

اثر پرکاری تیروئید شدید بر غلظت آنزیم‌های تولیدکننده اکسید

نیتریک در کبد موش‌های صحرایی نر

دکتر نصیبیه یوسف زاده، دکتر سجاد جدی، دکتر اصغر قاسمی

مرکز تحقیقات فیزیولوژی غدد درون‌ریز، پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول: تهران، ولنجک، خ. یمن، ابتدای خیابان شهید اعرابی، پلاک ۲۴، پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دکتر اصغر قاسمی؛ e-mail: Ghasemi@endocrine.ac.ir

چکیده

مقدمه: هورمون‌های تیروئیدی نقش مهمی در عملکرد طبیعی کبد ایفا می‌کنند و پرکاری تیروئید منجر به اختلال عملکرد کبد می‌گردد. هورمون‌های تیروئیدی بر آنزیم‌های تولیدکننده اکسید نیتریک (**Nitric oxide, NO**) در بافت کبد تأثیر می‌گذارند. هدف از این مطالعه، تعیین آثار پرکاری تیروئید بر غلظت آنزیم‌های تولیدکننده اکسید نیتریک (**NO synthase, NOS**) شامل **NOS** عصبی (**iNOS**)، **NOS** اندوتلیال (**eNOS**) و **NOS** قابل القاء (**nNOS**) در کبد موش صحرایی نر می‌باشد. مواد و روش‌ها: ۱۲ سر موش صحرایی نر به دو گروه شاهد و پرکار تیروئید تقسیم شدند. پرکاری تیروئید با اضافه کردن ۱۲ میلی‌گرم در لیتر لووتیروکسین به مدت ۲۱ روز در آب آشامیدنی القا شد. غلظت متابولیت‌های اکسید نیتریک (نیترات+نیتریت **NOx**) در سرم و بافت کبد و همچنین غلظت پروتئین آنزیم‌های **iNOS**, **nNOS** و **eNOS** در کبد در انتهای مطالعه اندازه‌گیری شد. یافته‌ها: در گروه پرکار تیروئید، غلظت سرمی تیروکسین تمام و آزاد بالاتر و غلظت هورمون محرك تیروئیدی پایین‌تر از گروه شاهد بود. غلظت سرمی و کبدی **NOx** در گروه پرکار تیروئید به ترتیب ۴۶ و ۷۰ درصد بالاتر از گروه شاهد بود. پرکاری تیروئید سبب کاهش غلظت پروتئین **eNOS** (۳۱ درصد، $P=0.006$) و افزایش غلظت پروتئین **iNOS** (۲۶ درصد، $P=0.020$) در کبد شد، اما تأثیری بر غلظت پروتئین **nNOS** نداشت. نتیجه‌گیری: پرکاری تیروئید سبب تغییر بیان آنزیم‌های تولیدکننده اکسید نیتریک در کبد می‌شود. نقش عملکرد اکسید نیتریک ممکن است در پاتوفیزیولوژی پرکاری تیروئید دخالت داشته باشد.

واژگان کلیدی: پرکاری تیروئید، کبد، اکسید نیتریک سنتاز، موش صحرایی

دریافت مقاله: ۹۸/۹/۱۶ - دریافت اصلاحیه: ۹۸/۱۰/۲۲ - پذیرش مقاله: ۹۸/۱۰/۲۵

افزایش هورمون‌های تیروئیدی منجر به ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو در کبد می‌گردد که ناشی از افزایش متابولیسم و به هم خوردن تعادل بین عوامل اکسیدان و آنتی‌اکسیدان می‌باشد. این تغییرها می‌توانند منجر به تغییر برنامه‌ی ژنتیکی در بافت کبد و ایجاد بیماری‌های مختلف کبدی گردد.^۱ با این حال پاتوفیزیولوژی پرکاری تیروئیدی در بیماری کبدی به طور کامل شناخته نشده است.^{۷,۸}

اکسید نیتریک^v (**NO**) یک مولکول سیگنالینگ گازی شکل است که به طور عمده توسط آنزیم‌های اکسید نیتریک سنتاز (**NOS**)^{vi} شامل **NOS** عصبی^{vii} (**nNOS**), **NOS** قابل

مقدمه

پرکاری تیروئیدⁱ از شایع‌ترین (۸/۰ درصد در اروپا، ۱/۳ درصد در آمریکا و ۴/۲ درصد در ایران)^{۱,۲} اختلال‌های غده‌ی تیروئید است که عموماً با غلظت کم یا فقدان هورمون محرك تیروئیدⁱⁱ و مقادیر بالای تری یدوتیرونین آزادⁱⁱⁱ و تیروکسین آزاد^{iv} تشخیص داده می‌شود.^۲ این بیماری می‌تواند بر سیستم‌های قلبی عروقی، عصبی، دستگاه گوارش و کبد تأثیر گذاشته و منجر به اختلال عملکرد آن‌ها گردد.^۳ کبد یکی از مهم‌ترین اندام‌های هدف هورمون‌های تیروئیدی است.^۵

i -Hyperthyroidism

ii -Thyroid stimulating hormone

iii -Free-triiodothyronine

iv -Free-tetraiodothyronine

v -Nitric oxide

vi -Nitric oxide synthase

vii -Neuronal nitric oxide synthase

علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی نگه‌داری شدند. استانداردهای اخلاقی در مورد کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید؛ طرح این مطالعه توسط کمیته‌ی اخلاق پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تصویب شده است (کد اخلاق: IR.SBMU.EDOCRINE.REC.1396.398).

القای پرکاری تیروئید و تأیید آن

موسه‌ای صحرایی نر (۲-۳ ماهه در محدود وزنی ۲۲۰ الی ۲۲۴ گرم) به ۲ گروه شاهد و پرکار تیروئید تقسیم شدند (۶ سر در هر گروه) که به ترتیب آب آشامیدنی معمولی و آب آشامیدنی حاوی ۱۲ میلی‌گرم در لیتر لووتیروکسین به مدت ۲۱ روز دریافت کردند. در انتهای مطالعه، برای تأیید ایجاد مدل پرکاری تیروئید، میزان سرمی هورمون محرك تیروئید^{vii} با کیت الایزای مخصوص موش صحرایی^{vii} شرکت زلیبو، آلمانی) و همچنین فرم آزاد و تمام تیروکسین^{vi} به وسیله کیت‌های الایزا (شرکت پیشتراز طب، تهران، ایران) اندازه‌گیری شد. ضریب تغییر درون آزمونی برای هر سه اندازه‌گیری کمتر از ۶ درصد بود.

مراحل اجرای مطالعه

در روز صفر، موسه‌ای صحرایی به طور تصادفی به ۲ گروه شاهد و پرکار تیروئید تقسیم شدند و لووتیروکسین (۱۲ میلی‌گرم در لیتر) در گروه پرکاری تیروئید به مدت ۲۱ روز تجویز شد. در انتهای مطالعه، نمونه‌ی خون به منظور اندازه‌گیری میزان سرمی هورمون محرك تیروئید، فرم آزاد و تمام تیروکسین و همچنین NOx سرمی از حیوان‌ها گرفته شد. بافت کبد در روز ۲۱ بعد از بیهوشی کامل با کتامین و زایلازین (به ترتیب ۶۰ و ۱۰ میلی‌گرم با ازای هر کیلوگرم وزن بدن) جدا شد و برای اندازه‌گیری غلظت NOx و غلظت eNOS پروتین آنزیمه‌ای تولیدکننده NO شامل nNOS و eNOS به کار رفت.

اندازه‌گیری غلظت سرمی و کبدی NOx و غلظت

پروتین آنزیمه‌ای تولیدکننده NO در کبد

پس از ۱۴-۱۲ ساعت ناشتاپی، نمونه خون از موسه‌ای صحرایی گرفته و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. در انتهای مطالعه، نمونه‌های بافت کبد نیز از موسه‌ای صحرایی گرفته شد و سپس بافت‌ها به قطعات کوچک برش

القاءⁱ NOS اندوتلیالیⁱⁱ (eNOS) سنتز می‌گردد.^{۹,۱۰} و آثار فیزیولوژیک و پاتولوژیک مختلف در بسیاری از بافت‌ها از جمله کبد دارد.^{۱۱} NO در بافت کبد توسط هر ۳ آنزیم تولیدکننده NO سنتز می‌گردد.^{۱۲} هر ۳ آنزیم تولیدکننده NO به عنوان هدفی برای هورمون‌های تیروئیدی محسوب می‌شوند^{۱۴} و NO نیز نقش تنظیمی در عملکرد هورمون‌های تیروئیدی دارد.^{۱۵,۱۶}

افزایش هورمون‌های تیروئیدی سبب افزایش غلظت سرمی NOx در موسه‌ای صحرایی مبتلا به پرکاری تیروئید می‌گردد.^{۱۷} همچنین مصرف کوتاه‌مدت (۳ روز) هورمون تری‌یو‌تیرو‌نین باعث افزایش معنی‌دار و برگشت پذیر فعالیت آنزیم NOS توتال در هپاتوسیت‌ها و سلول کوپفر کبدی در موسه‌ای صحرایی می‌شود.^{۱۸} مطالعات نشان داده‌اند که آثار کوتاه‌مدت آن می‌باشد، به طوری که تیروئیدی مقاومت از اثرات بلندمدت آن می‌باشد، پرکاری تیروئیدی در کوتاه‌مدت سبب افزایش قدرت انقباضی قلب و مقاومت در برابر ایسکمی قلبی می‌گردد، ولی در طولانی‌مدت آثار منفی پرکاری تیروئیدی دیده می‌شود.^{۱۹,۲۰} همچنین ایزوفرم‌های مختلف NOS ممکن است پاسخ مقاومت به هورمون‌های تیروئیدی بدهند، به این صورت که عمدۀ تولید NO در شرایط فیزیولوژیک وابسته به آنزیم eNOS بوده ولی در شرایط پاتولوژیک وابسته به eNOS می‌باشد.^{۱۱-۱۳} تاکنون آثار طولانی‌مدت (۲۱ روز) پرکاری تیروئید شدید بر تغییر غلظت پروتین آنزیم‌های تولیدکننده NO در کبد گزارش نشده است. بنابراین با توجه به اینکه نقص عملکرد آنزیم‌های تولیدکننده NO ممکن است در پاتوفیزیولوژی پرکاری تیروئید دخالت داشته باشد، هدف این مطالعه بررسی آثار پرکاری تیروئید شدید بر غلظت NOx و آنزیم‌های NOS در بافت کبدی در موسه صحرایی نر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات

موسه‌ای صحرایی نر از نژاد ویستارⁱⁱⁱ در شرایط آزمایشگاهی (دماهی 22 ± 1 درجه‌ی سلسیوس و ۱۲ ساعت روشنایی- ۱۲ ساعت تاریکی) در حیوان‌خانه‌ی پژوهشکده‌ی

i- Inducible nitric oxide synthase

ii- Endothelial nitric oxide synthase

iii- Wistar

iv -Thyroid-stimulating hormone

v - Zellbio Co., Germany

vi -Free and total thyroxine

همبستگی اسپیرمن^{iv} استفاده شد. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

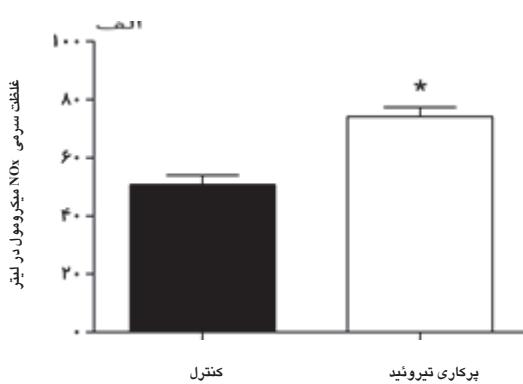
اثر پرکاری تیروئیدی بر میزان سرمی هورمون‌های تیروئیدی و هورمون محرك تیروئید
 اندازه‌گيري هورمون‌های تیروئيدی و هورمون محرك تیروئیدی نشان داد، كه تجوييز لووتريوكسين با دوز ۱۲ ميلى‌گرم در ليتر به مدت ۲۱ روز سبب پرکاری تیروئيد در موش‌های صحرائي نر شده است. همان‌طور كه در جدول ۱ نشان داده شده پرکاري تيروئيد در موش‌های صحرائي منجر به افزايش ميزان سرمي تيرووكسين تام و آزاد و کاهش هورمون محرك تيروئيد شد.

جدول ۱- اثر پرکاری تیروئید بر میزان سرمی هورمون‌های تیروئیدی و هورمون محرك تیروئید

مقدار P	پرکار تیروئید	شاهد	پارامتر
۰/۰۰۰۱	۱۰۱/۷۰±۵/۰۹	۵۴/۳۹±۲/۸۷	تريوكسين تام (ثانومول در ليتر)
۰/۰۰۰۱	۱۱۲/۷۰±۶/۲۷	۵۱/۶۹±۴/۰۴	تريوكسين آزاد (بيكمول در ليتر)
۰/۰۰۳۱	۲۰۰±۰/۳۱	۴/۸۶±۰/۶۶	هورمون محرك تيروئيد (مili واحد در مili ليتر)

يافته‌ها به صورت ميانگين ± انحراف استاندارد از ميانگين بيان شده‌اند. تعداد موش صحرائي در هر گروه ۶ سر می‌باشد.

اثر پرکاری تیروئید بر غلظت سرمی و کبدی NOx
 ميزان سرمي و کبدی NOx در گروه پرکاري تيروئيد به طور معنی‌داری از گروه شاهد بيشتر بود (نمودار ۱).

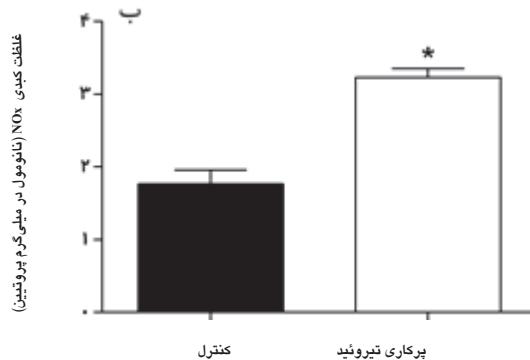


نمودار ۱- اثر پرکاري تيروئيد بر غلظت متابوليتهای اکسید نیتریک (NOx) در سرم (الف) و بافت کبد (ب). يافته‌ها به صورت ميانگين ± انحراف استاندارد از ميانگين بيان شده‌اند. * مقدار P کمتر از ۰/۰۵ در مقایسه با گروه شاهد. تعداد موش صحرائي در هر گروه ۶ سر می‌باشد.

داده شده و در بافر هموژن (فسفات بافر سالین PBSⁱ) مili مolar، pH = ۷/۴)، با نسبت وزنی-حجمی ۵ به ۱ با دستگاه هموژنایزر و سونیکاتور هموژن گردید. برای اندازه‌گيري NOx در سرم و هموژن کبد از روش رنگ‌سننجی گریسⁱⁱ با استفاده از کيت رنگ‌سننجی (شركت پژوهش کاو آفاق، تهران، ايران) استفاده شد. غلظت پروتئين nNOS و eNOSⁱⁱⁱ شامل NO^{iv} شرکت زليو، آلماني) اندازه‌گيري شد. همچنين غلظت پروتئين در نمونه‌ها با روش برادرفورد اندازه گرفته شد و غلظت آنزيم‌های تولیدکننده NO^v بر حسب واحد نانوگرم به ازاي هر ميلى‌گرم پروتئين در بافت گزارش گردید. ضرير تغييرات درون آزمونی برای آنزيم‌های nNOS و eNOS به ترتيب ۳/۴ و ۱/۴ درصد بود. همچنين ضرير تغييرات درون آزمونی برای آنزيم‌های nNOS و eNOS به ترتيب ۲/۲ و ۷/۵ درصد بود.

آناليز آماري

آناليز آماري داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۶ انجام شد. يافته‌های کمي به صورت ميانگين ± انحراف استاندارد از ميانگين بيان شده‌اند. برای مقایسه ميزان سرمي هورمون محرك تيروئيد، هورمون‌های تيروئيدی شامل تريوكسين آزاد و تام و همچنان غلظت سرمي و کبدی NOx و غلظت پروتئين آنزيم‌های تولیدکننده NO در کبد بين دو گروه مختلف از آناليز آزمون تی-مستقل^{vi} استفاده گردید. برای بررسی همبستگي بين غلظت کبدی NOx با غلظت سرمي NOx و آنزيم‌های nNOS، eNOS^{vii} در کبد از آزمون



i- Phosphate buffered saline

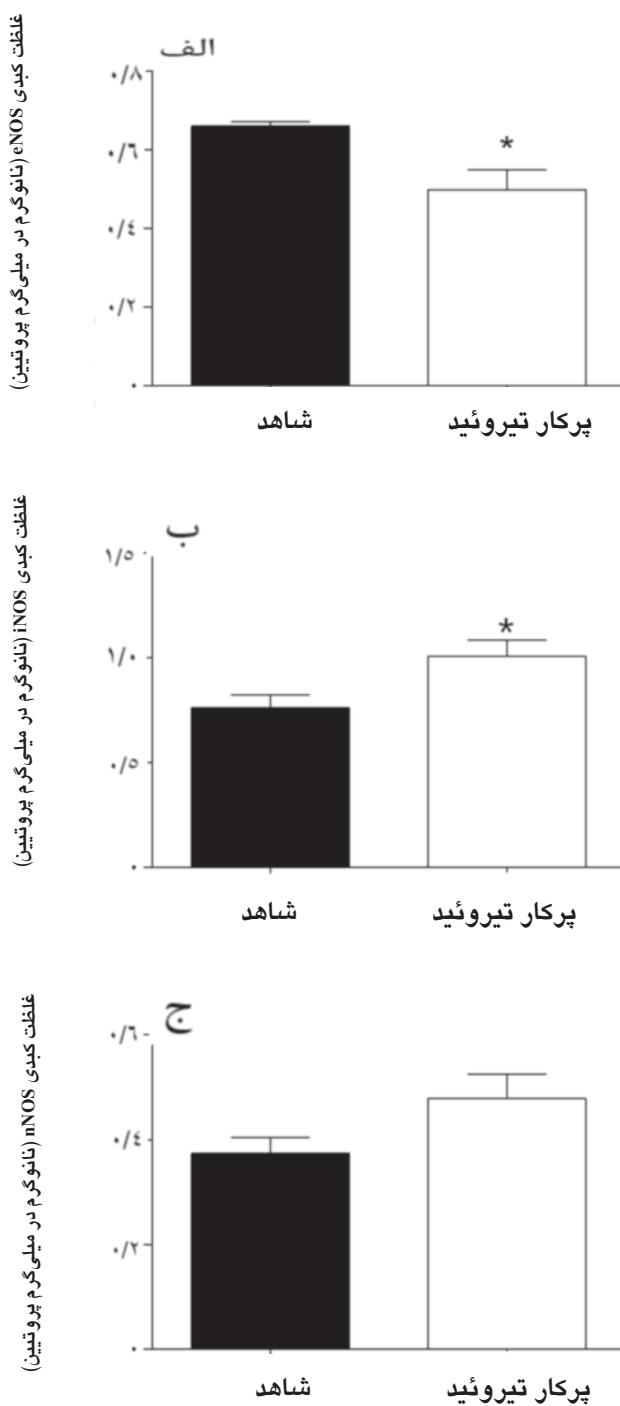
ii- Griess

iii- Independent Samples t-test

iv- Spearman

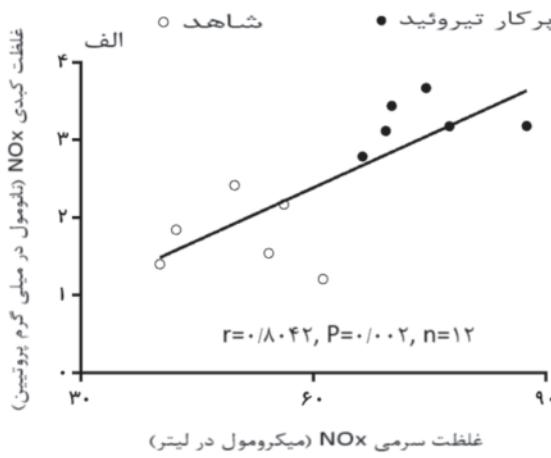
۲ قابل مشاهده است پرکاری تیروئید تأثیری بر غلظت پروتئین nNOS در بافت کبدی نداشت. نسبت پروتئین iNOS به eNOS در گروه کنترل برابر با $1/15 \pm 0/09$ بود و پرکاری تیروئید به صورت معنی‌دار ($P=0/037$) منجر به افزایش این نسبت به $2/14 \pm 0/27$ شد.

اثر پرکاری تیروئید بر غلظت پروتئین آنزیم‌های تولیدکننده اکسید نیتریک در کبد پرکاری تیروئید موجب کاهش ۳۱ درصدی ($P=0/006$) غلظت پروتئین eNOS و افزایش ۲۶ درصدی ($P=0/020$) غلظت پروتئین iNOS در بافت کبد موش‌های صحرایی نسبت به گروه شاهد گردید. همچنین همان‌طور که در نمودار

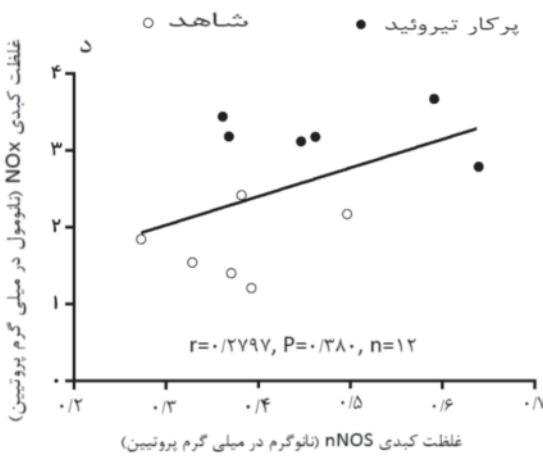
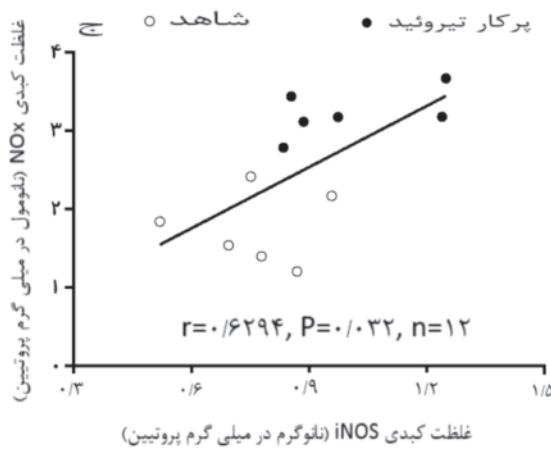
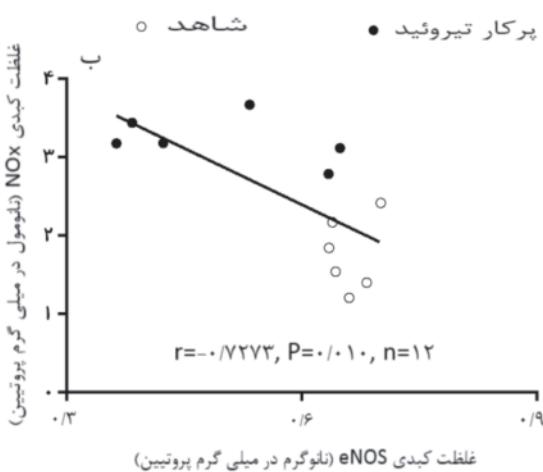


نمودار ۲- اثر پرکاری تیروئید بر غلظت پروتئین آنزیم‌های تولیدکننده اکسید نیتریک شامل eNOS (الف)، iNOS (ب) و nNOS (ج) در کبد. یافته‌ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد از میانگین بیان شده‌اند. * مقدار $P < 0/05$ در مقایسه با گروه شاهد. تعداد موش صحرایی در هر گروه ۶ سر می‌باشد.

همان‌طور که در نمودار ۳ قابل مشاهده است، بین غلظت کبدی NOx با غلظت پروتئین آنزیم eNOS در کبد ارتباط منفی معنی‌دار و با غلظت پروتئین آنزیم iNOS ارتباط مثبت معنی‌دار وجود دارد در حالی که با غلظت پروتئین آنزیم nNOS در کبد ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد.



همبستگی بین غلظت کبدی NOx با غلظت سرمی NOx و آنزیم‌های eNOS، iNOS و nNOS در کبد نتایج به دست آمده از آزمون همبستگی اسپیرمن نشان داد که بین غلظت کبدی NOx با غلظت سرمی NOx همبستگی مثبت وجود دارد ($P=0.02$). همچنین



نمودار ۳- همبستگی بین غلظت کبدی NOx با غلظت سرمی eNOS (الف)، غلظت پروتئین آنزیم‌های iNOS (ب)، nNOS (ج) و nNOS (د) در کبد. تعداد موش صحرایی در هر گروه ۶ سر می‌باشد.

نسبت پروتئین eNOS به iNOS گردید که می‌تواند در بیماری‌های کبدی ناشی از پرکاری تیروئیدی دخیل باشد. در مطالعه‌ی حاضر تجویز داروی لووتیروکسین با دوز ۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به مدت ۲۱ روز سبب افزایش ۸۷ درصدی و ۱۱۸ درصدی میزان سرمی تیروکسین تمام و آزاد و کاهش ۸۵ درصدی میزان سرمی هورمون محرك تیروئید گردید. میزان دریافت روزانه‌ی لووتیروکسین توسط هر موش صحرایی در مطالعه‌ی حاضر حدود ۲۰۰ میکروگرم به

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد، که پرکاری تیروئید سبب افزایش غلظت NOx در سرم و بافت کبد موش صحرایی می‌گردد. این افزایش همراه با افزایش معنی‌دار غلظت پروتئین iNOS و کاهش معنی‌دار غلظت پروتئین eNOS در بافت کبد موش‌های صحرایی با پرکاری تیروئیدی بود. همچنین پرکاری تیروئیدی سبب افزایش

تولیدکننده NO وجود ندارد، با این حال گزارش شده است که غلظت افزایش یافته‌ی NO_x در گروه پرکاری تیروئید، با مصرف آمینوگوانیدین (مهار کننده iNOS) به میزان طبیعی بر می‌گردد و احتمالاً افزایش بیان آنزیم iNOS است در افزایش غلظت NO_x نقش داشته باشد.^{۲۸} فرناندزⁱⁱⁱ و همکاران نشان دادند که پرکاری تیروئید منجر به افزایش فعالیت NOS توتال در کبد می‌گردد.^{۱۸} همچنین کوئیسیدو^{iv} و همکاران نشان دادند که فعالیت NOS در بافت‌هایی که در ارتباط با کنترل فشار خون هستند از جمله کلیه و قلب افزایش می‌یابد. آن‌ها چنین نتیجه‌گیری کردند که این افزایش یک مکانیسم جبرانی و حفاظتی در مقابل افزایش فشار خون ناشی از پرکاری تیروئید است.^{۱۶} گزارش شده است که مصرف ۳ روز تری‌یدوتیروئین در موش‌های صحرایی با دوز ۱/۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن منجر به افزایش فعالیت NOS می‌گردد که پیشنهاد شده است می‌تواند مربوط به بیان آنزیم iNOS در بافت کبدی باشد.^{۱۷۸۳۱۳۲} از آنجایی که آنزیمهای تولیدکننده NO یکی از مهم‌ترین اهداف هورمون‌های تیروئیدی در کبد هستند، تغییرات غلظت پروتئین آنزیمهای تولیدکننده آن محتمل به نظر می‌رسد. مشخص شده است که افزایش هورمون‌های تیروئیدی منجر به افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و فاکتورهای التهابی از جمله NF-κB در کبد می‌گردد که به نوبه خود می‌تواند منجر به فعال سازی رونویسی چندین ژن از جمله iNOS در سلول‌های کبدی گردد.^{۳۱} این افزایش غلظت NO در بافت کبدی که به علت افزایش فعالیت iNOS می‌باشد می‌تواند مکانیسم دفاعی برای حفاظت از کبد در مقابل افزایش التهاب و استرس اکسیداتیو باشد، چرا که افزایش غلظت NO منجر به مهار بیان ژن‌های مرتبط با التهاب از طریق فیدبک متفقی می‌گردد.^{۳۲} بنابراین می‌توان گفت که تغییر بیان NOS در پرکاری تیروئید می‌تواند بدلیل تأثیر مستقیم هورمون‌های تیروئید بر بیان و فعالیت NOS، تغییر فشار خون و یا تغییر در تنش برشی^v ناشی از افزایش فشار خون در بستر پرکاری تیروئید باشد.^{۱۲}

iii- Fernández

iv -Quesada

v- Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

vi -Shear stress

ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن بود که منجر به ایجاد پرکاری تیروئید شدید در موش‌های صحرایی می‌گردد (میانگین وزن بدن در گروه پرکاری تیروئید، آب مصرفی در هر روز و دوز داروی حل شده در آب به ترتیب حدود ۲۵۰ گرم، ۴۰ میلی‌لیتر در هر روز و ۱۲ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد). دوز مورد استفاده برای ایجاد پرکاری تیروئید در موش‌های صحرایی بین ۱۰۰ تا ۶۰۰ میکرو گرم در هر ۱۰۰ گرم وزن بدن متغیر است، و گزارش شده است که دوزهای بالای ۵۰ میکروگرم در هر ۱۰۰ گرم وزن بدن می‌تواند سبب ایجاد پرکاری تیروئید شدید در موش‌های صحرایی گردد.^{۲۱-۲۶}

نتایج این مطالعه نشان داد که، تجویز ۲۱ روز لووتیروکسین سبب افزایش غلظت NO_x سرمی و همچنین غلظت NO_x بافت کبدی می‌گردد. مشابه با نتایج مطالعه‌ی حاضر، تجویز ۳ هفته لووتیروکسین با دوز ۱۲ میلی‌گرم در لیتر آب آشامیدنی، غلظت سرمی NO_x را نسبت به گروه کنترل افزایش می‌دهد.^{۱۷} همچنین گومزا^۶ و همکاران نیز در دو مطالعه‌ی جدگانه نشان دادند که، تجویز ۵۰ میلی‌گرم در دو از تیروکسین در آب آشامیدنی به مدت ۳ هفته سبب افزایش غلظت سرمی NO_x در موش‌های صحرایی مبتلا به پرکاری تیروئیدی می‌گردد.^{۲۷-۲۸} برخلاف مطالعه‌های حیوانی گزارش شده، گزارش‌های مختلفی در مورد ارتباط میزان سرمی هورمون‌های تیروئیدی و NO_x در انسان نیز وجود دارد که نشان می‌دهد میزان بالای هورمون تیروکسین آزاد با غلظت کاهش یافته NO_x سرمی دارای ارتباط می‌باشد.^{۳۹} میزان بالای فرم آزاد تیروکسین و تری‌یدوتیروئین باعث کاهش تولید NO از ال-آرژنین در بیماران با پرکاری تیروئید با افزایش ADMA^{۳۰} به عنوان آنالوگ ال-آرژنین می‌گردد. برخلاف این، گزارش شده است که هورمون‌های تیروئیدی می‌توانند منجر به افزایش تولید NO با افزایش فعالیت آنزیم‌های تولید کننده NO گردد.^{۱۰}

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پرکاری شدید تیروئید در بافت کبد موش‌های صحرایی منجر به کاهش ۳۱ درصدی غلظت پروتئین eNOS و افزایش ۲۶ درصدی غلظت پروتئین iNOS نسبت به گروه شاهد می‌گردد، ولی تأثیری بر غلظت pNOS نداشت. بر اساس دانسته‌های ما، مطالعه‌ای در مورد اثر پرکاری تیروئید بر غلظت پروتئین آنزیمهای

i- Gomez

ii- Asymmetric dimethylarginine

این مطالعه دارای محدودیت‌هایی بود که باید مورد توجه قرار بگیرد. یکی از محدودیت‌های اصلی این مطالعه عدم اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی برای بررسی احتمال بیماری کبدی ناشی از پرکاری تیروئید، در فاصله زمانی بین شروع تجویز داروی لووتیروکسین تا انتهای مطالعه بود و شاید می‌توانست در تفسیر نتایج داده‌های حاصل از مطالعه کمک‌کننده باشد. همچنین لازم به ذکر است که پرکاری تیروئید با اثر مستقیم بر آنزیم‌های تولید کننده NO در سایر سیستم‌های بدن از جمله سیستم قلبی عروقی می‌تواند منجر به اختلال عملکرد آن‌ها نیز گردد.^{۲۰} کاهش قدرت انقباضی قلب، افزایش ضربان قلب و همچنین افزایش فشار خون در موش‌های صحرایی مبتلا به پرکاری تیروئید گزارش شده است.^{۲۱،۲۲} ولی مکانیسم دقیق بیماری‌های قلبی عروقی به علت پرکاری تیروئید و ارتباط آن با غلظت آنزیم‌های تولید کننده NO نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد.

نتیجه‌گیری

پرکاری تیروئید سبب تغییر بیان آنزیم‌های تولید کننده اکسید نیتریک با افزایش نسبت پروتئین eNOS به iNOS در کبد می‌گردد. نقص عملکرد اکسید نیتریک ممکن است در پاتوفیزیولوژی پرکاری تیروئید دخالت داشته باشد.

سپاسگزاری: نویسندهای مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مساعدت و همکاری مرکز تحقیقات فیزیولوژی غدد درون‌رین، پژوهشکده علوم غدد درون‌رین و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در انجام این پژوهش ابراز می‌دارند. نویسندهای اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که بین غلظت کبدی NOx با غلظت پروتئین آنزیم eNOS در کبد ارتباط منفی معنی دار و با غلظت پروتئین آنزیم iNOS ارتباط مثبت معنی دار وجود دارد. هر سه ژن تولید کننده NO در بافت کبد وجود دارند، ولی تولید NO در شرایط فیزیولوژیک از طریق eNOS و در شرایط پاتولوژیک از طریق iNOS صورت می‌گیرد. در مورد nNOS به نظر می‌رسد نیاز به بررسی‌های بیشتری وجود دارد.^{۱۱-۱۲،۳۳} در مطالعه‌ی حاضر افزایش غلظت کبدی NOx می‌تواند به علت افزایش NO مشتق شده از iNOS باشد و توجیه کننده همبستگی مثبت بین این دو پارامتر نیز می‌باشد. همچنین گزارش شده است که NO مشتق شده از iNOS می‌تواند منجر به مهار تولید NO مشتق شده از eNOS گردد^{۲۴} و به نوعی توجیه کننده ارتباط منفی بین غلظت کبدی NOx با غلظت پروتئین آنزیم eNOS در کبد باشد. پرکاری تیروئید با افزایش نسبت پروتئین iNOS به eNOS به اختلال عملکرد کبدی می‌گردد چرا که NO مشتق شده از eNOS، عملکرد طبیعی کبد را حفظ کرده و باعث کنترل جریان خون و تون عروق در کبد می‌شود و از طریق مهار التهاب سلول‌های کوپفر کبدی و افزایش β -اکسیداسیون اسیدهای چرب میتوکندری باعث مهار اثرات پاتولوژیک در کبد می‌شود.^{۱۱} در مقابل، NO مشتق شده از iNOS منجر به تولید گونه‌های ازت واکنش دهنده به ویژه پرآکسی نیتریت می‌گردد که می‌تواند به طیف وسیعی از مولکول‌های سلولی از جمله DNA، لیپیدها و پروتئین‌ها آسیب برساند و در نهایت باعث آسیب کبد و ایجاد اختلال در عملکرد کبد گردد.^{۱۱}

References

- Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, et al. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 489-99.
- Sajjadi-Jazi SM, Sharifi F, Varmaghani M, Meybodi HA, Farzadfar F, Larijani B. Epidemiology of hypothyroidism in Iran: a systematic review and meta-analysis. *J Diabetes Metab Disord* 2018; 17: 345-55.
- De Leo S, Lee SY, Braverman LE. Hyperthyroidism. *Lancet* 2016; 388: 906-18.
- Khemichian S, Fong TL. Hepatic dysfunction in hypothyroidism. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2011; 7: 337-9.
- Chi HC, Chen CY, Tsai MM, Tsai CY, Lin KH. Molecular functions of thyroid hormones and their clinical significance in liver-related diseases. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 601361.
- Videla LA, Fernandez V, Tapia G, Varela P. Thyroid hormone calorigenesis and mitochondrial redox signaling: upregulation of gene expression. *Front Biosci* 2007; 12: 1220-8.
- Udovicic M, Pena RH, Patham B, Tabatabai L, Kansara A. Hypothyroidism and the Heart. *Methodist Debakey Cardiovasc J* 2017; 13: 55-9.
- Laroux FS, Lefer DJ, Kawachi S, Scalia R, Cockrell AS, Gray L, et al. Role of nitric oxide in the regulation of acute and chronic inflammation. *Antioxid Redox Signal* 2000; 2: 391-6.
- Moncada S, Higgs E. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* 2006; 147: S193-S201.
- Moncada S, Higgs A, Furchtgott R. International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol Rev* 1997; 49: 137-42.
- Iwakiri Y, Kim MY. Nitric oxide in liver diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2015; 36: 524-36.
- Rodríguez-Gómez I, Moliz JN, Quesada A, Montoro-Molina S, Vargas-Tendero P, Osuna A, et al. L-Arginine

- metabolism in cardiovascular and renal tissue from hyper- and hypothyroid rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2016; 241: 550-6.
13. Carnovale CE, Ronco MT. Role of nitric oxide in liver regeneration. *Ann Hepatol* 2012; 11: 636-47.
 14. Hu DH, Peng J, Zhang X, Zheng HL, Yan SM, Zhang YT, et al. Thyroid hormone exacerbates vasoconstriction in insulin resistance: the role of ONOO(-). *Eur J Pharmacol* 2014; 730: 41-50.
 15. Carrillo-Sepulveda MA, Ceravolo GS, Fortes ZB, Carvalho MH, Tostes RC, Laurindo FR, et al. Thyroid hormone stimulates NO production via activation of the PI3K/Akt pathway in vascular myocytes. *Cardiovasc Res* 2010; 85: 560-70.
 16. Quesada A, Sainz J, Wangensteen R, Rodriguez-Gomez I, Vargas F, Osuna A. Nitric oxide synthase activity in hyperthyroid and hypothyroid rats. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 117-22.
 17. Zaman J, Jeddi S, Ghasemi A. The effects of ischemic postconditioning on myocardial function and nitric oxide metabolites following ischemia-reperfusion in hyperthyroid rats. *Korean J Physiol Pharmacol* 2014; 18: 481-7.
 18. Fernández V, Cornejo P, Tapia G, Videla LA. Influence of Hyperthyroidism on the Activity of Liver Nitric Oxide Synthase in the Rat. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 1997; 1: 463-8.
 19. Pantos C, Malliopoulou V, Mourouzis I, Thempeyioti A, Paizis I, Dimopoulos A, et al. Hyperthyroid hearts display a phenotype of cardioprotection against ischemic stress: a possible involvement of heat shock protein 70. *Horm Metab Res* 2006; 38: 308-13.
 20. Kiss E, Jakab G, Kranias EG, Edes I. Thyroid hormone-induced alterations in phospholamban protein expression. Regulatory effects on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport and myocardial relaxation. *Circ Res* 1994; 75: 245-51.
 21. Venditti P, De Rosa R, Calderone G, Di Meo S. Effect of prolonged exercise on oxidative damage and susceptibility to oxidants of rat tissues in severe hyperthyroidism. *Arch Biochem Biophys* 2005; 442: 229-37.
 22. Upadhyay G, Singh R, Kumar A, Kumar S, Kapoor A, Godbole MM. Severe hyperthyroidism induces mitochondria-mediated apoptosis in rat liver. *Hepatology* 2004; 39: 1120-30.
 23. Reedi EE, Solberg LC, Kluczynski JM, Pare WP. Paradoxical hormonal and behavioral responses to hypothyroid and hyperthyroid states in the Wistar-Kyoto rat. *Neuropsychopharmacology* 2001; 24: 632-9.
 24. Jena S, Dandapat J, Chainy GB. Curcumin differentially regulates the expression of superoxide dismutase in cerebral cortex and cerebellum of L-thyroxine (T(4))-induced hyperthyroid rat brain. *Neurol Sci* 2013; 34: 505-10.
 25. Araujo AS, Schenkel P, Enzveiler AT, Fernandes TR, Partata WA, Llesuy S, et al. The role of redox signaling in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. *J Mol Endocrinol* 2008; 41: 423-30.
 26. Moulakakis KG, Poulikakou MV, Paraskevas KI, Dontas I, Vlachos IS, Sokolis DP, et al. Hyperthyroidism is associated with increased aortic oxidative DNA damage in a rat model. *In Vivo* 2007; 21: 1021-6.
 27. Rodriguez-Gomez I, Sainz J, Wangensteen R, Moreno JM, Duarte J, Osuna A, et al. Increased pressor sensitivity to chronic nitric oxide deficiency in hyperthyroid rats. *Hypertension* 2003; 42: 220-5.
 28. Rodriguez-Gomez I, Wangensteen R, Moreno JM, Chamorro V, Osuna A, Vargas F. Effects of chronic inhibition of inducible nitric oxide synthase in hyperthyroid rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E1252-7.
 29. Bagheripour F, Gharibzadeh S, Ghanbari M, Amouzegar A, Tohidi M, Azizi F, et al. Association between serum nitric oxide metabolites and thyroid hormones in a general population: Tehran Thyroid Study. *Endocr Res* 2016; 41: 193-9.
 30. Hermenegildo C, Medina P, Peiro M, Segarra G, Vila JM, Ortega J, et al. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in hyperthyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 5636-40.
 31. Fernández V, Tapia G, Varela P, Videla LA. Redox regulation of thyroid hormone-induced Kupffer cell-dependent IκB-α phosphorylation in relation to inducible nitric oxide synthase expression. *Free Radic Res* 2005; 39: 411-8.
 32. Fernandez V, Tapia G, Varela P, Cornejo P, Videla LA. Upregulation of liver inducible nitric oxide synthase following thyroid hormone preconditioning: suppression by N-acetylcysteine. *Biol Res* 2009; 42: 487-95.
 33. McNaughton L, Puttagunta L, Martinez-Cuesta MA, Kneteman N, Mayers I, Moqbel R, et al. Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 17161-6.
 34. Sansbury BE, Hill BG. Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 2014; 73: 383-99.
 35. Cappola AR, Desai AS, Medici M, Cooper LS, Egan D, Sopko G, et al. Thyroid and Cardiovascular Disease Research Agenda for Enhancing Knowledge, Prevention, and Treatment. *Circulation* 2019.

Original Article

Effect of Severe Hyperthyroidism on Concentrations of Nitric Oxide-producing Enzymes in Liver of Male Rats

Yousefzadeh N, Jедди S, Ghasemi A

Endocrine Physiology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

e-mail: Ghasemi@endocrine.ac.ir

Received: 7/12/2019 Accepted: 15/01/2020

Abstract

Introduction: Thyroid hormones play an important role in normal function of liver and hyperthyroidism can cause liver dysfunction. Thyroid hormones affect nitric oxide (NO)-producing enzymes in liver. The aim of this study is to investigate effects of hyperthyroidism on protein levels of three isoforms of NO synthase (NOS) enzymes, including endothelial NOS (eNOS), inducible NOS (iNOS), and neuronal NOS (nNOS) in the liver of male rats. **Materials and Methods:** Twelve male Wistar rats were divided into the hyperthyroid and the control groups. Hyperthyroidism was induced by administration of 12 mg/L of levothyroxine in the drinking water of rats for a period of 21 days. NO metabolites (i.e. nitrate+nitrite or NO_x) concentrations in the serum and liver as well as iNOS, eNOS, and nNOS protein levels in the liver tissue were measured on day 21. **Results:** Serum levels of free thyroxine and total thyroxine were significantly higher, whereas that of the thyroid stimulating hormone (TSH) was significantly lower in rats with hyperthyroidism. Compared to controls, NO_x levels were significantly higher in the serum (46%) and liver tissue (70%) of rats with hyperthyroidism. Hyperthyroidism decreased protein levels of eNOS (31%, P=0.006) and increased protein levels of iNOS (26%, P=0.020) but had no effect on nNOS in the liver. **Conclusion:** Hyperthyroidism changed levels of NO-producing enzymes liver, indicating that dysfunction of NO system may contribute to the pathophysiology of hyperthyroidism.

Keywords: Hyperthyroidism, Liver, Nitric oxide synthase (NOS), Rat