

اثر پرکاری تیروئید شدید بر غلظت آنزیم‌های تولیدکننده‌ی اکسید

نیتریک در کبد موش‌های صحرایی نر

دکتر نصیبه 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 تولیدکننده‌ی اکسید نیتریک (Nitric oxide, NO) در بافت کبد تأثیر می‌گذارند. هدف از این مطالعه، تعیین آثار پرکاری تیروئید بر غلظت آنزیم‌های تولیدکننده‌ی اکسید نیتریک (NO synthase, NOS) شامل NOS عصبی (nNOS)، NOS قابل القاء (iNOS) و NOS اندوتلیال (eNOS) 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+نیتريت یا NOx) در سرم و بافت کبد و همچنین غلظت پروتئین آنزیم‌های nNOS، iNOS و eNOS در کبد در انتهای مطالعه اندازه‌گیری شد. یافته‌ها: در گروه پرکاری تیروئید، غلظت سرمی تیروکسین تام و آزاد بالاتر و غلظت هورمون محرک تیروئیدی پایین‌تر از گروه شاهد بود. غلظت سرمی و کبدی NOx در گروه پرکاری 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 تولیدکننده‌ی اکسید نیتریک در کبد می‌شود. نقص 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

مقدمه

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

پرکاری تیروئیدⁱ از شایع‌ترین (۸/۰ درصد در اروپا، ۱/۳ درصد در آمریکا و ۲/۴ درصد در ایران)^{۱،۲} اختلال‌های غده‌ی تیروئید است که عموماً با غلظت کم یا فقدان هورمون محرک تیروئیدⁱⁱ و مقادیر بالای تری‌یدوتیرونین آزادⁱⁱⁱ و تیروکسین آزاد^{iv} تشخیص داده می‌شود.^۳ این بیماری می‌تواند بر سیستم‌های قلبی عروقی، عصبی، دستگاه گوارش و کبد تأثیر گذاشته و منجر به اختلال عملکرد آن‌ها گردد.^۴ 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.ENDOCRINE.REC.1396.398).

القای پرکاری تیروئید و تأیید آن

موش‌های صحرایی نر (۳-۲ ماهه در محدوده وزنی ۲۲۰ الی ۲۳۴ 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 محرک تیروئید^{iv} با کیت الایزای مخصوص موش صحرایی^v (شرکت زلیبو، آلمانی) و همچنین فرم آزاد و تام تیروکسین^{vi} به وسیله کیت‌های الایزا (شرکت پیشتاز طب، تهران، ایران) اندازه‌گیری شد. ضریب تغییر درون آزمونی برای هر سه اندازه‌گیری کمتر از ۶ درصد بود.

مراحل اجرای مطالعه

در روز صفر، موش‌های 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 محرک تیروئید، فرم آزاد و تام 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 پروتیین آنزیم‌های تولیدکننده‌ی NO شامل iNOS، eNOS و nNOS به کار رفت.

اندازه‌گیری غلظت سرمی و کبدی NOx و غلظت

پروتیین آنزیم‌های تولیدکننده‌ی NO در کبد

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

القاءⁱ (iNOS) و NOS اندوتلیالیⁱⁱ (eNOS) سنتز می‌گرددⁱⁱⁱ و آثار فیزیولوژیک و پاتولوژیک مختلف در بسیاری از بافت‌ها از جمله کبد دارد.^{۱۱} NO در بافت کبد توسط هر ۳ آنزیم تولیدکننده‌ی NO سنتز می‌گردد.^{۱۱-۱۳} 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 موش‌های صحرایی مبتلا به پرکاری تیروئید می‌گردد.^{۱۷} همچنین مصرف کوتاه‌مدت (۳ روز) هورمون تری‌یدوتیرونین باعث افزایش معنی‌دار و برگشت پذیر فعالیت آنزیم NOS توتال در هیپاتوسیت‌ها و سلول کوپفر کبدی در موش‌های صحرایی می‌شود.^{۱۸} مطالعات نشان داده‌اند که آثار کوتاه‌مدت افزایش هورمون‌های تیروئیدی متفاوت از اثرات بلندمدت آن می‌باشد، به طوری که 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 متفاوت به هورمون‌های تیروئیدی بدهند، به این صورت که عمده تولید NO در شرایط فیزیولوژیک وابسته به آنزیم eNOS بوده ولی در شرایط پاتولوژیک وابسته به iNOS می‌باشد^{۱۱-۱۳} تاکنون آثار طولانی‌مدت (۲۱ روز) پرکاری تیروئید شدید بر تغییر غلظت پروتیین آنزیم‌های تولیدکننده‌ی 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 موش صحرایی نر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات

موش‌های صحرایی نر از نژاد ویستارⁱⁱⁱ در شرایط آزمایشگاهی (دمای ۲۲±۱ درجه‌ی سلسیوس و ۱۲ ساعت روشنایی - ۱۲ ساعت تاریکی) در حیوان‌خانه‌ی پژوهش‌کده‌ی

iv -Thyroid-stimulating hormone

v - Zellbio Co., Germany

vi -Free and total thyroxine

i- Inducible nitric oxide synthase

ii -Endothelial nitric oxide synthase

iii -Wistar

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 محرک تیروئید
اندازه‌گیری هورمون‌های تیروئیدی و هورمون محرک تیروئیدی نشان داد، که تجویز لو‌تیروکسین با دوز ۱۲ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۲۱ روز سبب پرکاری تیروئید در موش‌های صحرایی نر شده است. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده پرکاری تیروئید در موش‌های صحرایی منجر به افزایش میزان سرمی تیروکسین تام و آزاد و کاهش هورمون محرک تیروئید شد.

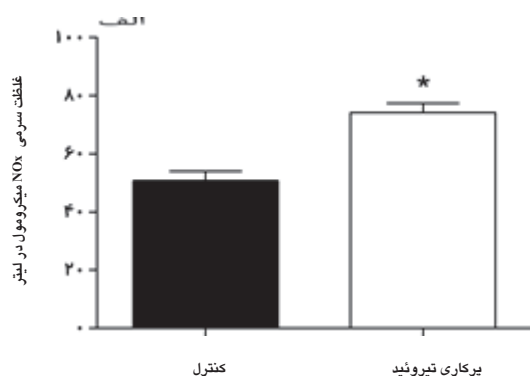
جدول ۱- اثر پرکاری تیروئید بر میزان سرمی هورمون‌های تیروئیدی و هورمون محرک تیروئید

پارامتر	شاهد	پرکاری تیروئید	مقدار P
تیروکسین تام (نانومول در لیتر)	۵۴/۳۹±۲/۸۷	۱۰۱/۷۰±۵/۰۹	۰/۰۰۰۱
تیروکسین آزاد (پیکومول در لیتر)	۵۱/۶۹±۴/۰۴	۱۱۲/۷۰±۶/۲۷	۰/۰۰۰۱
هورمون محرک تیروئید (میلی واحد در میلی‌لیتر)	۴/۸۶±۰/۶۶	۲/۰۲±۰/۳۱	۰/۰۰۳۱

یافته‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد از میانگین بیان شده‌اند. تعداد موش صحرایی در هر گروه ۶ سر می‌باشد.

اثر پرکاری تیروئید بر غلظت سرمی و کبدی NOx

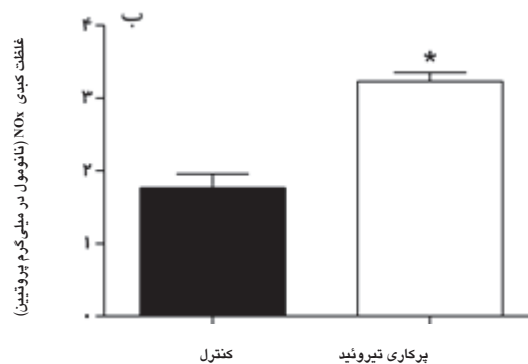
میزان سرمی و کبدی NOx در گروه پرکاری تیروئید به طور معنی‌داری از گروه شاهد بیشتر بود (نمودار ۱).



داده شده و در بافر هموژن (فسفات بافر سالین PBSⁱ ۱۰۰ میلی مولار، pH = ۷/۴)، با نسبت وزنی-حجمی ۵ به ۱ با دستگاه هموژنایزر و سونیکاتور هموژن گردید. برای اندازه‌گیری NOx در سرم و هموژن کبد از روش رنگ‌سنجی گریسⁱⁱ با استفاده از کیت رنگ‌سنجی (شرکت پژوهش کاو آفاق، تهران، ایران) استفاده شد. غلظت پروتیین آنزیم‌های تولیدکننده NO شامل iNOS، eNOS و nNOS توسط کیت‌های مخصوص موش صحرایی (شرکت زلیبو، آلمانی) اندازه‌گیری شد. همچنین غلظت پروتیین در نمونه‌ها با روش برادفورد اندازه گرفته شد و غلظت آنزیم‌های تولیدکننده NO بر حسب واحد نانوگرم به ازای هر میلی‌گرم پروتیین در بافت گزارش گردید. ضریب تغییرات درون آزمونی برای غلظت سرمی و کبدی NOx به ترتیب ۳/۴ و ۴/۱ درصد بود. همچنین ضریب تغییرات درون آزمونی برای آنزیم‌های iNOS، eNOS و nNOS به ترتیب ۴/۴، ۲/۲ و ۷/۵ درصد بود.

آنالیز آماری

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۶ انجام شد. یافته‌های کمی به صورت میانگین ± انحراف استاندارد از میانگین بیان شده‌اند. برای مقایسه میزان سرمی هورمون محرک تیروئیدی، هورمون‌های تیروئیدی شامل تیروکسین آزاد و تام و همچنین غلظت سرمی و کبدی NOx و غلظت پروتیین آنزیم‌های تولیدکننده NO در کبد بین دو گروه مختلف از آنالیز آمون تی-مستقلⁱⁱⁱ استفاده گردید. برای بررسی همبستگی بین غلظت کبدی NOx با غلظت سرمی NOx و آنزیم‌های eNOS، nNOS، iNOS در کبد از آمون



نمودار ۱- اثر پرکاری تیروئید بر غلظت متابولیت‌های اکسید نیتریک (NOx) در سرم (الف) و بافت کبد (ب). یافته‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد از میانگین بیان شده‌اند. *مقدار P کمتر از ۰/۰۵ در مقایسه با گروه شاهد. تعداد موش صحرایی در هر گروه ۶ سر می‌باشد.

i- Phosphate buffered saline

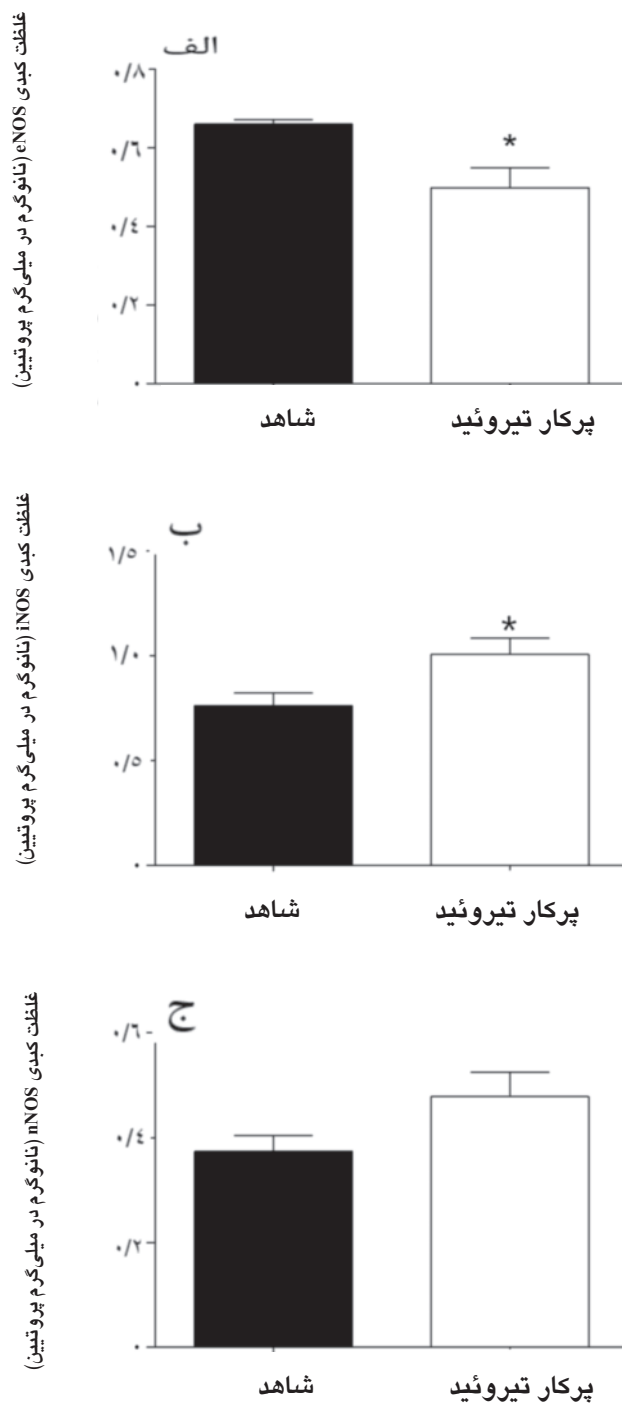
ii- Griess

iii- Independent Samples t-test

iv- Spearman

اثر پرکاری تیروئید بر غلظت پروتئین آنزیم‌های تولیدکننده‌ی 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

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.



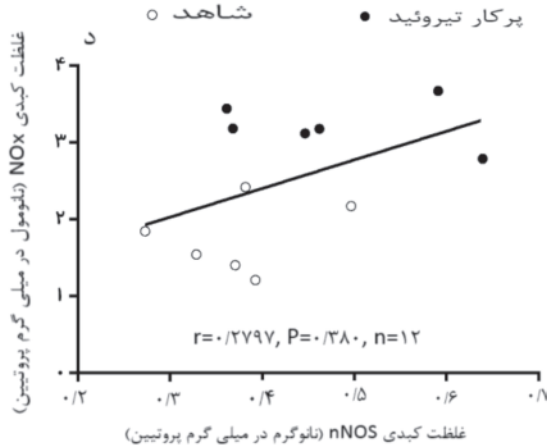
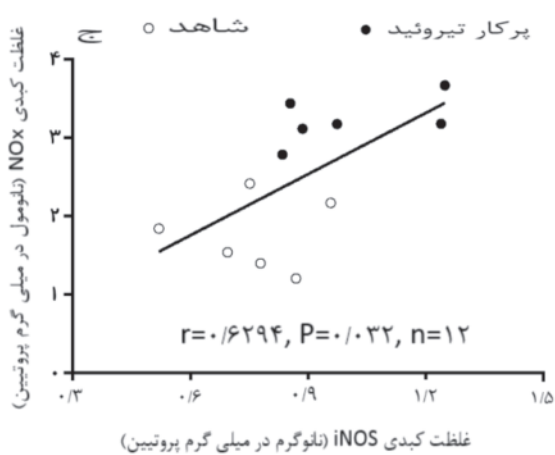
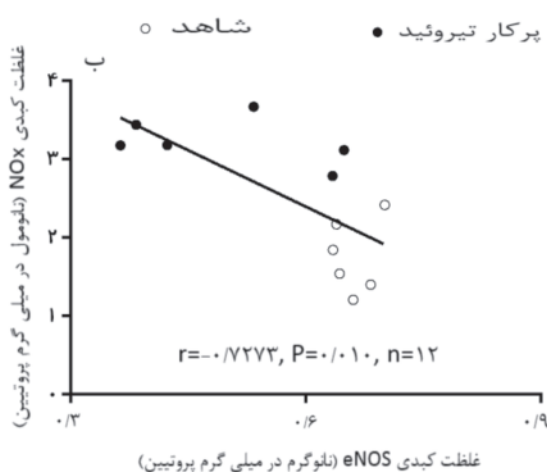
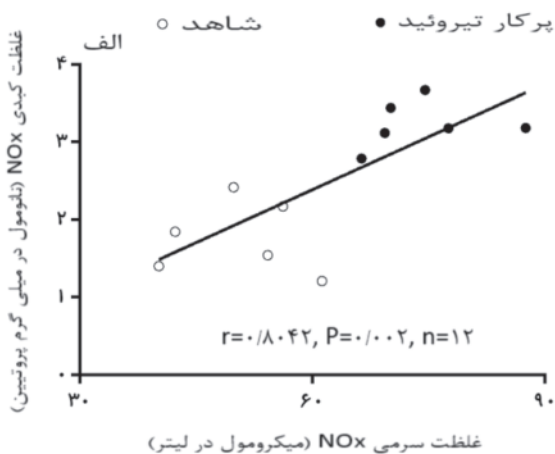
نمودار ۲- اثر پرکاری تیروئید بر غلظت پروتئین آنزیم‌های تولیدکننده‌ی اکسید نیتریک شامل eNOS (الف)، iNOS (ب) و nNOS (ج) در کبد. یافته‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد از میانگین بیان شده‌اند. *مقدار P کمتر از ۰/۰۵ در مقایسه با گروه شاهد. تعداد موش صحرایی در هر گروه ۶ سر می‌باشد.

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

همبستگی بین غلظت کبدی NOx با غلظت سرمی

NOx و آنزیم‌های eNOS، nNOS و iNOS 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 ($r=0/804$ و $P=0/002$). همچنین



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

نسبت پروتیین iNOS به eNOS گردید که می‌تواند در بیماری‌های کبدی ناشی از پرکاری تیروئیدی دخیل باشند. 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 تام و آزاد و کاهش ۸۵ درصدی میزان سرمی هورمون محرک 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 پروتیین iNOS و کاهش معنی‌دار غلظت پروتیین eNOS در بافت کبد موش‌های صحرایی با پرکاری تیروئیدی بود. همچنین پرکاری تیروئیدی سبب افزایش

ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن بود که منجر به ایجاد پرکاری تیروئید شدید در موش‌های صحرایی می‌گردد (میانگین وزن بدن در گروه پرکارتیروئید، 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 ۱۰ تا ۶۰ میکروگرم در هر ۱۰۰ گرم وزن بدن متغییر 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 NOx سرمی و همچنین غلظت NOx بافت کبدی می‌گردد. مشابه با نتایج مطالعه‌ی حاضر، تجویز ۳ هفته لووتیروکسین با دوز ۱۲ میلی‌گرم در لیتر آب آشامیدنی، غلظت سرمی NOx را نسبت به گروه کنترل افزایش می‌دهد.^{۱۷} همچنین گومزا^{۱۷} و همکاران نیز در دو مطالعه‌ی جداگانه نشان دادند که، تجویز ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از تیروکسین در آب آشامیدنی به مدت ۳ هفته سبب افزایش غلظت سرمی NOx 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 NOx در انسان نیز وجود دارد که نشان می‌دهد میزان بالای هورمون تیروکسین آزاد با غلظت کاهش یافته NOx سرمی دارای ارتباط می‌باشد.^{۲۹} میزان بالای فرم آزاد تیروکسین و تری‌یدوتیرونین باعث کاهش تولید NO از ال-آرژنین در بیماران با پرکاری تیروئید با افزایش ADMA^{۳۰} به عنوان آنالوگ ال-آرژنین می‌گردد.^{۳۰} بر خلاف این، گزارش شده است که هورمون‌های تیروئیدی می‌توانند منجر به افزایش تولید NO با افزایش فعالیت آنزیم‌های تولید کننده NO گردند.^{۱۵}

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

تولیدکننده‌ی NO وجود ندارد، با این حال گزارش شده است که غلظت افزایش یافته‌ی NOx در گروه پرکاری تیروئید، با مصرف آمینوگوانیدین (مهار کننده‌ی iNOS) به میزان طبیعی بر می‌گردد و احتمالاً افزایش بیان آنزیم iNOS ممکن است در افزایش غلظت NOx نقش داشته باشد.^{۲۸} فرناندز^{۳۱} و همکاران نشان دادند که پرکاری تیروئید منجر به افزایش فعالیت NOS توتال در کبد می‌گردد.^{۳۱} همچنین کوئیسیدو^{۳۲} 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.^{۳۱} گزارش شده است که مصرف ۳ روز تری‌یدوتیرونین در موش‌های صحرایی با دوز ۰/۱ 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.^{۳۱،۳۲} از آنجایی که آنزیم‌های تولید کننده‌ی NO یکی از مهم‌ترین اهداف هورمون‌های تیروئیدی در کبد هستند، تغییرات غلظت پروتیین آنزیم‌های تولیدکننده‌ی 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^{۳۳} در کبد می‌گردند 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 منفی 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^{۳۴} 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

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 تولیدکننده NO در سایر سیستم‌های بدن از جمله سیستم قلبی عروقی می‌تواند منجر به اختلال عملکرد آن‌ها نیز گردد.^{۳۰} کاهش قدرت انقباضی قلب، افزایش ضربان قلب و همچنین افزایش فشار خون در موش‌های صحرایی مبتلا به پرکاری تیروئید گزارش شده است.^{۱۲،۱۷} ولی مکانیسم دقیق بیماری‌های قلبی عروقی به علت پرکاری تیروئید و ارتباط آن با غلظت آنزیم‌های تولیدکننده NO نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد.

نتیجه‌گیری

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

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

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 hyperthyroidism 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 hyperthyroidism. *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.
- Udovic 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, Furchgott 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

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که 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. هر سه ژن تولیدکننده 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.^{۱۱-۱۳،۳۳} در مطالعه‌ی حاضر افزایش غلظت کبدی NOx می‌تواند به علت افزایش NO مشتق شده از iNOS باشد و توجیه‌کننده‌ی 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^{۳۴} و به نوعی توجیه‌کننده‌ی ارتباط منفی بین غلظت کبدی NOx با غلظت پروتئین آنزیم eNOS در کبد باشد. پرکاری تیروئید با افزایش نسبت پروتئین iNOS به eNOS منجر 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 واکنش‌دهنده به ویژه پراکسی نیتريت 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}

- 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, Wangenstein 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, Malliopoloulou 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, Kraniás 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, Caldarone 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. Redei 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 (T₄)-induced hyperthyroid rat brain. *Neurol Sci* 2013; 34: 505-10.
 25. Araujo AS, Schenkel P, Enzweiler 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, Poulakou 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, Wangenstein 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, Wangenstein 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, Jeddi 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