

## بررسی اثرات ورزش میان‌مدت در پاسخ القاء شده توسط تیمروزال در مسیر اتوفازی بخش پری فرونتال موش نر نژاد ویستار

مونا سوسنی راد<sup>۱</sup>، مجید نوائیان<sup>۱</sup> و محمد ناصحی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> ایران، شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

<sup>۲</sup> ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران پزشکی، پژوهشکده علوم اعصاب

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۳۰

### چکیده

در افراد مبتلا به اوتیسم، ارتباط، تعامل اجتماعی و بازی تخیلی به طور مشخص آسیب دیده است. تیمروزال که به طور رایج مریولات شناخته می‌شود، یک ترکیب ارگانوجیوه با خواص ضدقارچی و آنتی‌سپتیک است. ارتباط بین احتمال ایجاد اوتیسم به وسیله واکنش‌های تیمروزال در سالهای اخیر عمدتاً توسط رسانه‌های عمومی مطرح شده است. پژوهش حاضر، تغییرات رفتاری وابسته به دُز را بعد از مواجهه زودهنگام با تیمروزال طبق الگوی زمانی واکسیناسیون کودکان در موشهای نر صحرایی مورد بررسی قرار داد. ابتدا به موشهای تازه به دنیا آمده در روزهای ۷، ۹، ۱۱ و ۱۵ مقدار ۳۰۰ میکروگرمی تیمروزال تزریق شد. سپس از روز ۳۱ تا روز ۸۰ پس از تولد، پروتکل‌های مختلف ورزشی ۱ و ۲ اعمال شد، بلافاصله پس از انجام پروتکلها، در مدت زمان کمتر از ۳۰ ثانیه مغز از درون جمجمه خارج و پری فرونتال مغز بسرعت استخراج شد. در نهایت، جهت سنجش تام پروتینها با استفاده از تکنیک وسترن بلات، زیرواحدهای ژن ATG8 و ATG10 در پری فرونتال مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، موشهای دریافت کننده تیمروزالی که پروتکل‌های ورزشی انجام دادند، بویژه موشهایی که پروتکل اول ورزشی + پروتکل دوم ورزشی را انجام دادند، میزان بیان ژنهای ATG8 و ATG10 به طور معناداری نسبت به گروه کنترل کمتر است. بنابراین با توجه به اینکه ATG8 و ATG10 از فاکتورهای اصلی در اتوفازی هستند و در بسیاری از مسیرهای مولکولی دیگر مثل سیگنالینگ‌های نورونی و نقل و انتقالات نورونی نقش دارند، می‌توان نتیجه گرفت ورزش میان‌مدت در رفع اثرات سوء تیمروزال در بیان ژنهای اتوفازی مؤثر است.

واژه‌های کلیدی: اوتیسم، تیمروزال، پروتکل‌های ورزشی، ATG8 و ATG10

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: majid-navaian@yahoo.com

### مقدمه

از فاکتورهای ژنتیکی، اپی‌ژنتیکی و محیطی هستند. احتمالاً فاکتورهای ژنتیکی به ایجاد آمادگی برای ASD نسبت به اثرات مضر فاکتورهای محیطی کمک می‌کنند (۲۳). در این اختلال اتصال ساختاری و عملکردی مغز نیز غیرنرمال است. پیشنهاد شده که در این بیماری، مکانیسمهای غیرطبیعی ساخت سیناپس و عملکرد چندین سیستم انتقال‌دهنده عصبی می‌توانند نقش داشته باشند (۵ و ۱۴).

اختلال اوتیسم (ASD) (Autism spectrum disorder) یک اصطلاح عمومی برای طیفی از اختلالات عصبی در افراد مبتلا به اوتیسم است که به همراه مجموعه‌ای از ناهنجاریهای رفتاری شامل رفتارهای تکراری و کلیشه‌ای، نقص در تکلم و ارتباطات و عدم توانایی شرکت در تعاملات اجتماعی متقابل، در سن دو تا سه سالگی شناسایی می‌شود (۱۶ و ۴۱). عوامل خطر احتمالی، تعدادی

(GST) اختلال دارند و این بیماران دارای غلظت پایین‌تری از گلوپاتایون می‌باشند (۲۵). فلزات سنگین ممکن است سبب التهاب و آسیب اکسیداتیو در مغز شوند و متعاقباً منجر به تغییر در رشد و پیشرفت سیستم عصبی گردند. برخی کودکان مستعد ابتلا به اوتیسم، هنگامی که در معرض جیوه هستند سخت‌تر می‌توانند آن را حذف کنند؛ بنابراین دُزهای پایین جیوه می‌تواند در بدن آنها تجمع کند و عوارض جانبی داشته باشد (۱۱). ارتباط بین احتمال ایجاد اوتیسم به وسیله واکسن‌های تیمروزال در سال‌های اخیر عمدتاً توسط رسانه‌های عمومی مطرح شده است. که ماهیت بیولوژیکی آنها از اتیل مرکوری و متیل مرکوری گرفته شده است و در مطالعات منتشر شده وجود ترکیبات جیوه، ریسک بالقوه اثرات توکسیک ناشی از جذب و تجمع در مغز را نشان دادند (۱۸). از طرفی ترکیبات جیوه می‌تواند به طور غیر مستقیم با ایجاد التهاب مغزی ناشی از انتشار قطعه‌های عصبی آسیب دیده و کاهش سطح گلوپاتایون مغز منجر به کاهش نورونها گردد. بقایای حاصل از اثرات مستقیم ترکیبات جیوه با سطح کاهش یافته گلوپاتایون می‌تواند منجر به التهاب عصبی پایدار گردد. در شرایط التهاب پایدار با گذر زمان، میکروگلیا می‌تواند شروع به تخریب بافت سالم بویژه سیناپس نماید (۳۶).

در بدن به‌طور معمول یک تعادل بین سیستم سنتز پروتئین و تخریب پروتئین وجود دارد. اتوفازای به معنی خودخواری، یک فرآیند سلولی است که محتوای سیتوپلاسمی (پروتئین‌های پیر و اندامک‌های آسیب‌دیده) در داخل وزیکول‌های دوغشایی محصور و بعد از ملحق شدن به لیزوزوم تجزیه می‌شوند و تولید انرژی می‌کنند (۳۰ و ۴۴). به نظر می‌رسد اثرات مضر تیمروزال بر روی سلول‌ها و بافتها به دلیل اثر بر طیف وسیعی از آنزیمها توسط تیمروزال روی سطح و داخل سلول باشد. اتوفازای تحت شرایط استرس، عفونت پاتوژنی و در شرایط پاتولوژیکی مختلف شامل سرطان و بیماریهای دژنراسیون مغزی فعال می‌شود. به‌طور معمول القاء‌کننده اتوفازای، ROS است. زیرا اتوفازای

همچنین این نوع از اختلال عصبی با انواع مختلفی از مشکلات دیگر همبستگی دارد که عبارت از: صرع، اسکیزوفرنی، مشکلات جسمی مانند آلرژی، اختلالات دستگاه گوارش، یا بیماریهای خود ایمنی. در میان اینها ناتوانی ذهنی مهمترین ریسک فاکتور شناخته شده است (۲۴).

یکی از راههای ابتلا به اختلال اوتیسم، واکسیناسیون است؛ به علاوه بسیاری از واکسنها حاوی تیمروزال هستند و این ترکیب حاوی ۴۹ درصد جیوه است که به‌عنوان ضد میکروب موضعی مورد استفاده قرار می‌گیرد. تیمروزال با نام رایج مرتیولات، شناخته می‌شود، یک ترکیب ارگانوجیوه که خواص ضدقارچی و آنتی‌سپتیک دارد. به‌طور گسترده فعالیت ضد میکروبی تیمروزال منجر به استفاده آن در محصولات دارویی شامل واکسن‌ها و سایر محصولات بیولوژیکی تزریقی از دهه ۱۹۳۰ شده است (۴). تیمروزال و سایر ترکیبات ارگانیک جیوه در واکسن‌های زنده به دلیل واکنش منفی با ماده فعال استفاده نمی‌شوند. با این وجود در واکسن‌های غیرفعال، آنها ممکن است در طول بعضی از مراحل تولید اضافه شوند. در اواخر دهه ۱۹۹۰، اداره غذا و دارو ایالت متحده پس از تحقیق کامل، بیانیه‌ای صادر کرد که متذکر شد که نوزادان در طول شش ماهه اول زندگی واکسینه شده براساس برنامه توصیه‌ای ایالت متحده ممکن است مقدار جیوه‌ای که دریافت می‌کنند بیش از حد مجاز آژانس حفاظتی محیط زیست برای در معرض گرفتن جیوه (mg/kg-day) (۰/۰۰۱) باشد (۱۰). اتیل مرکوری (Et-Hg-(H3C-(CH2)-Hg)) شکلی از جیوه است که در تیمروزال (نمک سدیم Et-Hg-"thiosalicylate") وجود دارد، ترکیبی که هنوز به‌عنوان نگهدارنده در بسیاری از واکسنها و سایر ترکیبات بهداشتی و آرایشی استفاده می‌شود (۳۲).

همان‌طور که مطالعات نشان دادند، بیماران ASD، در مکانیسمهای سم‌زدایی به‌ویژه Glutathione-S-transferase

درمان اوتیسم می‌توان به ورزش میان مدت اشاره کرد. تحریکات حسی کنترل شده بصورت فعالیتهای نرمال و معنی‌دار که بر نقش نیازهای بیولوژیک جهت انگیزش رفتار، تاکید اساسی دارد (۳۸). بنظر می‌رسد تمرینات هوازی می‌تواند باعث پردازش بهتر محرکهای حسی دریافتی از جانب کودک شود (۳۳). سرعتچی و همکاران اثربخشی تمرینات هوازی بر مهارتهای حرکتی درشت و ظریف را در کودکان مبتلا به اوتیسم نشان دادند (۳۹).

پژوهش حاضر، تغییرات رفتاری وابسته به دُز را بعد از مواجهه زودهنگام با تیمروزال طبق الگوی زمانی واکسیناسیون کودکان در موش‌های نر صحرایی مورد بررسی قرار داده است.

### مواد و روشها

**حیوانات مورد آزمایش:** در این مطالعه تجربی از ۸ راس ماده موش صحرایی جوان و حاصل از یک نژاد، ۶۰ موش نر با میانگین وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم متولد شدند. حیوانات در درجه حرارت کنترل شده  $22 \pm 2$  و شرایط نوری ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی (۱۲:۱۲) نگهداری شدند. در این پژوهش آزمونهای رفتاری نیز در چرخه روشنایی انجام پذیرفت و هر حیوان فقط یکبار مورد آزمایش قرار گرفت.

**گروه‌های آزمایشی:** موشهای مورد بررسی به طور تصادفی به ۸ گروه، ۷ تایی تقسیم شدند:

۱. گروه اول (کنترل): این گروه تیمروزال دریافت نکردند و از روز ۸-۲۱ بچه موشها بدون تحرک روی دستگاه تردمیل قرار گرفتند.

۲. گروه دوم (تیمروزال): این گروه تحت تزریق (۳۰۰ میکروگرم تیمروزال) قرار گرفتند و از روز ۸-۲۱ هیچ‌گونه تحرکی نداشتند.

برای کاهش آسیب اکسیداتیو عمل می‌کند. اتوفاژی سیستم بازیافت درون سلولی در یوکاریوت‌هاست که از وزیکولهای کوچک به منظور انتقال پروتئینهای سیتوزولی و ارگانلها به واکوئلهای جهت تجزیه استفاده می‌کند. از آنجاکه تشکیل وزیکول وابسته به اتصال دو پلی پپتید شبه یوبیکویتینی Atg8 و Atg12 به فسفاتیدیل اتانول آمین و پروتئین Atg5 به ترتیب می‌باشد. علاوه براین، Atg10 جهت کنژوگاسیون Atg12 ضروری است و از طرفی کنژوگه Atg12-Atg5 جهت تشکیل وزیکولهای اتوفاژیک ضروری می‌باشد (۳۵). Atg8-فسفاتیدیل آمین احتمالاً پروتئین داربستی است که گسترش غشا را پشتیبانی می‌کند و مقدار حاضر به سائز اتوفاگوزوم مرتبط است (۱۷). بنابراین پروتئینهای Atg8 و Atg10 نقش مهمی را جهت اتوفاژی در سلولهای یوکاریوتی برعهده دارند.

از دیگر نشانه‌های اوتیسم، تغییرات حافظه و یادگیری است. حافظه اصطلاح جامعی است که تمام انواع اطلاعات را در زمانهای متفاوت در خود نگه می‌دارد و به شکلهای متفاوتی پاسخ می‌دهد. سه ساختمان مغزی مهم برای حافظه در ساختار مغز شامل قسمت میانی لوب تمپورال، هسته دیانسفالیک و قسمت پایانی مغز قدامی است.

قسمت میانی لوب تمپورال مثل هیپوکمپ است که شبکه درازی از نورورنهای درگیر حافظه را تشکیل می‌دهد. آمیگدال نیز نزدیک انتهای قدامی هیپوکمپ قرار دارد و در واقع مسئول سنجش میزان تجربه هیجانی وارد شده است و بدین ترتیب، سطح فعالیت هیپوکمپ را تنظیم می‌کند. لذا یک تجربه شدید هیجانی برای همیشه در حافظه حک می‌شود ولی حرکات نامربوط سریعاً از حافظه رد می‌شوند (۲۷).

بنظر می‌رسد تمرینات هوازی می‌تواند باعث بهبود مهارتهای اجتماعی، ارتباطی و حرکتی و نیز کاهش رفتارهای کلیشه‌ای کودکان اوتیسم و رفتارهای خود تحریکی آنها گردد (۱۵). بنابراین از عوامل مداخله‌گر در

جدول ۲، بر روی تردمیل تحت پروتکل دوم ورزشی قرار گرفتند (۳).

جدول ۱- پروتکل اولیه ورزشی

روزها	سرعت	دقیقه
روز اول و دوم	۲ دقیقه/متر	۱۰
روز ۲۱-۵۰	۲ دقیقه/متر	۵
	۵ دقیقه/متر	۵
	۸ دقیقه/متر	۵

جدول ۲- پروتکل دوم ورزشی

هفته	روز	سرعت	دقیقه
اول	۵	۱۰ متر در دقیقه	۲×۱۵
دوم	۵	۱۰ متر در دقیقه	۲×۱۵
سوم	۵	۱۵ متر در دقیقه	۳×۱۵
چهارم	۵	۱۵ متر در دقیقه	۳×۱۵

**خارج کردن مغز و تثبیت بافت:** بلافاصله پس از انجام آزمونها، ابتدا موش با اتر کاملاً بیهوش شده و توسط گیوتین مخصوص آزمایشگاه سر حیوان جدا شد. سپس پوست سر با استفاده از تیغ جراحی شکافته شده و به کمک استخوان شکن، استخوانهای پیشانی، آهیانه و پس سری مجموعه به دقت برداشته شد. مغز کمتر از ۳۰ ثانیه از دورن مجموعه خارج، ناحیه پری فرونتال به سرعت استخراج شده و در پتری دیش حاوی نرمال سالین ۴ درجه سانتی گراد با نیتروژن مایع فریز شده. بافت جدا شده تا زمان انجام آزمایشات در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

**بررسی میزان بیان ژنها با تکنیک وسترن بلات:** یکی از روشهای تایید و بررسی بیان ژنها، تکنیک وسترن بلات است. در این مطالعه با استخراج پروتئینهای حاصل از ژنهای ATG8 و ATG10، میزان بیان این ژنها مورد بررسی قرار گرفت.

**استخراج پروتئین:** با استفاده از بافر لیزکننده RIPA، استخراج پروتئین از بافت مغز انجام شد. به طوری که در

۳. گروه سوم (پروتکل اول ورزشی): این گروه از روز ۲۱-۵۰ تحت پروتکل اول ورزشی قرار گرفتند.

۴. گروه چهارم (پروتکل اول ورزشی + تیمروزال): این گروه تحت تزریق (۳۰۰ میکروگرم تیمروزال) قرار گرفتند و از روز ۲۱-۵۰ تحت پروتکل اول ورزشی قرار گرفتند.

۵. گروه پنجم (پروتکل دوم ورزشی): این گروه از روز ۵۱-۸۰ تحت پروتکل دوم ورزشی قرار گرفتند.

۶. گروه ششم (پروتکل دوم ورزشی + تیمروزال): این گروه تحت تزریق (۳۰۰ میکروگرم تیمروزال) قرار گرفتند و از روز ۵۱-۸۰ تحت پروتکل دوم ورزشی قرار گرفتند.

۷. گروه هفتم (پروتکل اول ورزشی + پروتکل دوم ورزشی): این گروه از روز ۲۱-۵۰ تحت پروتکل اول ورزشی و از روز ۵۱-۸۰ تحت پروتکل دوم ورزشی قرار گرفتند.

۸. گروه هشتم (پروتکل اول ورزشی + پروتکل دوم ورزشی + تیمروزال): این گروه از روز ۲۱-۵۰ تحت پروتکل اول ورزشی و از روز ۵۱-۸۰ تحت پروتکل دوم ورزشی قرار گرفتند.

در گروههایی که نیاز به تزریق بود، ماده تیمروزال به میزان ۳۰۰ میکروگرم و بصورت درون عضلانی، در عضله glutei maximi تزریق گردید (۴۵).

**پروتکل‌های ورزشی:** پروتکل اولیه: موشها ۲۱-۵۰ روز پس از تولد، از روز یکشنبه تا پنجشنبه و در ساعتهای ۹ تا ۱۴:۳۰، مطابق جدول ۱، بر روی تردمیل تحت پروتکل اول ورزشی قرار گرفتند.

**پروتکل دوم:** موشها ۲۱-۵۰ روز پس از تولد، از روز یکشنبه تا پنجشنبه و در ساعتهای ۹ تا ۱۴:۳۰، مطابق

**آنالیزهای آماری:** یافته‌های این پژوهش با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جهت مقایسه متغیرهای مورد مطالعه در گروه کنترل و پروتکل‌های مختلف ورزشی و گروه غریبه ۱ و غریبه ۲ با پروتکل‌های مختلف ورزشی از آزمون تی مزدوج (paired-samples t-test) استفاده گردید و جهت آزمون تاثیرگذاری پروتکل‌های مختلف ورزشی نسبت به گروه کنترل از آزمون one-way و "ANOVA Post-hoc Tukey's" استفاده شد. تمامی p-value به صورت دو دامنه در نظر گرفته شد و سطح معناداری حداقل  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد.

## نتایج

**بیان پروتئین ATG8 و ATG10:** تغییرات قابل مشاهده ایجاد شده در بیان پروتئین ATG8 و ATG10 تفاوت آماری معناداری در محدوده  $P < 0.05$  تا  $P < 0.0001$  بین گروه بدون تحرک و گروه بدون مداخله ایجاد کرد. همان‌طور که شکل ۱ نشان می‌دهد، دامنه تغییرات در گروهی که پروتکل اول ورزشی + پروتکل دوم ورزشی را انجام دادند، بارزتر بوده است ( $P < 0.0001$ ).

**تاثیر تیمروزال بر بیان ژن ATG8 و ATG10:** در گروه کنترل از روز ۸۰-۲۱ بچه موش‌ها بدون تحرک روی دستگاه تردمیل قرار گرفتند، و گروه دوم از روز ۸۰-۲۱ هیچ‌گونه تحرکی نداشتند، تفاوت آماری معنی‌داری ( $P < 0.0001$ ) یافت شد. به عبارت دیگر، در گروه دوم نسبت به گروه اول، بیان ژن ATG8، ۳ برابر و بیان ژن ATG10، ۵ برابر بود (شکل ۲).

**تاثیر پروتکل اول ورزشی بر بیان ژن ATG8 و ATG10:** یافته‌ها تفاوت آماری معنی‌داری را ( $P < 0.05$ ) در بیان ژن ATG8 و ATG10، بین گروه کنترل که از روز ۸۰-۲۱ بچه موش‌ها بدون تحرک روی دستگاه تردمیل بودند و گروه سوم (پروتکل اول ورزشی) که از روز ۵۰-۲۱ تحت

هر میکروتیوب یک بید به قطر ۱mm، ۲۰۰ میلی‌گرم بافت و ۷۰۰ میکرولیتر محلول RIPA قرار داده شد. قبل از شروع فرآیند استخراج به محلول RIPA، مهارکننده پروتئاز و فسفاتاز اضافه گردید. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۶۰-۴۰ ثانیه در دستگاه لایزر با ارتعاش ۵۰ هرتز قرار گرفتند.

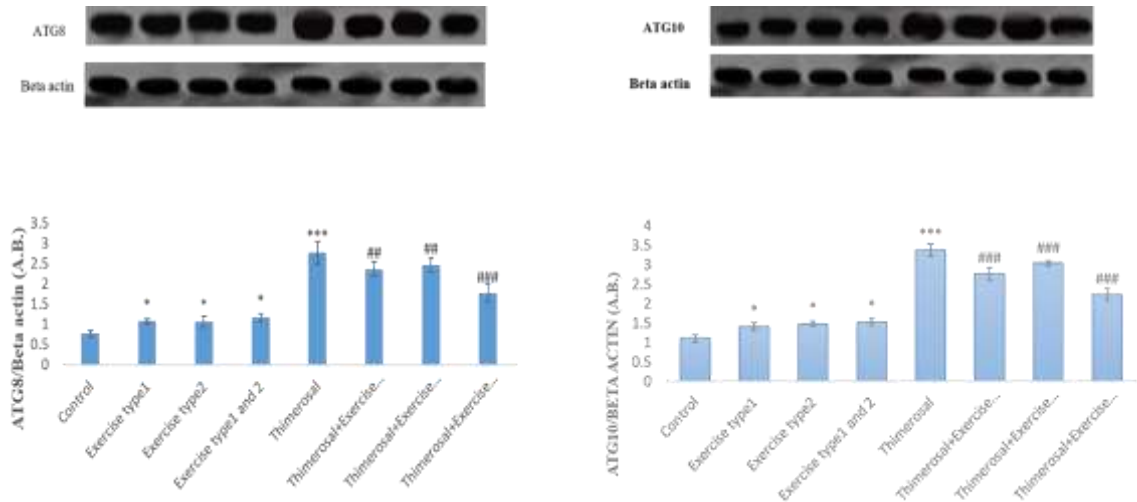
محلول هموژن بافت، برای ۱۰ دقیقه بر روی یخ در فضای آزمایشگاه قرار گرفت و سپس در سانتریفیوژ یخچال دار با دور ۱۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی با دقت جدا شد و سریعاً به فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت. در نهایت نیز غلظت پروتئین‌ها به کمک دستگاه پیکودراپ اندازه‌گیری شدند.

**وسترن بلات:** برای تعیین غلظت بافتی پروتئین‌های مورد بررسی از تکنیک وسترن بلات بر اساس پروتکل استاندارد استفاده شد (۲۱). به منظور باز شدن ساختار پروتئین‌های نمونه و سهولت حرکت بر روی ژل SDS PAGE (۱۲ درصد)، از بافر نمونه (۱۰ میلی‌لیتر تریس، ۱۲.۵ میلی‌لیتر گلیسرول، ۲.۵ میلی‌لیتر بتامرکاپتواتانول، ۰.۰۱ گرم بروموفنول بلو و ۲۵ میلی‌لیتر SDS ۱۰ درصد) استفاده شده. مخلوط نمونه و بافر نمونه با نسبت ۴:۱ به مدت ۵-۳ دقیقه در ۱۰۰+ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند و در چاهک‌ها بارگذاری شدند. پروتئین‌ها توسط نانودراپ به کاغذ غشایی PVDF منتقل شدند. سپس با استفاده از آنتی‌بادیهای اختصاصی، مقادیر و غلظت پروتئین‌های مورد بررسی، ارزیابی شدند. از روش برادفورد و نانودراپ برای تعیین غلظت پروتئین استفاده شد و در نهایت با کیت ECL از باندهای پروتئینی عکس تهیه شد، همچنین چگالی باندهای پروتئینی نیز با کمک نرم افزار image آنالیز شدند.

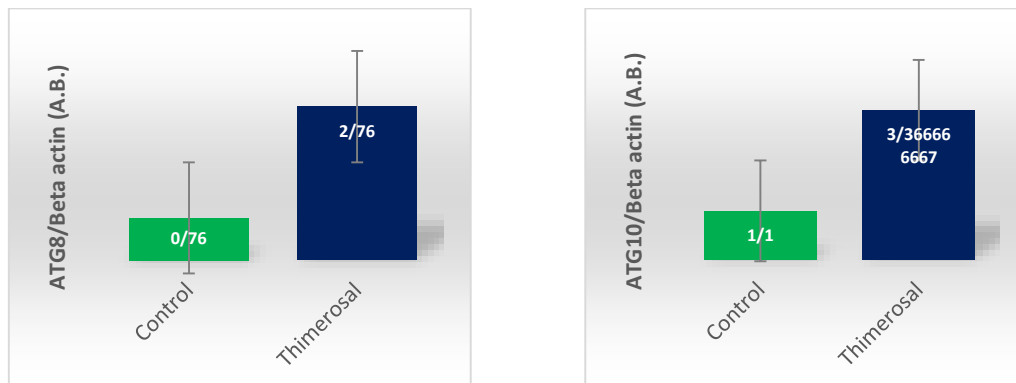
مطالعات نشان دادند که میزان بیان پروتئین بتا-اکتین در سلول ثابت است (۲۱). بنابراین از آنتی‌بادی پروتئین بتا-اکتین نسبت به آنتی‌بادیهای مورد پژوهش، برای حذف خطای بارگذاری در چاهک‌ها استفاده شد.

۱٫۵ برابر بود و بیان ژن ATG10 در گروه سوم نسبت به گروه کنترل، ۲ برابر بود.

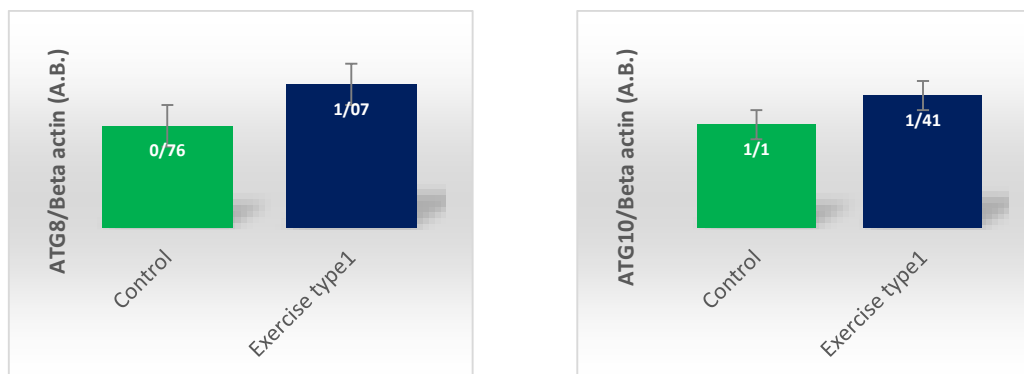
پروتکل اول ورزشی بودند، نشان دادند (شکل ۳). به طوری که، بیان ژن ATG8، در گروه هفتم نسبت به گروه کنترل،



شکل ۱- مقایسه نتایج وسترن بلات بیان ژن ATG10 و ATG8 بین گروهها و کنترل

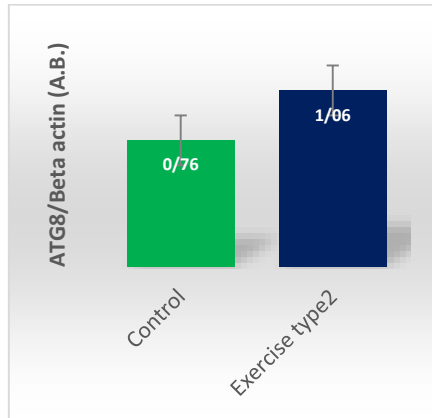


شکل ۲- مقایسه بیان ژن ATG10 و ATG8 بین گروههای کنترل و تیمروزال



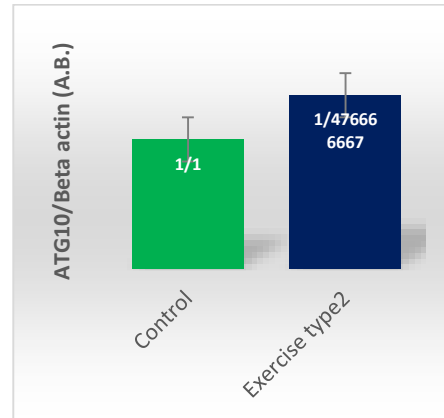
شکل ۳- مقایسه بیان ژن ATG10 و ATG8 بین گروههای کنترل و پروتکل اول ورزشی

اساس یافته‌ها، بیان ژن ATG8، در گروه هفتم نسبت به گروه کنترل، ۱,۵ برابر بود و بیان ژن ATG10 در گروه پنجم نسبت به گروه کنترل، ۲ برابر بود (شکل ۴).

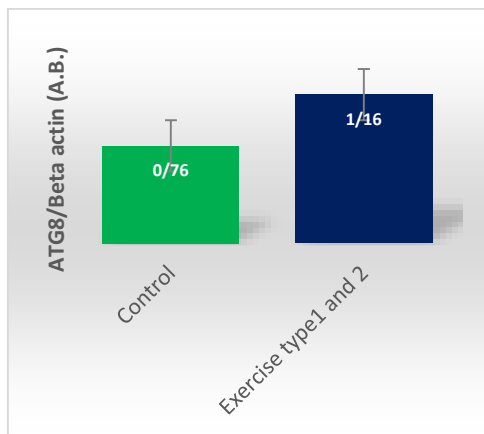


شکل ۴- مقایسه بیان ژن ATG8 و ATG10 بین گروههای کنترل و پروتکل دوم ورزشی

تاثیر پروتکل دوم ورزشی در بیان ژن ATG8 و ATG10: همچنین بین گروه کنترل و گروه پنجم (پروتکل دوم ورزشی) که از روز ۸۰-۵۱ تحت پروتکل دوم ورزشی بودند، تفاوت آماری معنی داری ( $P < 0.05$ ) مشاهده شد. بر

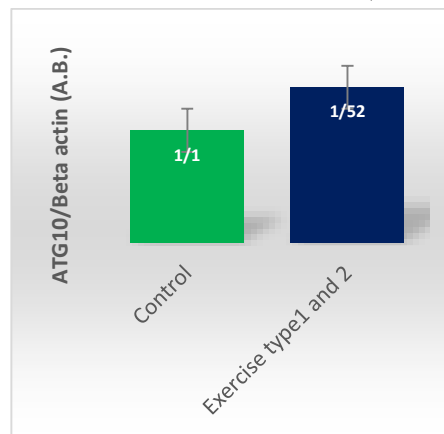


داری ( $P < 0.05$ ) دیده شد. بر اساس نتایج ارائه شده، بیان ژن ATG8، در گروه هفتم نسبت به گروه کنترل، ۱,۵ برابر بود و بیان ژن ATG10 در گروه هفتم نسبت به گروه کنترل، ۲ برابر بود (شکل ۵).



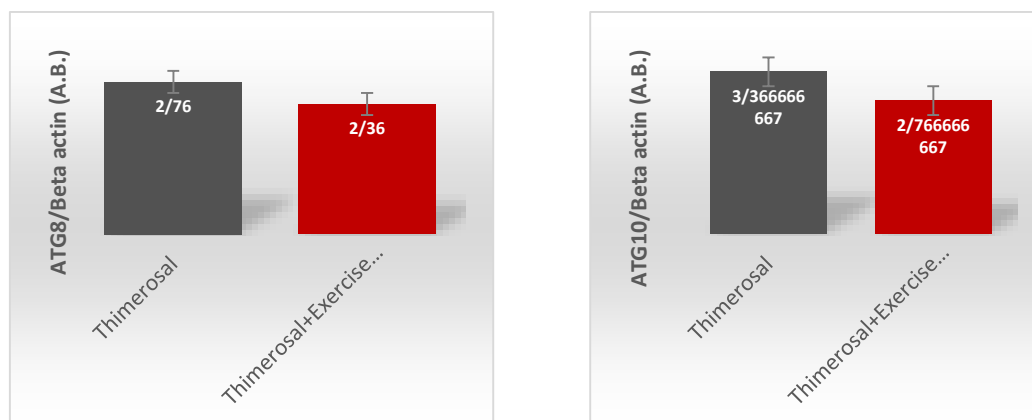
شکل ۵- مقایسه بیان ژن ATG8 و ATG10 بین گروههای کنترل و پروتکل اول ورزشی + پروتکل دوم ورزشی

تاثیر پروتکل اول ورزشی + پروتکل دوم ورزشی بر بیان ژن ATG8 و ATG10: در بین گروه کنترل و گروه هفتم (پروتکل اول ورزشی + پروتکل دوم ورزشی) که از روز ۵۰-۲۱ تحت پروتکل اول ورزشی و از روز ۸۰-۵۱ تحت پروتکل دوم ورزشی بودند، تفاوت آماری معنی



۵۰-۲۱ تحت پروتکل اول ورزشی بودند، تفاوت آماری معنی داری ( $P < 0.001$ ) مشاهده شد. به عبارتی در گروه چهارم نسبت به گروه دوم، بیان ژن ATG8، ۲۸,۵۷ درصد کاهش بیان ژن دیده شد و در گروه چهارم نسبت به گروه دوم، بیان ژن ATG10، ۲۰ درصد کاهش پیدا کرد (شکل ۶).

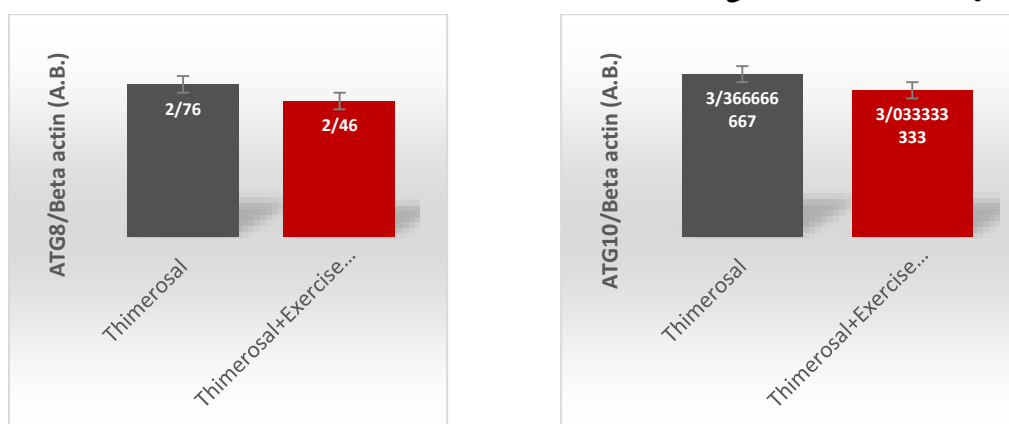
تاثیر پروتکل اول ورزشی بر بیان ژن ATG8 و ATG10 در موشهای دریافت کننده تیمروزال: بین گروه دوم که از روز ۸۰-۲۱ هیچ گونه تحرکی نداشتند و گروه چهارم (پروتکل اول ورزشی + تیمروزال) یعنی موشهایی که تحت تزریق (۳۰۰ میکروگرم تیمروزال) بودند و از روز



شکل ۶- مقایسه بیان ژن ATG8 و ATG10 بین گروه‌های تیمروزال و پروتکل اول ورزشی

را نشان می‌دهد. به طوری که کاهش بیان، در گروه ششم نسبت به گروه دوم، برای ATG8، ۱۴٫۲۸ درصد و برای ATG10، ۲۰ درصد، بوده است (شکل ۷).

تاثیر پروتکل دوم ورزشی بر بیان ژن ATG8 و ATG10 در موش‌های دریافت‌کننده تیمروزال: نتایج مشاهده شده بین گروه دوم (تیمروزال) و گروه ششم (پروتکل دوم ورزشی + تیمروزال) تفاوت آماری معنی‌داری ( $P < 0.001$ )



شکل ۷- مقایسه بیان ژن ATG8 و ATG10 بین گروه‌های تیمروزال و پروتکل دوم ورزشی

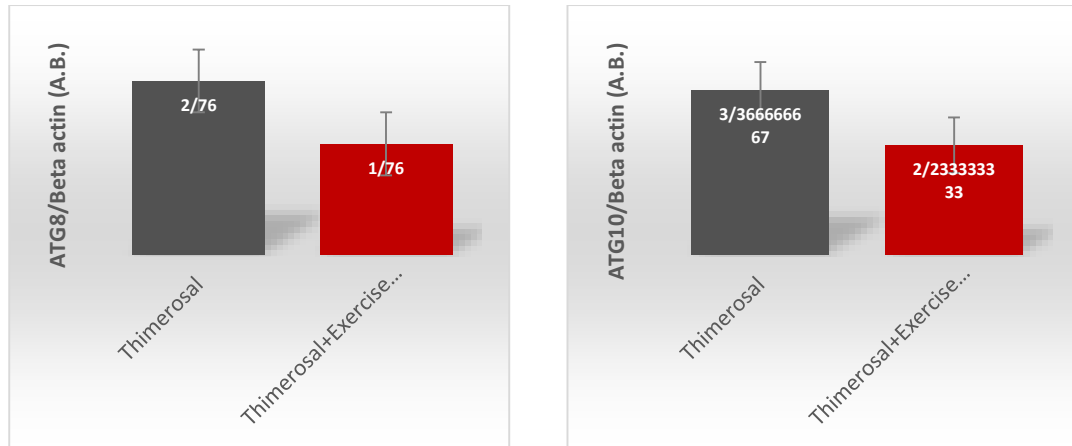
### بحث

اختلال طیف اوتیسم (ASD)، حداقل با تأخیر یا کارکرد ناهنجار در یکی از حوزه‌های تعامل اجتماعی، زبان ارتباطات اجتماعی و بازی تخیلی، ظهور می‌یابد. کودک مبتلا به اختلال طیف اوتیسم در دنیای خود زندگی می‌کند و از آنجا که برقراری ارتباطات مناسب اجتماعی نیازمند دریافت و پردازش صحیح اطلاعات حسی و اتخاذ رفتار مقتضی، مبتنی بر این اطلاعات است، در این دنیای درونی شده، ارتباط وی با دنیای بیرون قطع می‌شود و به دلیل نقصان دریافت و ادراک محرکات حسی خارجی،

تاثیر پروتکل اول ورزشی + پروتکل دوم ورزشی بر بیان ژن ATG8 و ATG10 در موش‌های تیمروزال دریافت کرده: بین گروه دوم و گروه هشتم (پروتکل اول ورزشی + پروتکل دوم ورزشی + تیمروزال) یعنی موش‌هایی که از روز ۲۱-۵۰ تحت پروتکل اول ورزشی و از روز ۵۱-۸۰ تحت پروتکل دوم ورزشی بودند، تفاوت آماری معنی‌داری ( $P < 0.0001$ ) دیده شد. نتایج نشان دادند که در گروه هشتم نسبت به گروه دوم، بیان ژن ATG8، ۵۷٫۱۴٪ و بیان ژن ATG10، ۴۰٪، کاهش پیدا کرد (شکل ۸).

تیمروزال که یک ماده محافظت‌کننده از واکسنها و حاوی جیوه است، وجود دارد.

فرآیند یادگیری و ارتباطات مناسب اجتماعی وی را مختل می‌کند. پژوهشگران دریافته‌اند، ارتباطی بین اوتیسم و



شکل ۸- تأثیر پروتکل اول ورزشی + پروتکل دوم ورزشی بر بیان ژن ATG10 و ATG8 در موشهای دریافت‌کننده تیمروزال

ثابت شده است (۲ و ۲۰). اتیل مرکوری نسبت به متیل مرکوری سریع‌تر به جیوه معدنی متابولیزه می‌شود و این تفاوت در متابولیسم ممکن است منجر به آسیب کلیوی ناشی از مقادیر سمی باشد. همچنین درحالی که افزایش استرس اکسیداتیو و القای آپوپتوز مشاهده شده *in vitro* با دُزهای بالا (مثل ۴۰۵  $\mu\text{g/L}$  تا ۱۰۱  $\text{mg/L}$ ) از تیمروزال ممکن است اثرات نوروٹوکسیک آن را توضیح دهد، اثرات اتیل مرکوری دُز کم به طور کامل تعریف نمی‌شود (۹).

براساس این مطالعات، بسیاری از علائم بالینی ناشی از مسمومیت با جیوه مثل اختلال در روابط اجتماعی، افسردگی، اضطراب، تماس چشمی محدود، از دست دادن توانایی‌های گفتاری، مشکلات حسی و حرکتی و نقایص بارز شناختی و رفتارهای تکراری و کلیشه‌ای با علائم اختلال طیف اوتیستیک مشترک است و در عین حال مشابهت‌های بیوشیمیایی سیستم ایمنی و نوروشیمیایی بسیاری نیز وجود دارد. از آن زمان روز به روز شواهد گسترده‌ای از ارتباط ما بین اوتیسم و جیوه آشکار گردیده است. با وجود مکانیسم‌های پیچیده پاتوفیزیولوژیک اختلالات عصبی اوتیسم، ارتباط آن با اتوفازی نیز اثبات شده است. درک مسیر مولکولی اتوفازی با شناسایی چندین

در مطالعه‌ای بر روی تمام کودکان واکسینه شده که برای حفاظت واکسنها از تیمروزال یا اتیل مرکوری استفاده شده بود، مشاهده شد، کودکانی که تا سن ۱۰ ماهگی با ۲۵۰ میلی‌گرم تیمروزال و تا ۱۵ ماهگی ۴۵۰ میلی‌گرم تیمروزال تماس داشتند، میزان شیوع اوتیسم در بالاترین میزان خود قرار داشت. همچنین، برنارد و همکارانش مشابهت‌هایی بین علائم اوتیسم و مواجهه با جیوه را گزارش نمودند و تغییرات مغزی مشترک بین این دو اختلال را شرح دادند (۶).

گزارش وسیعی از استفاده ایمن و مؤثر تیمروزال در جلوگیری از آلودگی قارچی و باکتریایی واکسنها منتشر شده است، همچنین مشخص شده است که تیمروزال به اتیل مرکوری و thiosalicylate متابولیزه می‌شود (۲۲). اما پیشنهاد شده است که تماس زیاد با اتیل مرکوری به دلیل تعداد افزایش یافته ایمونیزاسیون توصیه شده در سه سال زندگی ممکن است موجب افزایش شیوع اوتیسم گردد. واکسن حاوی تیمروزال (TCV) یکی از منابع اصلی تماس جیوه برای جمعیت عمومی است (۸ و ۹). وقایع نوروٹوکسیک متعاقب تماس انسانها با متیل مرکوری و تأثیر آن بر تکامل مغز به خوبی در وقایع مسمومیت در مطالعات

است. چرا که در موش‌های نرمال این روند افزایشی است. در حالی که در موش‌های مواجهه با تیمروزال روند کاهش‌ی داشته است. علاوه بر این، در ژن ATG10 نیز، در پروتکل ۱ ورزشی، پروتکل ۲ ورزشی و پروتکل ۱ و ۲ ورزشی تغییر بوجود آورده و کاهش یافته که نشان دهنده اثر هر دو پروتکل ورزشی است. بنابراین ATG10 در موش سالم و مواجهه با تیمروزال متفاوت است. در واقع تیمروزال، بر روی پاسخی که پروتکل‌های مختلف ورزشی برجای می‌گذارد، اثرگذار است. چرا که در موش‌های نرمال این روند افزایشی است. در حالی که در موش‌های مواجهه با تیمروزال روند کاهش‌ی داشته است.

مقدار ATG8 سطح اتوفاژی را با تعدیل اتوفاگوزوم‌ها تنظیم می‌کند، گرچه بر تعداد اتوفاگوزوم‌ها بی‌تاثیر است. علاوه بر این، ATG8 که شبیه یوبیکویتین است، در تشکیل اتوفاگوزوم نقش مهمی دارد (۴۰). ATG8 تازه سنتز شده بوسیله سیستمین پروتازا، ATG4 جهت نمایش کربوکسیل ترمینال گلايسين، پردازش می‌شود. سپس توسط آنزیم فعال شده E1-like (ATG7) و آنزیم کنژوگه شده E2-like (ATG3) به فسفاتیدیل اتانول آمین کنژوگه می‌شود. ATG8 کنژوگه شده می‌تواند توسط ATG4 دکنژوگه گردد (۱۸). یک مجتمع پروتئینی تشکیل شده از ATG5، ATG12، و ATG16 کنژوگاسیون ATG8 را با خدمت به عنوان آنزیم E3-like تسهیل می‌کند (۴۲). در مطالعه حاضر، تیمروزال موجب افزایش بیان ATG8 و متعاقباً اتوفاژی شد. به طوری که در موش‌هایی که تیمروزال دریافت کردند نسبت به گروه کنترل، افزایش بیان ۵ برابری ATG8 مشاهده شد (۴۷ و ۴۸).

انقباض عضلات ناشی از ورزش می‌تواند یک استرس پراثری ایجاد کند که منجر به تغییر در پیام‌رسان‌های مولکولی مانند کلسیم، AMP، NAD<sup>+</sup> و ROS (گونه‌های اسیژن فعال) شود. این پیام‌رسانها سپس، آبشار پایین دست سیگنالینگ را فعال می‌کنند که منجر به پاسخ

ژن (ATG) از مخمر تا پستانداران حاصل شده است. اتوفاژی به چندین مرحله اساسی برای تخریب لیزوزوم نیاز دارد که شامل القا، تشکیل غشای ایزوله، ایجاد اتوفاگوزوم و بلوغ اتوفاگوزوم می‌باشد. چندین ATG در هر مرحله از اتوفاژی نقش دارند و جهش در این ژنها در چندین بیماری انسانی یافت شده است (۳۷). جهت تشکیل اتوفاگوزوم، دو سیستم کنژوگه شبیه یوبیکویتین: ATG12-ATG5-ATG16L1 (ATG12، ATG7، ATG10، ATG5 و ATG16L1) و LC3-PE (زنجیره سنگین مربوط به میکروتوبول ۳- فسفاتیدیل اتانول آمین؛ مجموعه LC3، ATG3، ATG7، and ATG4) درگیر می‌شود. به عبارت دیگر، مجموعه ATG12-ATG5 در گسترش غشای فاگوفور جهت ایجاد اتوفاگوزوم از طریق تعامل با سایر پروتئین‌های PI3P همکاری می‌کند (۴۶، ۴۳، ۳۰).

از طرف دیگر، Atg7 و Atg10 به پروتئین‌های شبه E1 و E2 که میانجی‌گر اتصال Atg8 به فسفاتیدیل اتانول آمین می‌باشند، مرتبط هستند. هر دو Atg12-Atg5 و Atg8 تشکیل اتوفاگوزوم را مهیا می‌کنند. کنژوگه Atg12-Atg5 لیبیدسازی را تسهیل می‌کند و شکل‌گیری زیرسلولی آن را هدایت می‌کند. Atg8-فسفاتیدیل آمین احتمالاً پروتئین داریستی است که گسترش غشاء را پشتیبانی می‌کند و مقدار حاضر به ساینز اتوفاگوزوم مرتبط است (۱۶، ۳۴).

در تحقیق حاضر، نتایج بیان ATG8 و ATG10 در موش‌هایی که تیمروزال دریافت کرده بودند، نشان داد که میزان بیان پروتئین ATG8 و ATG10 نسبت به گروه کنترل، افزایش معناداری پیدا کرده است.

در مطالعه حاضر، ژن ATG8 در پروتکل ۱ ورزشی، پروتکل ۲ ورزشی و پروتکل ۱ و ۲ ورزشی تغییر به وجود آورده و کاهش یافته که نشان دهنده اثر هر دو پروتکل ورزشی است. بنابراین ATG8 در موش سالم و مواجهه با تیمروزال متفاوت است. در واقع تیمروزال، بر روی پاسخی که پروتکل‌های مختلف ورزشی برجای می‌گذارد، اثرگذار

سودمند بودن درمان‌های دیگر، مانند: ورزش، بازی، و حرکات بدنی است که باعث بهبود نشانه‌ها، رفتارها و بالا بردن کیفیت زندگی افراد مبتلا به اوتیسم می‌شود. ورزش علاوه بر کاهش وزن و تناسب اندام، عملکرد حرکتی افراد مبتلا به اوتیسم را افزایش می‌دهد. ورزش‌هایی مانند ژیمناستیک و ایروبیک، سبب کاهش رفتارهای منفی و خودانگیخته شایع در مبتلایان به اوتیسم می‌شود. ورزش‌هایی مانند، شنا و ورزش‌های آبی یا دویدن در صورت تداوم و تکرار می‌توانند توجه مبتلایان به اوتیسم را از رفتارهای تکراری یا خودانگیخته منحرف کند. ورزش همچنین باعث کاهش رفتارهای پرخاشگرانه و خودزنی و افزایش میزان توجه و کاهش رفتارهای کلیشه‌ای می‌شود (۱۲).

با توجه به اینکه اغلب فعالیت‌های ورزشی کودکان به صورت بازی‌های تفریحی و فعالیت‌های بدون ساختار و غیررسمی شکل گرفته است. این امکان وجود دارد که کودکان اوتیسمی با افزایش سن امکان حضورشان در زمین‌های بازی کمتر شود، برنامه‌های ورزشی و فعالیت‌های جسمانی، پیچیده و رقابتی شده و نیازمند مهارت‌های جسمانی پیچیده تری شوند و با افزایش سن بیشتر در معرض چاقی و خطرهای ناشی از آن قرار گیرند (۳۱). از طرفی ورزش می‌تواند، در تعاملات اجتماعی افراد مبتلا به اوتیسم نیز سودمند باشد.

نتایج پژوهش‌ها، نشان می‌دهد تمرین بدنی نه تنها باعث بهبود وضعیت جسمی می‌شود بلکه رفتارهای ناسازگارانه اوتیسم را نیز کاهش می‌دهد. کودکان اوتیستیک نسبت به کودکان معمولی در عین اینکه فعالیت کمتری دارند، بیشتر هم در معرض خطر هستند چراکه شیوه زندگی بی‌حرکتی دارند که خطرات ناشی از بیماری‌های قلبی، دیابت و چاقی را در آنها افزایش می‌دهد. از آنجا که ثابت شده ورزش در جمعیت عادی وسیله‌ای موثر برای جلوگیری از این مشکلات است، این احتمال وجود دارد که در جمعیت

اتوفاژی دوفازی با هدف بازگرداندن هموستازی می‌گردند (۲۷). همچنین تمرین ورزشی می‌تواند متابولیسم پروتئین‌ها، گلوکز و اسیدهای چرب را تسریع کند، باعث بهبود بیوزن میتوکندری و ترویج آنژیوژنز شود و پیری ماهیچه‌های اسکلتی را به تأخیر بیندازد. این اثرات ممکن است مربوط به اتوفاژی ناشی از تمرینات ورزشی باشد. در مطالعه حاضر ورزش پروتکل ۱ باعث کاهش بیان ژنهای ATG8 و ATG10 شده، و علاوه بر این، پروتکل ۲ ورزشی نیز باعث کاهش بیان ژنهای ATG8 و ATG10 شد. از طرفی این دو پروتکل ۱ و ۲ ورزشی با اثر سینرژیستی باعث کاهش بیش از حد ژنهای مربوط به اتوفاژی ATG8 و ATG10 گردیدند.

در مطالعه‌ای توسط Brandt و همکارانش در ۲۰۱۸، گزارش شده که ارتفاعات بالا ممکن است باعث ایجاد اتوفاژی و میتوفاژی شود تا بتواند کیفیت عضلات اسکلتی را حفظ کرده و میتوکندری‌های ناکارآمد را از بین ببرد، در نتیجه حفظ راندمان بالای متابولیسم انرژی برای پاسخگویی به تقاضای بیشتر انرژی است (۷). اگرچه، در مطالعه‌ای دیگر که در سال ۲۰۱۲ انجام شد، Kim و همکارانش به بررسی اثر تمرین ورزشی بر روی اتوفاژی پرداختند و بیان پروتئین‌های مرتبط به اتوفاژی شامل پروتئین مربوط به میکروتوبول زنجیره سبک 1b (LC3)، Atg7، Beclin-1، کنژوگیشن از ATG12 تا ATG5، پروتئین غشایی مربوط به لیزوزوم (LAMP2a) بعد از تمرین تردمیل را بررسی کردند. آنها شاهد کاهش معنادار پروتئین‌های مربوط به اتوفاژی ذکر شده نسبت به گروه شاهد (موش‌هایی که تمرین تردمیل نداشتند) بودند (۲۸). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است نوع و شدت تمرینات ورزشی بر اثرات اتوفاژی موثر باشد.

اگرچه رفتار درمانی باعث به وجود آمدن تغییرات معنی داری در کودکان مبتلا به اوتیسم می‌شود، اما پژوهش‌های جدید و تجربیات برخی والدین نشان دهنده فوایدی دال بر

بدنی متوسط و شدید هر دو عامل روانشناختی و فیزیولوژیک را در کودکان دارای اوتیسم بهبود داده اند (۲۶).

همچنین نشان داده است که فعالیت ورزشی بر نتایج فکری و اجتماعی، عزت نفس و خوشبختی تاثیر مثبت دارد. به طور خاص ورزش هوازی در افراد دارای اوتیسم، شاخصهای BMI را کاهش داده و ترکیب بدن را به طور کلی بهبود می بخشد و همچنین رفتارهای آسیب رساننده به خود، رفتار پرخاشگرانه و رفتارهای غیرمخرب و ناخوشایند را کاهش می دهد (۱).

### نتیجه‌گیری

در گروه‌های سالم، پروتکل ۱ ورزشی، پروتکل ۲ ورزشی و پروتکل ۱+۲ ورزشی، افزایش بیان هر دو ژن ATG8 و ATG10 مشاهده شد. در صورتی که موشهای دریافت کننده تیمروزال، پروتکل ۱ ورزشی، پروتکل ۲ ورزشی و پروتکل ۱+۲ ورزشی، کاهش بیان ژنهای ATG8 و ATG10 را نشان دادند.

اوتیسم نیز موثر باشد. تحقیقات نشان می‌دهد تمرین فیزیکی باعث بهبود مهارت‌های اجتماعی، ارتباطی و حرکتی، کاهش رفتارهای کلیشه‌ای کودکان اوتیسم و رفتارهای خودتحریکی آنها می‌شود. در مجموع آنچه روشن است، فعالیت‌های ورزشی یکی از موثرترین راهها برای غلبه بر ناتوانی است (۱۳).

فواید فعالیت‌های فیزیکی برای اکثر کودکان مبتلا به اوتیسم عبارت اند از:

کم شدن رفتارهای تکراری، عملکرد مثبت اجتماعی، افزایش تمرکز و کاهش خطر ابتلا به چاقی و بیماریهای قلبی در بزرگسالی.

به طور کلی میزان فعالیت بدنی در این جمعیت پایین تر است و آنها را در معرض چاقی قرار می دهد و همچنین اختلالات حرکتی ممکن است افراد را از شرکت در فعالیت‌های بدنی منع کند. انجام فعالیت بدنی منظم، وضعیت جسمانی افراد دارای اوتیسم را بهبود می بخشد و همچنین نقص الگوهای رفتاری را کاهش داده است. به طور ویژه، مطالعات انجام شده، نشان داده است، مشارکت در فعالیت

### منابع

- Allison, D. B., V. C. Basile, R. J. J. o. a. Bruce MacDonald and d. disorders (1991). "Brief report: Comparative effects of antecedent exercise and lorazepam on the aggressive behavior of an autistic man." **21**(1): 89-94.
- Amin-Zaki, L., M. A. Majeed, S. B. Elhassani, T. W. Clarkson, M. R. Greenwood and R. A. J. A. J. o.D. o. C. Doherty (1979). "Prenatal methylmercury poisoning: clinical observations over five years." **133**(2): 172-177.
- Azam Khalaj, Ramesh Ahmadi (2016). "The effect of treadmill exercise on catalepsy from reserpine-induced Parkinson model in diabetic male rat"
- Ball, L. K., R. Ball and R. D. J. P. Pratt (2001). "An assessment of thimerosal use in childhood vaccines." **107**(5): 1147-1154.
- Berkel, S., C. R. Marshall, B. Weiss, J. Howe, R. Roeth, U. Moog, V. Endris, W. Roberts, P. Sztamari and D. J. N. g. Pinto (2010). "Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation." **42**(6): 489.
- Bernard, S., A. Enayati, T. Binstock, H. Roger, L. Redwood and W. J. A. R. McGinnis, Available from the Autism Research Institute (2000). "Autism: A unique type of mercury poisoning."
- Brandt, N., T. P. Gunnarsson, J. Bangsbo and H. J. P. r. Pilegaard (2018). "Exercise and exercise training-induced increase in autophagy markers in human skeletal muscle." **6**(7): e13651.
- Clarkson, T. W., L. Magos and G. J. J. N. E. J. o. M. Myers (2003). "The toxicology of mercury—current exposures and clinical manifestations." **349**(18): 1731-1737.
- Clifton II, J. C. J. P. c. o. n. a. (2007). "Mercury exposure and public health." **54**(2): 237. e231-237. e245.
- Control, C. f. D. and Prevention (1999). "Thimerosal in vaccines: a joint statement of the

- American Academy of Pediatrics and the Public Health Service." **48**(26): 563.
11. Dickerson, A. S., R. S. Rotem, M. A. Christian, V. T. Nguyen and A. J. J. C. e. h. r. Specht (2017). "Potential sex differences relative to autism spectrum disorder and metals." **4**(4): 405-414.
  12. Dodangeh, S., A. Daryani, M. Sharif, S. Gholami, E. Kialashaki, M. Moosazadeh, S. J. E. Sarvi and health (2019). "Freshwater snails as the intermediate host of trematodes in Iran: a systematic review." 41.
  13. Dodangeh, S., E. Kialashaki, A. Daryani, M. Sharif, S. Sarvi, Y. D. Moghaddam, S. A. J. J. o. w. Hosseini and health (2018). "Isolation and molecular identification of *Acanthamoeba* spp. From hot springs in Mazandaran province, northern Iran." **16**(5): 807-813.
  14. Durand, C. M., C. Betancur, T. M. Boeckers, J. Bockmann, P. Chaste, F. Fauchereau, G. Nygren, M. Rastam, I. C. Gillberg and H. J. N. g. Anckarsäter (2007). "Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders." **39**(1): 25.
  15. ERSHAD, S. R., R. H. HASHEMI and M. H. ABDOLLAHI (2018). "Comparing parental stress, parenting styles, and social problem solving in mothers of children with autism spectrum disorder, ADHD, and typically developing children."
  16. Geier, D. A., J. K. Kern and M. R. J. M. Geier (2012). "A prospective cross-sectional cohort assessment of health, physical, and behavioral problems in autism spectrum disorders." **7**(3):193.
  17. Geng, J. and D. J. J. E. r. Klionsky (2008). "The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy." **9**(9): 859-864.
  18. Grandjean, P., P. Weihe, R. F. White, F. Debes, S. Araki, K. Yokoyama, K. Murata, N. Sørensen, R. Dahl, P. J. J. N. Jørgensen and teratology (1997). "Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury." **19**(6): 417-428.
  19. Hanada, T., N. N. Noda, Y. Satomi, Y. Ichimura, Y. Fujioka, T. Takao, F. Inagaki and Y. J. J. o. B. C. Ohsumi (2007). "The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy." **282**(52): 37298-37302.
  20. Harada, M. J. C. r. i. t. (1995). "Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution." **25**(1): 1-24.
  21. HASANSHAHI, G. H., A. E. JAFARZADEH and D. A. James (2008). "Expression of stromal derived factor alpha (SDF-1 $\alpha$ ) by primary hepatocytes following isolation and heat shock stimulation."
  22. Health, U. D. o. and H. S. J. h. w. f. g. d. D. G. G. u. pdf (1996). "Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER)."
  23. Herbert, M. R. J. C. o. i. n. (2010). "Contributions of the environment and environmentally vulnerable physiology to autism spectrum disorders." **23**(2): 103-110.
  24. Hyman, S. E. (2011). Grouping diagnoses of mental disorders by their common risk factors, Am Psychiatric Assoc.
  25. Jafari, T., N. Rostampour, A. A. Fallah, A. J. J. o. T. E. i. M. Hesami and Biology (2017). "The association between mercury levels and autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis." **44**: 289-297.
  26. Jansen, L. M., C. C. Gispen-de Wied, V. M. Wiegant, H. G. Westenberg, B. E. Lahuis, H. J. J. o. a. Van Engeland and d. disorders (2006). "Autonomic and neuroendocrine responses to a psychosocial stressor in adults with autistic spectrum disorder." **36**(7): 891-899.
  27. Kaplan, H. I. and B. J. Sadock (1988). Synopsis of psychiatry: Behavioral sciences clinical psychiatry, Williams & Wilkins Co.
  28. Kim, Y. A., Y. S. Kim, W. J. J. o. p. Song and biochemistry (2012). "Autophagic response to a single bout of moderate exercise in murine skeletal muscle." **68**(2): 229-235.
  29. Lee, K.-M., S.-K. Hwang and J.-A. J. E. n. Lee (2013). "Neuronal autophagy and neurodevelopmental disorders." **22**(3): 133-142.
  30. Liu, B., Y. Cheng, Q. Liu, J.-k. Bao and J.-M. J. A. P. S. Yang (2010). "Autophagic pathways as new targets for cancer drug development." **31**(9): 1154.
  31. Matheson, B. E., J. M. J. R. J. o. A. Douglas and D. Disorders (2017). "Overweight and obesity in children with autism spectrum disorder (ASD): A critical review investigating the etiology, development, and maintenance of this relationship." **4**(2): 142-156.

32. Ni, J., S. Bi, W. Xu, C. Zhang, Y. Lu, L. Zhai and S. J. A. r. Hu (2016). "Improved immune response to an attenuated pseudorabies virus vaccine by ginseng stem-leaf saponins (GSLs) in combination with thimerosal (TS)." **132**: 92-98.
33. Nori, J., M. Seifnaraghi and H. J. E. E. Ashayeri (2010). "The effect of sensory integration intervention on improvement of gross motor and fine motor skills in children with cerebral palsy aged 8-12." 21-31.
34. Peng, T., X. Liu, et al. (2019). "Long noncoding RNA HAGLROS regulates apoptosis and autophagy in Parkinson's disease via regulating miR-100/ATG10 axis and PI3K/Akt/mTOR pathway activation." *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 47(1): 2764-2774.
35. Phillips, A. R., A. Suttangkakul and R. D. J. G. Vierstra (2008). "The ATG12-conjugating enzyme ATG10 is essential for autophagic vesicle formation in *Arabidopsis thaliana*." **178**(3): 1339-1353.
36. Rodriguez, J. I. and J. K. J. N. g. b. Kern (2011). "Evidence of microglial activation in autism and its possible role in brain underconnectivity." **7**(2-4): 205-213.
37. Rubinsztein, D. C., P. Codogno and B. J. N. r. D. d. Levine (2012). "Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases." **11**(9): 709.
38. Shahrastefanghar, A., E. Arabameri, A. Daneshfar, A. Ghasemi, A. J. J. o. H. Kashi and Care (2019). "The Effect of Aerobic Exercise on Motor Skills and Body Composition of Children with Autism." **20**(4): 332-341.
39. Soratchi, H., A. Sazmand, A. Karbalaii Nori and H. J. R. Jadidy (2006). "The effect of sensory integration in gross & fine motor skills children 5-7 years with down syndrom." **9**(2): 35-40.
40. Suzuki, K., Y. Kubota, T. Sekito and Y. J. G. t. C. Ohsumi (2007). "Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization." **12**(2): 209-218.
41. Van Naarden Braun, K., L. Schieve, J. Daniels, M. Durkin, E. Giarelli, R. S. Kirby, L. C. Lee, C. Newschaffer, J. Nicholas and J. J. A. R. Pinto-Martin (2008). "Relationships between multiple births and autism spectrum disorders, cerebral palsy, and intellectual disabilities: autism and developmental disabilities monitoring (ADDM) network—2002 surveillance year." **1**(5): 266-274.
42. Wesch, N., V. Kirkin, et al. (2020). "Atg8-Family Proteins-Structural Features and Molecular Interactions in Autophagy and Beyond." *Cells* 9(9).
43. Wesch, Kirkin et al. (2020)
44. Xie, Z., U. Nair and D. J. J. M. b. o. t. c. Klionsky (2008). "Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation." **19**(8): 3290-3298.
45. Zahra Namvarpour, Abdollah Amini, Reza Masteri Farahani, Mohammad Nasehi (2019). "Effects of Thimerosal on Cerebellum Tissue and Neurodevelopmental Disorders Related Behaviors in Rats"
46. Zhang, H., X. Kong, J. Kang, J. Su, Y. Li, J. Zhong and L. J. T. S. Sun (2009). "Oxidative stress induces parallel autophagy and mitochondria dysfunction in human glioma U251 cells." **110**(2): 376-388.
47. Abbasi, N., H. Fahimi, S. H. Jamaledini, R. Ramezani, S. J. C. Babashah and M. Research (2021). "Assessment of the expression of long noncoding RNA RMST following induction of neuronal differentiation of NT2 pluripotent embryonic carcinoma cells."
48. Mehdi Zadeh Fanid, L., M. Adampourzare, H. J. C. Shahrokhi and M. Researches (2018). "Association of two common single nucleotide polymorphisms of Reelin gene, Intron 59 (C/T) and exon 22 (C/G), with autism spectrum disorder in a Population Sample of Children of Iranian-Azeri." **31**(1): 76-81.

## Evaluation of the effect of medium-term exercise on the response induced by thymrozal in the autophagy of the prefrontal part of male wistar rats

Sosani rad M.<sup>1</sup>, Navaian M.<sup>1</sup> and Nasehi M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Biology, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahre Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, I. R. of Iran.

<sup>2</sup> Cognitive and Neuroscience Research Center (CNRC), Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, I. R. of Iran.

### Abstract

In people with autism, communication, social interaction, and imaginative games have been particularly damaged. Thiomersal, commonly called mertiolate, is an organo-mercury compound that has antifungal and antiseptic properties. In recent years, the relationship between the likelihood of autism caused by thiomersal vaccines has been significantly raised by the media. The present study examined dose-dependent behavioral changes after early exposure to thiomersal in a timed pattern of vaccination of children in male rats. Newborn mice were injected with 300 micrograms of thiomersal on days 7, 9, 11, and 15. From day 31 to day 80 After birth different exercise protocols 1 and 2 were applied. Immediately, after the respective protocols, in less than 30 seconds, the brain was removed from the skull and the brain prefrontal was rapidly exited. Finally, genes expression of ATG8 and ATG10 in the prefrontal l region were evaluated by Western blotting technique. The results showed that the mice of receiving the thiomersal and did exercise protocols, especially the mice that did the 1 and 2 exercise protocol, had significantly lower ATG8 and ATG10 gene expression than the control group. Therefore, given that ATG8 and ATG10 are major factors in autophagy and are involved in many other molecular pathways such as neuronal signaling and neurotransmission, it can be concluded that mid-term exercise is effective in removing the adverse effects of thiomersal on the expression of autophagy genes.

**Keywords:** Thiomersal, Autism, Prefrontal, ATG8 and ATG10