مجله‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
دوره‌ی بیست و یکم، شماره‌ی ۵، صفحه‌های ۲۸۰ ـ ۲۷۳ (آذر ـ دی ۱۳۹۸)

مقاله‌ی پژوهشی

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+نیتریت یا **NOx**) در سرم و بافت کبد و همچنین غلظت پروتیین 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 پروتیین **eNOS** (۳۱ درصد، **P=۰/۰۰۶**) و افزایش غلظت پروتیین **iNOS** (۲۶ درصد، **p=۰/۰۲۰**) در کبد شد، اما تأثیری بر غلظت پروتیین **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: ۹۸/۹/۱۶ـ دریافت اصلاحیه: ۹۸/۱۰/۲۲ ـ پذیرش مقاله: ۹۸/۱۰/۲۵

مقدمه

پرکاری تیروئید[i] از شایع‌ترین (۰/۸ 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 تیروئید[ii] و مقادیر بالای تری یدوتیرونین آزاد[iii] 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] 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.[۶] 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[vi] (NOS) شامل NOS عصبی[vii] (nNOS)، NOS قابل

i -Hyperthyroidism
ii -Thyroid stimulating hormone
iii -Free-triiodothyronine
iv -Free-tetraiodothyronine

v -Nitric oxide
vi -Nitric oxide synthase
vii -Neuronal nitric oxide synthase

القـــاء[i] (iNOS) و NOS انـــدوتلیالی[ii] (eNOS) ســـنتز می‌گردد[۹،۱۰] و آثـار فیزیولوژیـک و پاتولوژیـک مختلـف در بسیاری از بافت‌هـا از جملـه کبـد دارد.[۱۱] NO در بافـت کبـد توسط هر ۳ آنزیم تولیدکننده‌ی NO سنتز می‌گـردد.[۱۳-۱۱] هـر ۳ آنزیم تولیدکننده NO به عنوان هدفی بـرای هورمـون‌هـای تیروئیدی محسوب می‌شـوند[۱۴] و NO نیـز نقـش تنظیمـی در عملکرد هورمون‌های تیروئیدی دارد.[۱۶،۱۵]

افـزایش هورمـون‌هـای تیروئیـدی سـبب افـزایش غلظـت سـرمی NOx در مـوش‌هـای صـحرایی مبـتلا بـه پرکـاری تیروئید می‌گـردد.[۱۷] همچنـین مصـرف کوتـاه‌مـدت (۳ روز) هورمون تری‌یدوتیرونین باعث افـزایش معنـی‌دار و برگشـت پذیر فعالیت آنـزیم NOS توتـال در هپاتوسـیت‌هـا و سـلول کوپفر کبدی در مـوش‌هـای صـحرایی مـی‌شـود.[۱۸] مطالعـات نشـان داده‌انـد کـه آثـار کوتـاه‌مـدت افـزایش هورمـون‌هـای تیروئیدی متفاوت از اثرات بلندمدت آن می‌باشد، به طوری که پرکاری تیروئیدی در کوتاه‌مدت سبب افزایش قدرت انقباضی قلب و مقاومـت در برابـر ایسـکمی قلبـی مـی‌گـردد، ولـی در طولانی‌مدت آثار منفی پرکاری تیروئیدی دیده مـی‌شـود.[۲۰،۱۹] همچنین ایزوفرم‌های مختلف NOS ممکن است پاسخ متفاوت به هورمون‌های تیروئیدی بدهند، بـه ایـن صـورت کـه عمـده تولید NO در شرایط فیزیولوژیک وابسته بـه آنـزیم eNOS بـوده ولـی در شـرایط پاتولوژیـک وابسـته بـه iNOS مـی‌باشـد[۱۳-۱۱] تـاکنون آثـار طـولانی‌مـدت (۲۱ روز) پرکـاری تیروئیـد شـدید بـر تغییـر غلظـت پـروتیین آنـزیم‌هـای تولیدکننده‌ی NO در کبـد گـزارش نشـده اسـت. بنـابراین بـا توجه به اینکه نقص عملکرد آنزیم‌های تولیدکننده NO ممکـن است در پاتوفیزیولوژی پرکاری تیروئید دخالت داشته باشد، هدف این مطالعه بررسـی آثـار پرکـاری تیروئیـد شـدید بـر غلظت NOx و آنـزیم‌هـای NOS در بافـت کبـدی در مـوش صحرایی نر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات

موش‌های صحرایی نر از نژاد ویستار[iii] در شرایط آزمایشگاهی (دمای ۱±۲۲ درجه‌ی سلسیوس و ۱۲ ساعت روشنایی- ۱۲ ساعت تاریکی) در حیوان‌خانه‌ی پژوهشکده‌ی 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 محدوه وزنـی ۲۲۰ الی ۲۳٤ گرم) به ۲ گروه شاهد و پرکار تیروئید تقسیم شـدند (٦ سر در هر گروه) که بـه ترتیـب آب آشـامیدنی معمـولی و آب آشامیدنی حاوی ۱۲ میلی‌گرم در لیتر لووتیروکسـین بـه مدت ۲۱ روز دریافت کردند. در انتهـای مطالعـه، بـرای تأییـد ایجاد مدل پرکاری تیروئید، میـزان سـرمی هورمـون محـرک تیروئید[iv] با کیت الایزای مخصوص موش صحرایی[v] (شـرکت زلبیـو، آلمـانی) و همچنـین فـرم آزاد و تـام تیروکسـین[vi] بـه وسیله کیت‌های الایـزا (شـرکت پیشـتاز طـب، تهـران، ایـران) اندازه‌گیری شد. ضریب تغییر درون آزمـونی بـرای هـر سـه اندازه‌گیری کمتر از ٦ درصد بود.

مراحل اجرای مطالعه

در روز صفر، موش‌های صحرایی به طور تصادفی بـه ۲ گروه شاهد و پرکار تیروئید تقسـیم شـدند و لووتیروکسـین (۱۲ میلی‌گرم در لیتر) در گروه پرکاری تیروئید بـه مـدت ۲۱ روز تجویز شد. در انتهای مطالعه، نمونه‌ی خـون بـه منظـور اندازه‌گیری میزان سرمی هورمون محرک تیروئید، فـرم آزاد و تام تیروکسین و همچنین NOx سرمی از حیوان‌هـا گرفتـه شد. بافت کبد در روز ۲۱ بعد از بیهوشی کامـل بـا کتـامین و زایلازین (به ترتیب ٦۰ و ۱۰ میلی‌گـرم بـا ازای هـر کیلـوگرم وزن بدن) جدا شد و برای اندازه‌گیری غلظت NOx و غلظـت پروتیین آنزیم‌های تولیدکننـده‌ی NO شـامل iNOS، eNOS و nNOS به کار رفت.

انـدازه‌گیـری غلظـت سـرمی و کبـدی NOx و غلظـت پروتیین آنزیم‌های تولیدکننده‌ی NO در کبد

پس از ۱۲-۱٤ساعت ناشتایی، نمونه خون از مـوش‌هـای صحرایی گرفته و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. در انتهای مطالعه، نمونه‌های بافت کبد نیز از مـوش‌هـای صحرایی گرفته شد و سپس بافت‌ها به قطعات کوچـک بـرش

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

داده شده و در بافر هموژن (فسفات بافر سالین PBS[i] ۱۰۰ میلی مولار، pH = ۷/٤)، 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 گریس[ii] با استفاده از کیت رنگ‌سنجی (شرکت پژوهش کاو آفاق، تهران، ایران) استفاده شد. غلظت پروتیین آنزیم‌های تولیدکننده‌ی NO شامل iNOS، eNOS و nNOS توسط کیت‌های مخصوص موش صحرایی (شرکت زلبیو، آلمانی) اندازه‌گیری شد. همچنین غلظت پروتیین در نمونه‌ها با روش برادفورد اندازه گرفته شد و غلظت آنزیم‌های تولیدکننده‌ی 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 ۳/٤ و ٤/۱ درصد بود. همچنین ضریب تغییرات درون آزمونی برای آنزیم‌های iNOS، eNOS و nNOS به ترتیب ٤/٤، ۲/۲ و ۷/۵ درصد بود.

آنالیز آماری

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ٦ 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 تولیدکننده‌ی NO در کبد بین دو گروه مختلف از آنالیز آزمون تی-مستقل[iii] استفاده گردید. برای بررسی همبستگی بین غلظت کبدی NOx با غلظت سرمی NOx وآنزیم‌های eNOS، nNOS، iNOS در کبد از آزمون 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 لووتیروکسین 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.

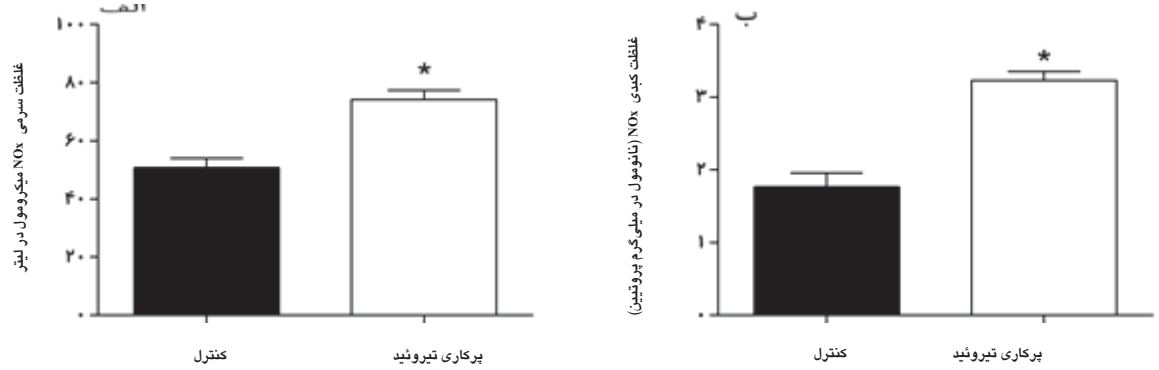
جدول۱- اثر پرکاری تیروئید بر میزان سرمی هورمون-های تیروئیدی و هورمون محرک تیروئید

پارامتر	شاهد	پرکارتیروئید	مقدار P
تیروکسین تام (نانومول در لیتر)	٥٤/٣٩±٢/٨٧	١٠١/٧٠±٥/٠٩	۰/۰۰۰۱
تیروکسین آزاد (پیکومول در لیتر)	٥١/٦٩±٤/٠٤	١١٢/٧٠±٦/٢٧	۰/۰۰۰۱
هورمون محرک تیروئید (میلی واحد در میلی‌لیتر)	٤/٨٦±٠/٦٦	٢/٠٢±٠/٣١	۰/۰۰۳۱

یافته‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد از میانگین بیان شده‌اند. تعداد موش صحرائی در هر گروه ٦ سر می‌باشد.

اثر پرکاری تیروئید برغلظت سرمی و کبدی NOx

میزان سرمی و کبدی NOx در گروه پرکاری تیروئید به طور معنی‌داری از گروه شاهد بیشتر بود (نمودار۱).

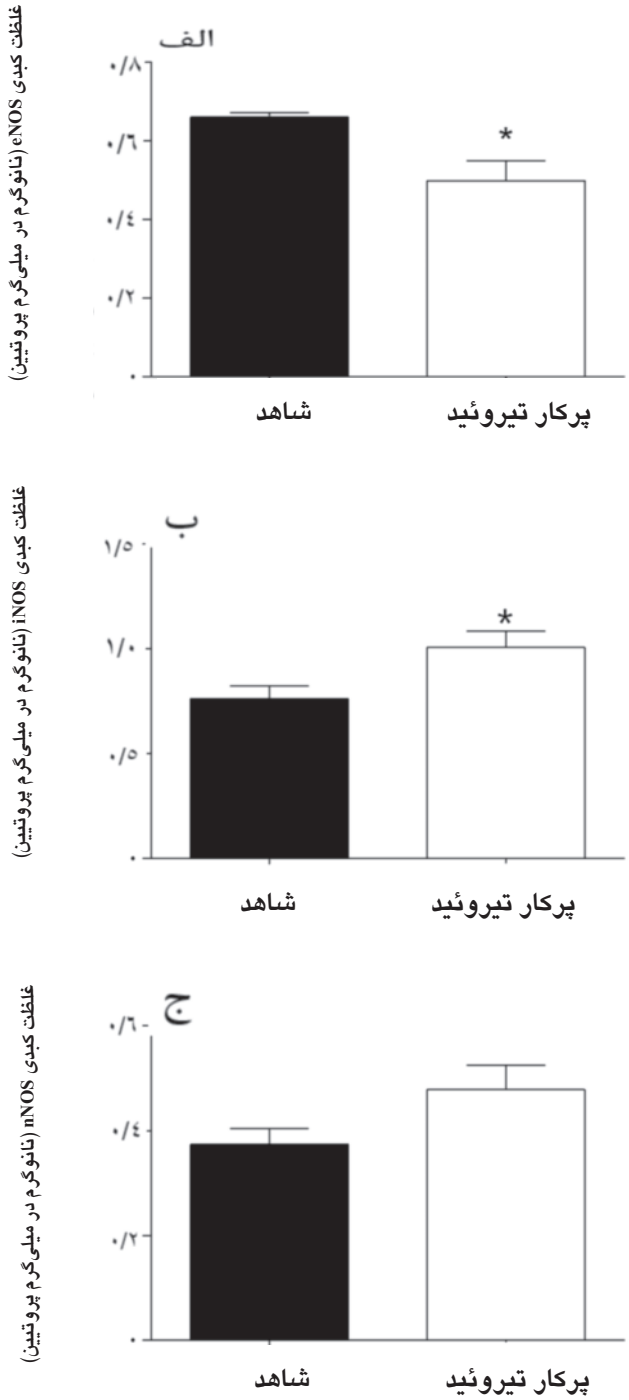


نمودار ۱- اثر پرکاری تیروئید بر غلظت متابولیت‌های اکسید نیتریک (NOx) در سرم (الف) و بافت کبد (ب). یافته‌ها به صورت میانگین±انحراف استاندارد از میانگین بیان شده‌اند. *مقدار P کمتر از ۰/۰۵ در مقایسه با گروه شاهد. تعداد موش صحرایی در هر گروه ۶ سر می‌باشد.

i- Phosphate buffered saline
ii- Griess
iii- Independent Samples t-test
iv- Spearman

اثر پرکاری تیروئید بر غلظت پروتیین آنزیم های تولیدکننده‌ی اکسید نیتریک در کبد

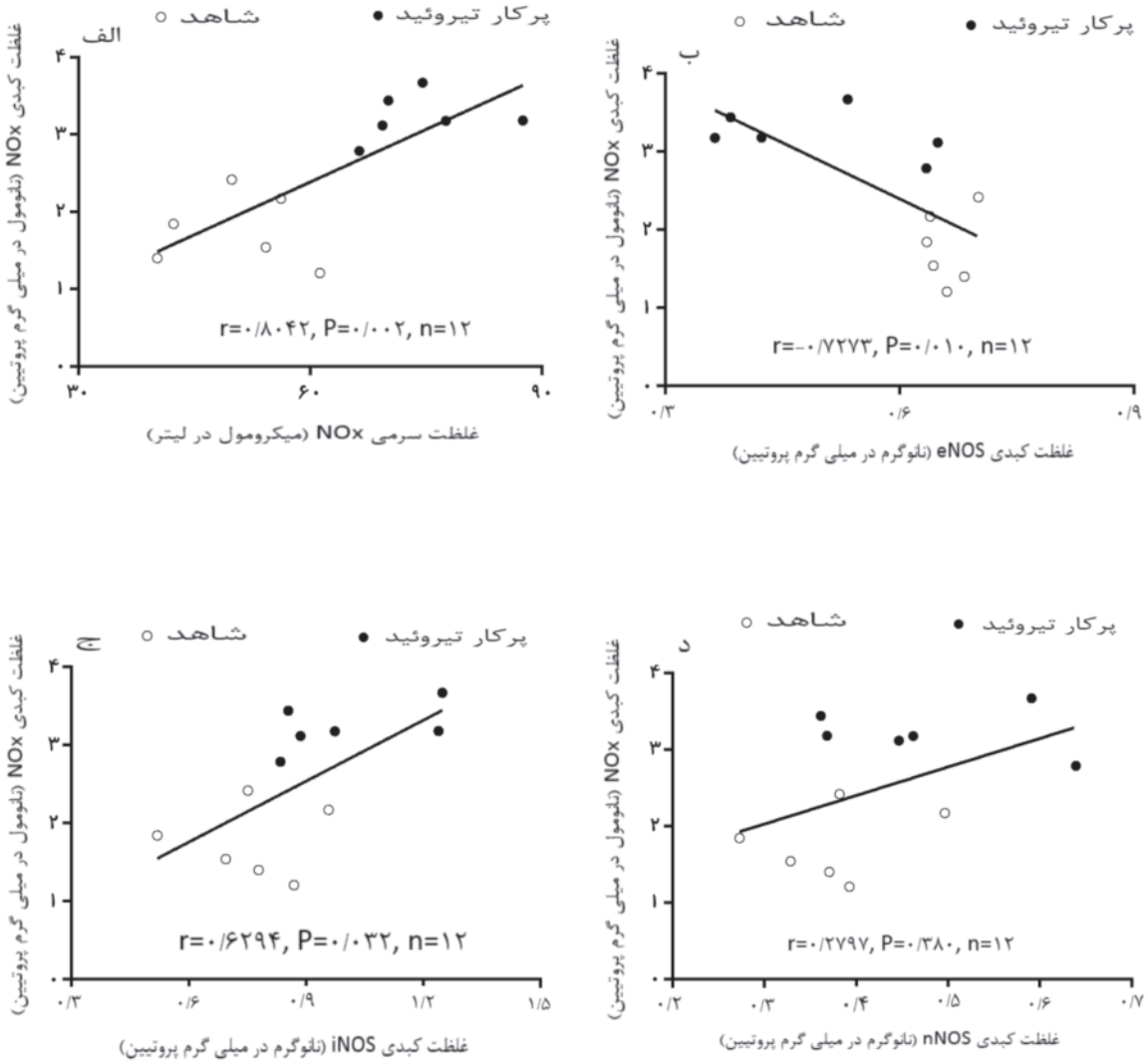
پرکاری تیروئید موجب کاهش ۳۱ درصدی (P=۰/۰۰۶) غلظت پروتیین eNOS و افزایش ۲۶ درصدی (P=۰/۰۲۰) غلظت پروتیین iNOS در بافت کبد موش‌های صحرایی نسبت به گروه شاهد گردید. همچنین همان‌طور که در نمودار ۲ قابل مشاهده است پرکاری تیروئید تأثیری بر غلظت پروتیین nNOS در بافت کبدی نداشت. نسبت پروتیین iNOS به eNOS در گروه کنترل برابر با ۰/۰۹±۱/۱۵ بود و پرکاری تیروئید به صورت معنی‌دار (P=۰/۰۳۷) منجر به افزایش این نسبت به ۰/۲۷±۲/۱۴ شد.



نمودار ۲- اثر پرکاری تیروئید بر غلظت پروتیین 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.

همبستگی بین غلظت کبدی NOx با غلظت سرمی NOx وآنزیم‌های 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 (P=۰/۰۰۲ و r=۰/۸۰٤). همچنین 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.



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.

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 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

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 ۱۲میلی‌گرم در لیتر می‌باشد). دوز مورد استفاده برای ایجاد پرکاری تیروئید در موش‌های صحرائی بین ۱۰ تا ۶۰۰ میکرو گرم 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.[۲۶-۲۱]

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 گومز[i] 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 تری یدوتیرونین باعث کاهش تولید NO از ال-آرژنین در بیماران با پرکاری تیروئید با افزایش ADMA[ii] 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 شدید 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 احتمالا افزایش بیان آنزیم iNOS ممکن است در افزایش غلظت NOx نقش داشته باشد.[۲۸] فرناندز[iii] 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 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.[۱۸،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-kB[v] در کبد می‌گردند که به نوبه خود می‌توانند 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[vi] ناشی از افزایش فشار خون در بستر پرکاری تیروئید باشد.[۱۲]

---

i- Gomez

ii- Asymmetric dimethylarginine

iii- Fernández

iv -Quesada

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

vi -Shear stress

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که بین غلظت کبدی NOx با غلظت پروتیین آنزیم eNOS در کبد ارتباط منفی معنی دار و با غلظت پروتیین آنزیم iNOS ارتباط مثبت معنی‌دار وجود دارد. هر سه ژنِ 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 بررسی-های بیشتری وجود دارد.[۳۳،۱۳-۱۱] در مطالعه‌ی حاضر افزایش غلظت کبدی NOx می‌تواند به علت افزایش NO مشتق شده از iNOS باشد و توجیه کننده‌ی 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[۳٤] و به نوعی توجیه کننده‌ی ارتباط منفی بین غلظت کبدی NOx با غلظت پروتیین آنزیم eNOS در کبد باشد. پرکاری تیروئید با افزایش نسبت پروتیین 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 واکنش دهنده به ویژه پِراُکسی نیتریت می‌گردد که می‌تواند به طیف وسیعی از مولکول‌های سلولی از جمله DNA، لیپیدها و پروتیین‌ها آسیب برساند و در نهایت باعث آسیب کبد و ایجاد اختلال در عملکرد کبد گردد.[۱۱]

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 ازجمله سیستم قلبی عروقی می‌تواند منجر به اختلال عملکرد آن‌ها نیز گردد.[۳۵] 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 پروتیین 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 منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

1. 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.
2. 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.
3. De Leo S, Lee SY, Braverman LE. Hyperthyroidism. Lancet 2016; 388: 906-18.
4. Khemichian S, Fong TL. Hepatic dysfunction in hyperthyroidism. Gastroenterol Hepatol (N Y) 2011; 7: 337-9.
5. 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.
6. 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.
7. Udovcic M, Pena RH, Patham B, Tabatabai L, Kansara A. Hypothyroidism and the Heart. Methodist Debakey Cardiovasc J 2017; 13: 55-9.
8. 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.
9. Moncada S, Higgs E. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. Br J Pharmacol 2006; 147: S193-S201.
10. Moncada S, Higgs A, Furchgott R. International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. Pharmacol Rev 1997; 49: 137-42.
11. Iwakiri Y, Kim MY. Nitric oxide in liver diseases. Trends Pharmacol Sci 2015; 36: 524-36.
12. 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, 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 (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, 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, 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. Bagheripuor 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 NOx) 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, NOx 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