

## اثر کم‌کاری تیروئیدی جنینی بر سطح سرمی و بافتی متابولیت‌های اکسید نیتریک در زاده‌های بالغ موش‌های صحرایی نر

فاطمه مهرآذین<sup>۱</sup>، دکتر عبدالحسین شیروی<sup>۱</sup>، دکتر صالح زاهدی اصل<sup>۲</sup>، دکتر اصغر قاسمی<sup>۲</sup>

۱) گروه بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، ۲) مرکز تحقیقات فیزیولوژی غدد، پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول: تهران، ولنجک، مرکز تحقیقات غدد، پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران؛ دکتر اصغر قاسمی: e-mail: Ghasemi@endocrine.ac.ir

### چکیده

**مقدمه:** در بررسی‌های مختلف در کم‌کاری تیروئیدی کاهش سنتز اکسید نیتریک (NO) گزارش شده است. مصرف نیترات با افزایش متابولیت‌های NO یعنی نیترات و نیتريت (NOx) در سرم همراه می‌باشد. هدف پژوهش حاضر، بررسی سطح NOx در سرم و بافت‌های قلب، آنورت و ریه در زاده‌های موش‌های صحرایی مبتلا به کم‌کاری تیروئید جنینی بود. **مواد و روش‌ها:** کم‌کاری تیروئید در موش‌های ماده با استفاده از پروپیل تیواوراسیل در آب آشامیدنی (از ابتدا تا انتهای حاملگی) القا گردید. زاده‌های نر گروه کم‌کار تیروئید و کنترل، تا زمان بلوغ نگاه‌داری و به ۴ گروه تقسیم شدند: گروه-های کنترل و کم‌کاری تیروئید با تزریق نیترات سدیم (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و گروه‌های کنترل و کم‌کاری تیروئید بدون تزریق. غلظت NOx نمونه‌های سرم و بافت آن‌ها با روش گریس بررسی گردید. یافته‌ها: NOx در سرم یک ساعت بعد از تزریق نیترات در هر دو گروه به بیشینه میزان خود رسید. بعد از ساعت اول NOx سرمی در هر دو گروه کاهش یافت و شیب این کاهش در گروه کم‌کاری تیروئید جنینی بیشتر بود. در قلب و آنورت، غلظت NOx در گروه کم‌کاری تیروئید جنینی به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود. به دنبال تزریق نیترات، در گروه کنترل غلظت NOx تنها در قلب و ریه افزایش یافت، ولی در گروه کم‌کاری تیروئید جنینی در هر سه بافت افزایش مشاهده شد. نتیجه-گیری: متابولیسم NOx در موش‌های بالغ با کم‌کاری تیروئیدی جنینی با گروه کنترل متفاوت می‌باشد و هورمون‌های تیروئیدی در متابولیسم NOx نقش اساسی دارند که خود را در زمان بلوغ نشان می‌دهد.

**واژگان کلیدی:** هیپوتیروئیدی جنینی، اکسید نیتریک، موش صحرایی

دریافت مقاله: ۹۱/۲/۲۴ - دریافت اصلاحیه: ۹۱/۵/۱۵ - پذیرش مقاله: ۹۱/۵/۲۲

### مقدمه

به تازگی توجه زیادی به نقش سطح بافتی نیترات و نیتريت معطوف گردیده و پیشنهاد شده نیترات و نیتريت تنها متابولیت‌های NO نیستند، بلکه خود به عنوان مولکول‌های تاثیرگذار بیولوژیک عمل می‌کنند.<sup>۱</sup> در سال ۱۹۹۴ نشان داده شد NO علاوه بر روش معمول سنتز آنزیمی به کمک آنزیم-های نیتریک اکسید سنتاز (NOS)، از نیتريت یا نیترات هم سنتز می‌گردد.<sup>۲</sup> این مسیر جدید تولید NO (مسیر نیترات - نیتريت - NO)، به ویژه در شرایط هیپوکسی فعال و به عنوان یک پشتیبان برای اطمینان از تولید NO در شرایط

اکسید نیتریک (NO) دارای نقش‌های فیزیولوژی و پاتولوژی زیادی در بدن می‌باشد.<sup>۱</sup> به دلیل نیمه عمر کوتاه، اندازه‌گیری مستقیم NO در بدن از نظر عملی دشوار است و به همین دلیل متابولیت‌های پایدار آن یعنی نیترات و نیتريت (NOx) به عنوان شاخصی از تولید NO اندازه‌گیری می-شوند.<sup>۲</sup> در پژوهش‌های متعددی ارتباط سطح سرمی NOx با بیماری‌های قلبی - عروقی و دیابت نشان داده شده است.<sup>۳،۴</sup>

## مواد و روش‌ها

موش‌های صحرایی نر و ماده از نژاد ویستار در حیوان-خانه‌ی پژوهشکده‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و چرخه‌ی روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته نگه‌داری شده‌اند. استانداردهای لازم اخلاقی در مورد روش کار حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. موش‌های نر و ماده به مدت ۲۴ ساعت در کنار یکدیگر گذاشته شدند تا جفت‌گیری انجام شود. روز بعد از جفت‌گیری روز اول بارداری در نظر گرفته شد و پس از آن یک گروه از موش‌های ماده باردار (گروه کنترل) آب آشامیدنی معمولی مصرف کردند و گروه دیگر (کم‌کاری تیروئیدی جنینی) از روز بعد جفت‌گیری تا انتهای حاملگی آب آشامیدنی حاوی پروپیل تیواوراسیل (تهیه شده از شرکت ایران - هورمون) به میزان ۰/۰۲٪ مصرف نمودند. اگر موشی باردار نشده بود از بررسی خارج می‌گردید. زاده‌های نر هر دو گروه (۱۸=تعداد در هر گروه) تا زمان بلوغ (۱۳ تا ۱۴ هفته‌گی) پی‌گیری شدند و وزن آن‌ها هر هفته اندازه‌گیری شد. در زمان بلوغ، موش‌های هر دو گروه کنترل و کم‌کاری تیروئیدی جنینی به دو دسته (۹=تعداد در هر گروه) تقسیم شدند که در یک گروه نیترا سدیم به میزان ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی تزریق گردید.<sup>۱۶،۱۷</sup> پس از ۱۶-۱۴ ساعت ناشتا بودن و تحت بیهوشی ملایم با اتر، یک نمونه‌ی خون (به حجم ۲۵۰ میکرولیتر) قبل از تزریق نیترا سدیم گرفته شد و سپس نمونه‌های دیگر در زمان‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تزریق نیترا سدیم به میزان ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی جمع-آوری گردید. در طول این مدت ۴۸ ساعت خون‌گیری حیوانات ناشتا نگه داشته شدند، دلیل ناشتا نگه داشتن حیوانات این بود که نیترا مشتق از غذا بر سطح سرمی و بافتی NOx اثر دارد.<sup>۱۴،۱۸</sup>

برای تهیه‌ی نمونه‌های بافتی از روش توصیف شده‌ی برایان و همکاران با اندکی تغییر استفاده شد.<sup>۱۹،۲۰</sup> در زاده‌های نر بالغ، پس از ۱۶-۱۴ ساعت ناشتا بودن نیترا سدیم (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی) تزریق، و یک ساعت بعد از تزریق حیوانات با تزریق

هیپوکسیک عمل می‌کند<sup>۵</sup> و ممکن است تجویز نیترا و نیتريت بتواند از راه تجدید مسیر نیترا- نیتريت- NO کاربردهای مهم درمانی و تغذیه‌ای داشته باشد.<sup>۶</sup> این اثرات از ایده‌ی نیترا درمانی برای برخی حالات بیماری حمایت می‌نماید. شواهد جدید نشان می‌دهد نیتريت اثرات مفید درمانی در هیپرپلازی اینتیمای و همچنین اثرات محافظتی بر سلول عصبی پس از ایست قلبی دارد.<sup>۷</sup>

کم‌کاری تیروئیدی به احتمال زیاد یکی از شرایطی است که در آن بافت‌ها با اختلال تولید NO مواجه هستند، زیرا هورمون‌های تیروئیدی اثر تحریکی در تولید NO دارند<sup>۸</sup> و در کم‌کاری تیروئیدی کاهش سنتز و رهاسازی NO گزارش شده است.<sup>۹</sup> NO همچنین در تنظیم عملکرد تیروئید و تنظیم عروق خونی و جریان خون غده‌ی تیروئید نقش دارد.<sup>۱۰</sup> همچنین کم‌کاری تیروئید با کاهش جریان خون برخی بافت‌ها همراه است که استفاده از نیترا می‌تواند در اصلاح آن مفید باشد.<sup>۱۱</sup>

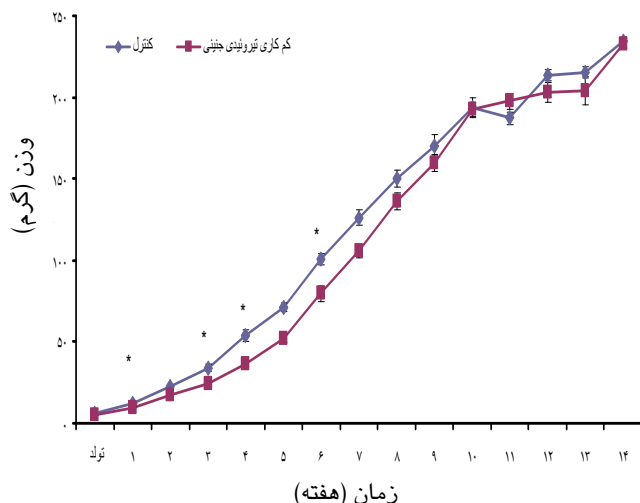
نیتريت و نیترا سرم به عنوان یک شاخص غیر مستقیم از تولید NO در بافت اندازه‌گیری می‌شود. اندازه‌گیری این فرآورده‌های نهایی یک تخمین مطمئن از تولید NO توسط بافت زنده است.<sup>۱۲</sup> اگر چه ممکن است سطح سرمی NOx در گردش، تغییرات بافتی را منعکس کند اما هنوز مشخص نشده تغییرات در NOx سرم یا پلاسما بازتابی در سایر بافت‌ها دارد.<sup>۱۳</sup> تزریق نیترا با افزایش NOx سرمی همراه می‌باشد.<sup>۱۴</sup> در ایسکمی - پرفیوژن مجدد<sup>۱</sup>، نیتريت تاثیر حفاظتی در برابر آپوپتوز اعمال می‌کند، و در میوکارد نیتريت تزریقی سبب کاهش میزان انفارکتوس تا ۶۷٪ می‌گردد.<sup>۱۵</sup>

مصرف خوراکی یا تزریق نیترا با افزایش NOx سرمی همراه می‌باشد، اما مشخص نیست تغییرات بافتی آن در بیماری‌ها چگونه است. هدف پژوهش حاضر بررسی سطح متابولیت‌های اکسید نیتریک در بافت‌های قلب، آئورت و ریه در زاده‌های موش‌های صحرایی مبتلا به کم‌کاری تیروئیدی دوران جنینی و مقایسه‌ی آن با گروه کنترل می‌باشد. همچنین، سطح سرمی و بافتی NOx در پاسخ به تزریق نیترا سدیم بررسی خواهد شد.

مقایسه‌ی بین دو گروه در هر وزن با استفاده از آزمون غیرپارامتری من - ویتنی انجام شد. مقایسه‌ی سطح زیر منحنی NOx سرمی و مقادیر بافتی NOx در گروه‌ها به صورت دو به دو با استفاده از آزمون من - ویتنی انجام شد. مقدار p کمتر از ۰/۰۵ معیار معنی‌دار بودن تفاوت‌ها تلقی گردید.

### یافته‌ها

وزن زاده‌های گروه کنترل و کم کاری تیروئیدی جنینی در زمان تولد به ترتیب  $5/95 \pm 0/08$  و  $5/32 \pm 0/10$  گرم ( $P < 0/001$ ) بود. تا هفته‌ی هفتم وزن زاده‌های گروه کنترل نسبت به کم‌کاری تیروئیدی جنینی به طور معنی‌داری بالاتر بود ولی از هفته هشتم به بعد، تفاوتی بین وزن دو گروه مشاهده نگردید (نمودار ۱).



**نمودار ۱- تغییرات وزن زاده‌های گروه کنترل و هیپوتیروئیدی جنینی از تولد تا بلوغ. از هفته‌ی هفتم وزن زاده‌های گروه کنترل نسبت به کم‌کاری تیروئیدی بالاتر بود ولی از هفته‌ی هشتم به بعد، تفاوتی وجود نداشت.\* تفاوت با گروه هیپوتیروئیدی جنینی**

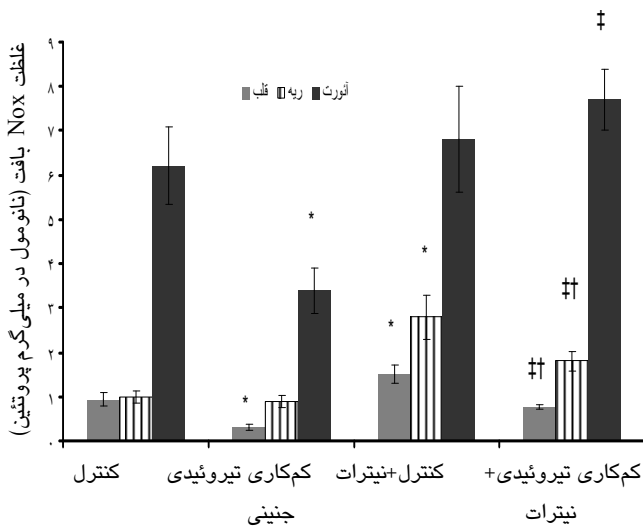
تغییرات غلظت NOx سرمی به دنبال تزریق نیترات سدیم در نمودار ۲ نشان داده شده است. قبل از تزریق نیترات سدیم تفاوتی بین NOx سرمی در دو گروه کنترل و کم‌کاری تیروئیدی جنینی وجود نداشت ( $42/1 \pm 3/2$ ) در مقابل  $44/7 \pm 7/8$  میکرومول در لیتر). NOx سرمی در هر دو گروه یک ساعت بعد از تزریق نیترات به بیشینه‌ی میزان خود رسید که افزایش حدود  $4/8$  برابری را نسبت به مقادیر پایه نشان داد. بعد از ساعت اول NOx سرمی در هر دو گروه کاهش یافت و شیب این کاهش در گروه کم‌کاری تیروئیدی

داخل صفاقی پنتوباربیتال سدیم<sup>i</sup> ( $60$  میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند.<sup>۲۰</sup> پس از باز کردن قفسه‌ی سینه، سوزن ( $23$  G) در بطن چپ قرار داده شد و محلول بافر فسفات سرد ( $0/1$  مول) حاوی N-اتیل مالاماید<sup>ii</sup> (NEM) ( $10$  میلی‌مولار) و EDTA ( $2/5$  میلی‌مولار) با  $pH=7/4$  که از قبل اکسیژن‌دهی شده بود، تزریق گردید. اوریکل راست قطع شد تا خون از این راه تخلیه شود. پس از  $3$  دقیقه پرفیوژن، قلب، ریه و آئورت برداشته شد و در نیتروژن مایع غوطه‌ور گردید. سپس بافت‌ها در قطعات کوچک برش داده شده و در بافر پرفیوژن با نسبت وزنی - حجمی  $5$  به  $1$  با دستگاه هموژنایزر و سونیکاتور هموژن گردیدند. غلظت پروتئین در هموژن با روش برادفورد اندازه‌گیری<sup>۲۱</sup> و از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد.

برای اندازه‌گیری NOx از روش رنگ‌سنجی گریس استفاده شد.<sup>۲۲</sup> برای این کار نمونه‌های سرمی یا هموژن بافتی با استفاده از سولفات روی پروتئین‌زدایی گردیدند. نمونه‌های سرمی پس از اضافه کردن سولفات روی ( $15$  میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر) به مدت  $10$  دقیقه در  $10000$  دور سانتریفوژ شدند. در مورد نمونه‌های بافتی، ابتدا هموژن به مدت  $20$  دقیقه در  $15000$  دور در دمای  $4$  درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ، و پس از اضافه کردن سولفات روی دوباره سانتریفوژ شدند. سپس به  $100$  میکرولیتر از محلول بالایی سانتریفوژ،  $100$  میکرولیتر محلول کلرید وانادیوم III ( $8$  میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر) اضافه شد تا نیترات را به نیتريت احیا کند. بعد محلول گریس شامل  $50$  میکرولیتر سولفانیل آمید ( $2\%$ ) و  $50$  میکرولیتر اتیلین دی‌آمید دی‌هیدروکلرید ( $0/1\%$ ) اضافه گردید، و  $30$  دقیقه در  $37$  درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس رنگ به دست آمده در طول موج  $540$  نانومتر خوانده و جذب نمونه‌ها با جذب استاندارد ( $0$  تا  $100$  میکرومولار نیترات سدیم) مقایسه، و غلظت نمونه‌ها محاسبه شد. ضریب تغییرات درون و برون آزمونی برای اندازه‌گیری NOx به ترتیب  $6/0$  و  $11/3\%$  بود.

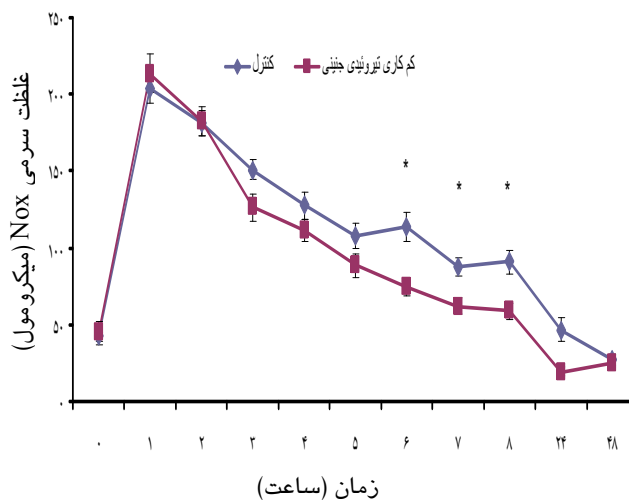
آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. یافته‌های کمی به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند. از آنالیز واریانس دو طرفه برای مقایسه‌ی وزن حیوانات، و همچنین بررسی تغییرات NOx سرم در دو گروه کنترل و هیپوتیروئیدی جنینی در طول زمان استفاده شد و

i- Sodium pentobarbital  
ii- N-ethylmaleimide



نمودار ۳- غلظت NOx در بافت‌های قلب، آئورت و ریه، ۱ ساعت بعد از تزریق داخل صفاقی ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن نیترات سدیم در گروه‌های کنترل و هیپوتیروئیدی جنینی. \* تفاوت با گروه کنترل، † تفاوت با گروه کنترل با تزریق نیترات سدیم، ‡ تفاوت با گروه هیپوتیروئیدی جنینی

جنینی بیشتر بود، به طوری از ۶ ساعت بعد از تزریق نیترات سدیم تا ۲۴ ساعت بعد، NOx سرم در گروه کم کاری تیروئیدی جنینی به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود. ۴۸ ساعت بعد از تزریق نیترات، سطح NOx سرم در دو گروه تفاوتی نداشت و به ترتیب در گروه کنترل و کم کاری تیروئیدی جنینی ۲۶ و ۴۵٪ کمتر از مقادیر پایه بود.



جدول ۱- همبستگی بین سطح NOx بافت و سرم

گروه		کنترل		هیپوتیروئیدی جنینی	
بافت	ضریب همبستگی	مقدار P	ضریب همبستگی	مقدار P	ضریب همبستگی
قلب	۰/۲۳	۰/۵۲۱	۰/۶۷	۰/۰۹۷	
ریه	۰/۵۸	۰/۰۷۵	۰/۷۳	۰/۰۱۶	
آئورت	۰/۶۱	۰/۱۰۴	۰/۸۴	۰/۰۰۵	

\* مقدار P < ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار است.

نمودار ۲- تغییرات غلظت NOx سرم به دنبال تزریق داخل صفاقی ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن نیترات سدیم در گروه‌های کنترل و هیپوتیروئیدی جنینی. \* تفاوت با گروه هیپوتیروئیدی جنینی

مقایسه‌ی غلظت NOx، ۱ ساعت بعد از تزریق نیترات سدیم در بافت‌های قلب، ریه و آئورت در نمودار ۳ نشان داده شده است. در قلب و آئورت غلظت NOx در گروه کم کاری تیروئیدی جنینی به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود، در حالی‌که در ریه تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. به دنبال تزریق نیترات، در گروه کنترل غلظت NOx تنها در قلب و ریه افزایش نشان داد، ولی در گروه کم کاری تیروئیدی جنینی در هر سه بافت افزایش مشاهده شد. غلظت NOx در قلب و ریه در گروه کم کاری تیروئیدی جنینی که تزریق نیترات داشتند در مقایسه با گروه کنترل که تزریق نیترات نداشتند، به طور معنی‌داری کمتر بود.

در گروه کنترل همبستگی معنی‌داری بین NOx سرم و بافت وجود نداشت، ولی در گروه کم کاری تیروئیدی جنینی همبستگی مثبت و معنی‌داری بین NOx سرم و بافت در ریه و آئورت مشاهده شد، و در قلب نیز همبستگی مثبت به دست آمد، اما نزدیک به سطح معنی‌داری بود (جدول ۱).

### بحث

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد سطح NOx در بافت‌های قلب، ریه و آئورت در زاده‌های گروه کم کاری تیروئیدی جنینی پایین‌تر از گروه کنترل بود. به دنبال تزریق نیترات سطح NOx بافتی در هر دو گروه افزایش نشان داد، اما در گروه کم کاری تیروئیدی جنینی کمتر از کنترل بود.

در بررسی کنونی برای ایجاد کم کاری تیروئیدی جنینی پروپیل تیواوراسیل در سراسر دوره‌ی حاملگی در آب آشامیدنی مصرف شد. براساس تجربه‌ی قبلی در همین آزمایشگاه،<sup>۲۲</sup> مصرف پروپیل تیواوراسیل در دوران حاملگی سبب ایجاد کم کاری تیروئیدی در مادران و همچنین نوزادان تازه متولد شده می‌شود، اما سطح سرمی هورمون‌های تیروئیدی در زاده‌های بالغ طبیعی می‌شود.

در بررسی حاضر، وزن نوزادان متولد شده در گروه کم‌کاری تیروئیدی جنینی کمتر از نوزادان کنترل بود که با یافته‌های بررسی‌های دیگر هم‌خوانی دارد.<sup>۲۳-۲۵</sup> در پژوهش حاضر، وزن زاده‌های گروه کم‌کاری تیروئیدی جنینی از تولد تا هفته‌ی هفتم کمتر از گروه کنترل بود و پس از آن تفاوتی نداشت. بر خلاف یافته‌های به دست آمده، هامولی سعید و همکاران نشان داده‌اند وزن زاده‌های گروه کم‌کاری تیروئیدی از هفته‌ی اول تا چهارم تفاوتی با گروه کنترل نداشت، ولی از هفته‌ی چهارم به بعد کمتر از گروه کنترل بوده است.<sup>۲۴</sup>

سطح پایه‌ی NOx سرم در دو گروه کنترل و کم‌کاری تیروئیدی جنینی تفاوتی نداشت و در هر دو گروه یک ساعت بعد از تزریق نیترات به بیشینه‌ی میزان خود رسید، این یافته با یافته‌های بررسی‌های دیگر هم‌خوانی دارد. ساکمی و همکاران نشان دادند یک ساعت بعد از تزریق داخل صفاقی نیترات سدیم (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم)، غلظت NOx سرمی در موش‌های ویستار به ۲۴۰ میکرومول در لیتر رسیده است.<sup>۱۷</sup> کارل استروم و همکاران نیز نشان دادند یک ساعت بعد از تزریق داخل صفاقی نیترات سدیم (۸/۴ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) به موش آزمایشگاهی غلظت NOx سرمی به بیشینه مقدار خود رسیده است.<sup>۱۶</sup> پس از ساعت اول تا ۲۴ ساعت NOx سرمی در گروه کم‌کاری تیروئیدی جنینی کمتر از گروه کنترل بود. ۴۸ ساعت بعد از تزریق نیترات، سطح NOx سرم در دو گروه مشابه بود. پژوهش‌ها نشان داده‌اند نیمه عمر نیترات در خون ۵ تا ۸ ساعت است<sup>۲۶</sup> و نیترات افزایش یافته در حدود ۵ نیمه عمر یعنی بین ۲۵ تا ۴۰ ساعت از خون پاک می‌شود،<sup>۲۷</sup> که با یافته‌های بررسی حاضر هم‌خوانی دارد. علت کمتر شدن NOx سرم در مقایسه با قبل از تزریق ممکن است ناشناختن بودن حیوانات باشد، زیرا نشان داده شده به دنبال ۲۴ ساعت ناشتا بودن موش‌های صحرایی، سطح NOx سرم ۶۰ تا ۸۰٪ کاهش می‌یابد.<sup>۱۳</sup>

در پژوهش حاضر زاده‌های گروه کم‌کاری تیروئیدی NOx کمتری در بافت آئورت در مقایسه با گروه کنترل داشتند. بر اساس این یافته‌ها گزارش شده فعالیت آنزیم NOS در آئورت موش‌های کم‌کاری تیروئیدی کمتر از گروه کنترل بوده،<sup>۲۸</sup> همچنین گشادی رگی ناشی از استیل کولین در بیماران مبتلا به کم‌کاری تیروئیدی تحت بالینی کمتر بوده است.<sup>۲۹</sup> همچنین در کم‌کاری تیروئید شل شدن رگی وابسته به اندوتلیوم در موش مختل می‌شود.<sup>۱۱</sup>

کمتر بودن سطح بافتی NOx در زاده‌های کم‌کاری تیروئید ممکن است در تغییرات مقاومت عروق محیطی نقش داشته باشد.<sup>۲۸</sup> در بافت ریه تفاوتی بین سطح ریوی NOx در دو گروه مشاهده نشد. یافته‌ای برای مقایسه این نتیجه پیدا نشد، اما گزارش شده تیروئیدکومی سبب کاهش تولید NO توسط فاگوسیت‌های ریوی در محیط کشت می‌شود، اما تعداد فاگوسیت‌ها در ریه مبتلایان به کم‌کاری تیروئیدی کمتر است.<sup>۲۰</sup> در پژوهش حاضر سطح NOx در بافت قلبی زاده‌های کم‌کاری تیروئید کمتر از گروه کنترل بود. بر اساس این یافته‌ها گزارش شده کم‌کاری تیروئیدی سبب کاهش فعالیت و بیان پروتئین NOS در دهلیز قلبی در موش صحرایی می‌گردد.<sup>۳۱</sup> برخلاف یافته‌های پژوهش حاضر، گزارش شده کم‌کاری تیروئیدی سبب افزایش فعالیت نیتریک اکساید سنتاز در قلب موش صحرایی می‌گردد.<sup>۳۲</sup> در پژوهش حاضر به دنبال تزریق نیترات سطح NOx در بافت‌های قلب و ریه افزایش نشان داد، اما در بافت آئورت تغییری نداشت. شاید علت این مورد بالاتر بودن سطح پایه NOx در بافت آئورت در مقایسه با دیگر بافت‌ها باشد.<sup>۱۹</sup> در گروه کم‌کاری تیروئیدی تزریق نیترات منجر به افزایش سطح NOx در هر سه بافت گردید، و ممکن است ناشی از این مورد باشد که NOx سرمی در صورت کافی بودن می‌تواند به عنوان مخزنی برای بافت‌ها عمل نماید.<sup>۳۳</sup> در پژوهش حاضر در موش‌هایی با کم‌کاری تیروئید NOx در بافت‌های قلب و آئورت کاهش نشان داد اما در ریه تغییری نداشت. علت این مورد مشخص نیست اما گزارش شده در کم‌کاری تیروئید فعالیت آنزیم NOS در بافت‌های مختلف تغییر هم‌جهتی ندارد، به طوری‌که در برخی بافت‌ها کاهش و در برخی دیگر افزایش می‌یابد.<sup>۲۸</sup> همچنین، در موش‌های کنترل نیز سطح پایه NOx در بافت‌های مختلف متفاوت است.<sup>۱۹</sup>

در پژوهش حاضر در گروه کنترل همبستگی معنی‌داری بین NOx سرم و بافت مشاهده نشد، اما در گروه کم‌کاری تیروئیدی جنینی همبستگی مثبت و معنی‌داری بین NOx سرم و بافت وجود داشت. ساکمی و همکاران همبستگی مثبت و معنی‌داری بین NOx سرم و بافت ریه، ۱ ساعت بعد از تجویز نیترات گزارش کرده‌اند.<sup>۱۷</sup> همچنین، همبستگی مثبتی بین سطح پلاسمایی و قلب NOx در موش به دنبال تجویز خوراکی نیتريت مشاهده شده است.<sup>۱۴</sup> شواهدی وجود دارد که سطح NOx بافتی در ابتدا به دنبال افزایش NOx سرم بالا می‌رود، اما بعد به سرعت به سطح پایه باز می‌گردد،<sup>۳۳</sup> ممکن

در پیشگیری از عوارض قلبی - عروقی در کم کاری تیروئید نقش داشته باشد.

سپاسگزاری: پژوهش حاضر با حمایت مالی پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم (طرح شماره ۲۵۰) انجام شده و داده‌های ارایه شده بخشی از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد خانم مهرآذین می‌باشد. نویسندگان از خانم‌ها کربلایی و مرادی، آقایان زاهدی و کشاورز به خاطر کمک در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## References

- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298 (Pt 2): 249-58.
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001; 5: 62-71.
- Aydin A, Orhan H, Sayal A, Ozata M, Sahin G, Isimer A. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clin Biochem* 2001; 34: 65-70.
- Higashino H, Tabuchi M, Yamagata S, Kurita T, Miya H, Mukai H, et al. Serum nitric oxide metabolite levels in groups of patients with various diseases in comparison of healthy control subjects *Journal of Medical Sciences* 2010; 10: 1-11.
- Lundberg JO, Gladwin MT, Ahluwalia A, Benjamin N, Bryan NS, Butler A, et al. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. *Nat Chem Biol* 2009; 5: 865-9.
- Lundberg JO, Weitzberg E. The biological role of nitrate and nitrite: the times they are a-changin'. *Nitric Oxide* 2010; 22: 61-3.
- Kevil CG, Lefer DJ. Nitrite and nitrate: from bench to bedside. *Nitric Oxide* 2012; 26: 195-6.
- 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.
- Vargas F, Montes R, Sabio JM, Garcia-Estan J. Role of nitric oxide in the systemic circulation of conscious hyper- and hypothyroid rats. *Gen Pharmacol* 1994; 25: 887-91.
- Fellet AL, Arza P, Arreche N, Arranz C, Balaszczuk AM. Nitric oxide and thyroid gland: modulation of cardiovascular function in autonomic-blocked anaesthetized rats. *Exp Physiol* 2004; 89: 303-12.
- McAllister RM, Albarracin I, Jasperse JL, Price EM. Thyroid status and endothelium-dependent vasodilation in skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: R284-91.
- Ghasemi A, Zahedi Asl S, Mehrabi Y, Saadat N, Azizi F. Serum nitric oxide metabolite levels in a general healthy population: relation to sex and age. *Life Sci* 2008; 83: 326-31.
- Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 645-57.
- Raat NJ, Noguchi AC, Liu VB, Raghavachari N, Liu D, Xu X, et al. Dietary nitrate and nitrite modulate blood and organ nitrite and the cellular ischemic stress response. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 510-7.
- Duranski MR, Greer JJ, Dejam A, Jaganmohan S, Hogg N, Langston W, et al. Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver. *J Clin Invest* 2005; 115: 1232-40.
- Carlstrom M, Larsen FJ, Nystrom T, Hezel M, Borniquel S, Weitzberg E, et al. Dietary inorganic nitrate reverses features of metabolic syndrome in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 17716-20.
- Sakemi K, Ohno Y, Tsuda M. [NO<sub>2</sub>-/NO<sub>3</sub>- levels in blood and principal organs in rats treated with lipopolysaccharide]. *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku* 1998: 101-6.
- Ghasemi A, Zahediasl S. Preanalytical and analytical considerations for measuring nitric oxide metabolites in serum or plasma using the Griess method. *Clin Lab* 2012; 58: 615-24.
- Bryan NS, Rassaf T, Maloney RE, Rodriguez CM, Saijo F, Rodriguez JR, et al. Cellular targets and mechanisms of nitrosylation: an insight into their nature and kinetics in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 4308-13.
- Mani AR, Ebrahimkhani MR, Ippolito S, Ollosson R, Moore KP. Metalloprotein-dependent decomposition of S-nitrosothiols: studies on the stabilization and measurement of S-nitrosothiols in tissues. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 1654-63.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- Ghasemi A, Hedayati M, Biabani H. Protein precipitation methods evaluated for determination of serum nitric oxide end products by the Griess assay. *JMSR* 2007; 2: 43-6.
- Farahani H, Ghasemi A, Roghani M, Zahediasl S. The effect of maternal hypothyroidism on the carbohydrate metabolism and insulin secretion of isolated islets in adult male offspring of rats. *Horm Metab Res* 2010; 42: 792-7.
- Hamouli-Said Z, Tahari F, Hamoudi F, Hadj-Bekkouche F. Comparative study of the effects of pre and post natal administration of a thyroid drug on testicular activity in adult rat. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; 45 Suppl 1: S51-7.
- Cooke PS, Kirby JD, Porcelli J. Increased testis growth and sperm production in adult rats following transient neonatal goitrogen treatment: optimization of the propylthiouracil dose and effects of methimazole. *J Reprod Fertil* 1993; 97: 493-9.
- Ghasemi A, Zahediasl S. Is nitric oxide a hormone? *Iran Biomed J* 2011; 15: 59-65.

است بافت‌های مختلف از نظر زمان افزایش و برگشت به حالت پایه NOx متفاوت عمل کنند.

یافته‌ها نشان می‌دهد سوخت و ساز NOx در کم کاری تیروئید متفاوت از گروه کنترل است، و هورمون‌های تیروئیدی در شکل‌گیری متابولیسم NOx نقش دارند که خود را در زمان بلوغ نشان می‌دهد. درمان با نیترات ممکن است

27. Zeballos GA, Bernstein RD, Thompson CI, Forfia PR, Seyedi N, Shen W, et al. Pharmacodynamics of plasma nitrate/nitrite as an indication of nitric oxide formation in conscious dogs. *Circulation* 1995; 91: 2982-8.
28. 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.
29. Taddei S, Caraccio N, Virdis A, Dardano A, Versari D, Ghiadoni L, et al. Impaired endothelium-dependent vasodilatation in subclinical hypothyroidism: beneficial effect of levothyroxine therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3731-7.
30. Huffman LJ, Judy DJ, Rao KM, Frazer DG, Goldsmith WT. Lung responses to hypothyroidism, hyperthyroidism, and lipopolysaccharide challenge in rats. *J Toxicol Environ Health A* 2000; 61: 623-39.
31. Sarati LI, Martinez CR, Artes N, Arreche N, Lopez-Costa JJ, Balaszczuk AM, et al. Hypothyroidism: age-related influence on cardiovascular nitric oxide system in rats. *Metabolism* 2012; 61: 1301-11.
32. Ratajczak P, Oliviero P, Marotte F, Kolar F, Ostadal B, Samuel JL. Expression and localization of caveolins during postnatal development in rat heart: implication of thyroid hormone. *J Appl Physiol* 2005; 99: 244-51.
33. Bryan NS. Nitrite in nitric oxide biology: cause or consequence? A systems-based review. *Free Radic Biol Med* 2006; 41: 691-701.

Original Article

# The Effect of Fetal Hypothyroidism on the Serum and Tissue Levels of Nitric Oxide Metabolites in Adult Male Hypothyroid Progeny

Mehrazin F<sup>1</sup>, Shiravi A<sup>1</sup>, Zahediasl S<sup>2</sup>, Ghasemi A<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biology Department, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, <sup>2</sup>Endocrine Physiology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran

e-mail: [Ghasemi@endocrine.ac.ir](mailto:Ghasemi@endocrine.ac.ir)

Received: 13/06/2012 Accepted: 13/08/2012

## Abstract

**Introduction:** Decreased Nitric oxide (NO) synthesis has been reported in hypothyroidism. Nitrate consumption is associated with increased serum NO metabolites, nitrate and nitrite (NOx). The aim of this study was to evaluate NOx levels in serum and heart, aorta, and lung tissues of the offspring of hypothyroid rats. **Materials and Methods:** Hypothyroidism was induced in female rats using 6-n-propylthiouracil in drinking water from the beginning to the end of gestation. Fetal male offspring with and without fetal hypothyroidism were followed until adulthood and then divided into four groups including the control and hypothyroidism groups with injection of sodium nitrate (10 mg/kg, ip), and the control and hypothyroidism groups without injection. NOx concentrations in serum and tissue samples were measured using the Griess assay. **Results:** Serum NOx concentrations in both groups reached a maximum one hour after nitrate injection. NOx level decreased in both groups after the first hour with a steeper slope in fetal hypothyroid rats. Heart and aorta NOx concentrations were significantly lower than controls in fetal hypothyroid group. Following nitrate injection, the NOx concentration in the controls group increased in the heart and lung tissues, but significant increases were observed in all three tissues in the fetal hypothyroid group. **Conclusion:** NOx metabolism differs in fetal hypothyroid and control rats and the role of thyroid hormones in NOx metabolism persists until adulthood.

**Keywords:** Fetal hypothyroidism, Nitric oxide, Rat