده و کلیشه‌ای می‌شود که بسیار مشابه ویژگی‌های بارز اختلال‌های تکاملی عصبی به خصوص اختلال‌های طیف اتیستیک است و با توجه به این نکته که موش‌های صحرایی سیستم محافظتی قدرتمندی دارند که موجب از بین رفتن آثار القایی و توکسیک مواد در بدن آن‌ها میشود و برای ایجاد مسمومیت در آن‌ها به غلظت بالاتری از ماده سمی احتیاج است، چنین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ماده سمی تیمروزال قادر به ایجاد سمیت عصبی در مغزدر حال رشد است و بهتر است میزان استفاده آن در مصارف درمانی و دارویی دوران نوزادی و کودکی تا حد امکان به حداقل ممکن کاهش یافته یا حذف شود.

تشکر و قدردانی:

این مقاله حاصل اجرای طرح تحقیقاتی مصوب در معاونت پژوهشی، دانشکده پزشکی با کد ثبت ۸۰۷۰ و کد اخلاق IR.SBMU.MSP.REC.۱۳۹۵,۴,۳ است. به این وسیله نویسندگان مقاله برخود لازم میدانند از مسئولین و کارکنان محترم معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی کمال تشکر و قدردانی را به عمل آورند.

منـابع:

1. Geier DA, Kern JK, King PG, Sykes LK, Geier MR. A case-control study evaluating the relationship between thimerosal-containing Haemophilus influenzae type b vaccine administration and the risk for a pervasive developmental disorder diagnosis in the United States. Biological trace element research. 2015;163(1-2):28-38.

2. 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.

3. Dorea JG, Marques RC, Isejima C. Neurodevelopment of Amazonian infants: antenatal and postnatal exposure to methyl-and ethylmercury. BioMed Research International. 2012;2012.

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. Kidd PM. Autism, an extreme challenge to integrative medicine. Part 1: the knowledge base. Alternative medicine review. 2002;7(4):292-316.

6. 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.

7. Gallagher C, Goodman M. Hepatitis B triple series vaccine and developmental disability in US children aged 1–9 years. Toxicological and Environmental Chemistry. 2008;90(5):997-1008.

8. Geier DA, Geier MR. A prospective assessment of porphyrins in autistic disorders: a potential marker for heavy metal exposure. Neurotoxicity Research. 2006;10(1):57-63.

9. Geier DA, Hooker BS, Kern JK, King PG, Sykes LK, Geier MR. A dose-response relationship between organic mercury exposure from thimerosal-containing vaccines and neurodevelopmental disorders. International journal of environmental research and public health. 2014;11(9):9156-70.

10. Geier MR, Geier DA. Neurodevelopmental disorders after thimerosal-containing vaccines: a brief communication. Experimental biology and medicine. 2003;228(6):660-4.

11. Association AP. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-DMS III: American Psychiatric Association; 1980.

12. Castillo R, Carlat D, Millon T, Millon C, Meagher S, Grossman S, et al. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: Washington, DC: American Psychiatric Association Press; 2007.

13. Kern JK, Geier DA, Sykes LK, Haley BE, Geier MR. The relationship between mercury and autism: A comprehensive review and discussion. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2016;37:8-24.

14. Bernard S, Enayati A, Binstock T, Roger H, Redwood L, McGinnis W. Autism: A unique type of mercury poisoning. ARC Research, Available from the Autism Research Institute. 2000.

15. Olczak M, Duszczyk M, Mierzejewski P, Bobrowicz T,

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-17]

Majewska MD. Neonatal administration of thimerosal causes persistent changes in mu opioid receptors in the rat brain. Neurochemical research. 2010;35(11):1840-7.

16. Olczak M, Duszczyk M, Mierzejewski P, Wierzba-Bobrowicz T, Majewska MD. Lasting neuropathological changes in rat brain after intermittent neonatal administration of thimerosal. Folia neuropathologica. 2010;48(4).

17. 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.

18. 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.

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

20. Crawley J GC, Rogawski M, Sibley D, Skolnick P, Wray S, editors. Short protocols in neuroscience, systems and behavioral methods. Hoboken. NJ: John Wiley and Sons Inc. 2006.

21. Gerfen CR, Rogawski MA, Sibrey D, Skolnik P, Wray S. Short Protocols in Neuroscience: Systems and Behavioral Methods. Wiley; 2006.

22. 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.

23. Gandhi D, Dhull Dinesh K. Postnatal Behavioural Effects on the Progeny of Rat after Prenatal Exposure to Methylmercury. American Journal of Experimental Biology. 2014;1(1):31-51.

24. Minami T, Miyata E, Sakamoto Y, Yamazaki H, Ichida S. Induction of metallothionein in mouse cerebellum and cerebrum with low-dose thimerosal injection. Cell biology and toxicology. 2010;26(2):143-52.

25. Li B, Zhang Y, Ma D, Shi Z, Ma S. Mercury nano-trap for effective and efficient removal of mercury (II) from aqueous solution. Nature communications. 2014;5:5537.

26. Lewis MH, Tanimura Y, Lee LW, Bodfish JW. Animal models of restricted repetitive behavior in autism. Behavioural brain research. 2007;176(1):66-74.

27. 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.

28. Kern JK, Geier DA, Audhya T, King PG, Sykes LK, Geier MR. Evidence of parallels between mercury intoxication and the brain pathology in autism. Acta neurobiologiae experimentalis. 2012;72(2):113-53.

29. Thompson WW, Price C, Goodson B, Shay DK, Benson P, Hinrichsen VL, et al. Early thimerosal exposure and neuropsychological outcomes at 7 to 10 years. New England Journal of Medicine. 2007;357(13):1281-92.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-17]