View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد / دوره اول، شماره ۳ / ۳۶-۳۰/ پاییز ۱۳۷۸

اثر هیپوتیروئیدیسم تجربی بر فعالیت آنزیمهای هگزوکیناز، لاکتات دهیدروژناز و آکونیتاز در مغز Rat در طول رشد

مرتضی نیکوکار*

چکیده:

مطالعات انجام شده بر روی تأثیر هورمونهای تیروئیدی در رشد دستگاه عصبی بیانگر نقش عظیم این هورمونها در تکامل بافت مذکور می‌باشد. از آنجا که گلوکز منبع اصلی تولید انرژی در مغز می‌باشد. در این تحقیق اثر کاهش هورمونهای تیروئید بر روی فعالیت آنزیمهای هگزوکیناز، لاکتات دهیدروژناز و آکونیتاز همراه با اندازه‌گیری غلظت گلوکز و گلیکوژن در مغز Rat مورد بررسی قرار گرفت. نتایج، نشان دهنده عدم تغییر در فعالیت آنزیم آکونیتاز، کاهش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز و افزایش فعالیت آنزیم هگزوکیناز می‌باشد. میزان گلیکوژن در تمام مراحل رشد و گلوکز تنها در سن بلوغ افزایش نشان می‌دهد. کاهش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز و عدم تغییر در فعالیت آنزیم آکونیتاز می‌تواند بیانگر کاهش فعالیت مسیر گلیکولیز باشد، در حالی که افزایش فعالیت آنزیم هگزوکیناز بیانگر افزایش برداشت گلوکز توسط این بافت در کم‌کاری تجربی غده است. با توجه به عدم افزایش فعالیت مسیر گلیکولیز علیرغم برداشت زیاد گلوکز توسط این بافت و افزایش ذخیره گلیکوژن در هیپوتیروئیدیسم تجربی، می‌توان به افزایش فعالیت مسیر متابولیکی گلیکوژنز در این حالت توجه نمود. از آنجا که سلولهای مغزی در حالت عادی دارای ذخیره گلیکوژن نمی‌باشند، شاید بتوان ذخیره زیاد گلیکوژن در این بافت را در بروز اختلالات مغزی در هیپوتیروئیدیسم مؤثر دانست.

واژه‌های کلیدی: هیپوتیروئیدیسم، هگزوکیناز، لاکتات دهیدروژناز، آکونیتاز، متی‌مازول

مقدمه:

مطالعات نشان می‌دهد که اثر هورمونهای غده تیروئید بر رشد سلسله اعصاب، حائز اهمیت بسیار است و آثاری که از کمبود این هورمونها در مغز به وجود می‌آید، در هیچ بافتی به این اندازه عمیق و غیر قابل جبران نیست (۱۰). تحقیقات متعددی بیانگر این امر می‌باشد که کاهش هورمونهای تیروئید، با عدم رشد سلولهای مغزی همراه می‌باشد (۴)، و تیروکسین بر روی رشد و نمو قسمتهای مختلف مغز، مخصوصاً مخچه مؤثر است (۸). با آن که هورمونهای غده تیروئید و هورمون رشد هر دو برای رشد عمومی بدن لازم می‌باشند، اما وجود تیروکسین برای رشد سلولهای مغز کاملاً ضروری بوده و کاهش در ترشح این هورمون در دوران اول زندگی، رشد مغز را شدیداً به تأخیر می‌اندازد. در حالی که این اثر در مورد کاهش هورمون رشد مشاهده نمی‌شود (۳).

هورمونهای تیروئیدی باعث افزایش مصرف اکسیژن در تمام بافتهای بدن به استثنای مغز، بیضه و طحال می‌شوند (۶)، با توجه به این امر که منبع اصلی تأمین انرژی در بافت عصبی، گلوکز می‌باشد (۷)، مطالعه متابولیسم این ترکیب در کاهش سنتز هورمونهای

*عضو هیأت علمی گروه بیوشیمی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 13:01 +0330 on Saturday September 23rd 2017

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 13:01 +0330 on Saturday September 23rd 2017

تیروئیدی، می‌تواند اهمیت نقش این هورمونها را بر روی متابولیسم انرژی در مغز نشان دهد. در این بررسی فعالیت آنزیم هگزوکیناز، لاکتات دهیدروژناز و آکونیتاز همراه با میزان تغییرات گلوکز و گلیکوژن در بافت مغز هموژن شده در طول رشد در هیپوتیروئیدیسم تجربی در مقایسه با حالت طبیعی مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی فعالیت آنزیم هگزوکیناز در راستای نقش این آنزیم در برداشت گلوکز در بافت مغز و فعالیت مسیر متابولیکی گلیکولیز و آنزیمهای لاکتات دهیدروژناز و آکونیتاز در جهت ورود یا عدم ورود اسید پیرویک حاصل از مسیر متابولیکی به داخل سیکل کربس می‌باشد.

مواد و روشها:

Ratهای مورد استفاده در این آزمایش از نژاد Wistar و به نام علمی Rattus norvegicus بودند. این بررسی بر روی ۲ گروه Rat (گروه اول تحت تأثیر داروی متی‌مازول و به میزان ۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و گروه دوم به عنوان کنترل تحت تزریق سرم فیزیولوژی) و در ۴ رده سنی (۱۰-۱، ۲۰-۱۱، ۳۰-۲۱، ۷۰-۶۱ روزگی) انجام گرفت. تزریق هر روز یک نوبت (ساعت ۸ صبح) و به مدت ۱۰ روز صورت پذیرفت (۱).

متی مازول یکی از داروهای ضد تیروئید و از گروه تیوآمیدها می‌باشد، که می‌تواند با جلوگیری از ترکیب ید با تیروزین‌های موجود بر روی مولکول تیروگلوبین و احتمالاً از طریق مهار آنزیم پراکسیداز، از سنتز هورمونهای تیروئیدی جلوگیری به عمل آورد (۹).

بررسی بر روی forebrain انجام گرفت که نیمی از آن برای آزمایشهای آنزیمی و با استفاده از بافر فسفات سدیم به صورت هموژن در آمد و از نیم دیگر در حضور محلول دپروتئینه کننده، برای بررسی میزان گلوکز و گلیکوژن هموژن تهیه شد. از روش T-test نیز جهت آزمون آماری در این تحقیق استفاده گردید.

روش اندازه گیری فعالیت آنزیم هگزوکیناز (۱، ۱، ۷، ۲):

جهت بررسی فعالیت این آنزیم از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. H^+ حاصل از تأثیر این آنزیم بر روی گلوکز در حضور ATP باعث تغییر رنگ کرزول رد می‌گردد که تغییراتی به میزان ۰/۰۳۵ در طول موج ۵۰۰ نانومتر بیانگر یک میکرو مول اسید آزاد شده و یا گلوکز فسفریله می‌باشد (۲). از رابطه زیر می‌توان فعالیت مخصوص آنزیم را محاسبه نمود.

$$\text{فعالیت} = \frac{\Delta A/min}{0.035} \times \text{ضریب رقت} \quad (\mu\ mol/min/L)$$

$$\text{فعالیت مخصوص آنزیم} = \frac{\text{فعالیت}(U/L)}{\text{پروتئین}(mg/L)} \quad (\mu\ mol/mg/min)$$

نحوه اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) (۲۷، ۱، ۱، ۱):

آنزیم LDH سبب احیاء اسید پیرویک و تبدیل آن به اسید لاکتیک می‌شود که کوآنزیم آن $NADH+H^+$ است و کاهش $NADH+H^+$ و در نتیجه افزایش NAD^+ سبب کاهش جذب نور در طول موج ۳۴۰ نانومتر می‌شود که از این طریق می‌توان فعالیت آنزیم را اندازه‌گیری نمود (۲).

$$\text{فعالیت} = \frac{\Delta A/min}{6.22\times10^3} \times 10^6 \times \text{ضریب رقت} \quad (\mu mol/mg/min)$$

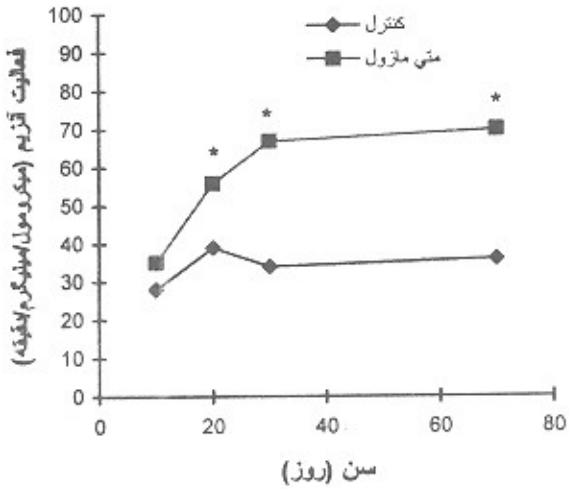
(6.22×10^3 ضریب جذب مولی و 10^6 ضریب تبدیل مولکول گرم به میکرومول می‌باشد).

$$\text{فعالیت مخصوص آنزیم} = \frac{\text{فعالیت}\ (U/L)}{\text{پروتئین}(mg/L)} \quad (\mu\ mol/mg/min)$$

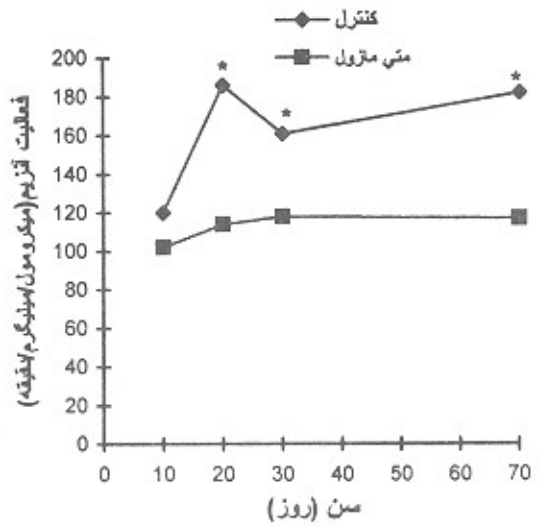
متد اندازه گیری فعالیت آنزیم آکونیتاز (۳، ۱، ۲، ۴):

آنزیم آکونیتاز طی دو مرحله اسید سیتریک را به اسید ایزوسیتریک تبدیل می‌کند که ماده حد واسط اسیدسیس آکونیتیک می‌باشد. این اسید بیشترین جذب نور را در طول موج ۲۴۰ نانومتر دارا می‌باشد که می‌توان

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 13:01 +0330 on Saturday September 23rd 2017



نمودار شماره ۱: تغییرات فعالیت آنزیم هگزوکیناز در مغز Rat در طی دوره‌های زمانی مشخص و تحت رژیم دارویی (* P<0.05)



نمودار شماره ۲: تغییرات فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در مغز Rat در طی دوره‌های زمانی مشخص و رژیم دارویی (*P<0.05)

با اندازه‌گیری تغییرات جذب نور در این طول موج فعالیت آنزیم را اندازه‌گیری نمود. افزایش جذب نور به میزان ۰/۰۰۱ در دقیقه، بیانگر تولید یک میکرومول اسید سیس‌آکونیتیک می‌باشد (۲).

$$\text{فعالیت} = \frac{\Delta A/min}{0/001} \times \text{ضریب رقت}(\mu\ mol/mg/L)$$

$$\text{فعالیت مخصوص آنزیم} = \frac{\text{فعالیت}(U/L)}{\text{پروتئین}(mg/L)}(\mu mol/mg/min)$$

روش اندازه‌گیری میزان گلوکز:

تعیین میزان گلوکز در این تحقیق با روش ارتوتولوئیدین صورت پذیرفت. مقدار جذب نور مشتق رنگی حاصل از این آزمایش در طول موج ۶۳۰ نانومتر در مقایسه با محلول استاندارد، می‌تواند مقدار گلوکز موجود در نمونه را مشخص سازد (۲).

$$\text{مقدار گلوکز} = \frac{\text{ابزوربانس آزمایش}}{\text{ابزوربانس استاندارد گلوکز}} \times \text{غلظت استاندارد گلوکز}(mg/ml)$$

روش اندازه‌گیری گلیکوژن:

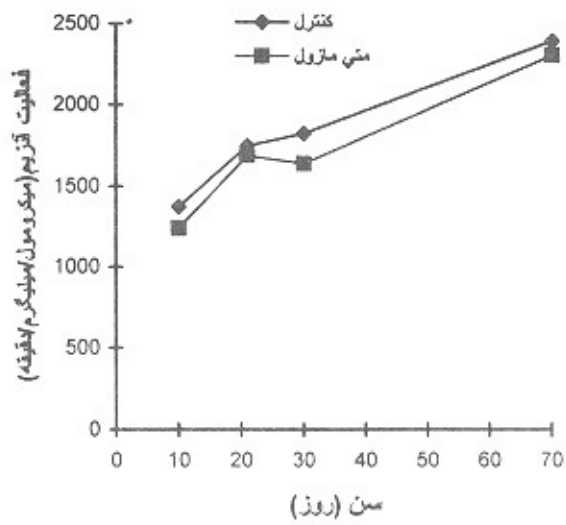
جهت تعیین مقدار گلیکوژن از تأثیر اسیدهای غلیظ بر کربوهیدراتها و تولید مشتقات فورفورال استفاده شد. این مشتقات در مجاورت فنل‌ها متراکم شده و تولید کمپلکس رنگی می‌نمایند. میزان جذب نور در طول موج ۵۲۰ نانومتر با میزان تولید این ترکیبات متناسب می‌باشد (۲).

$$\text{میزان گلوکز تام} = \frac{\text{ابزوربانس آزمایش}}{\text{ابزوربانس استاندارد گلوکز}} \times \text{غلظت استاندارد گلوکز}(mg/ml)$$

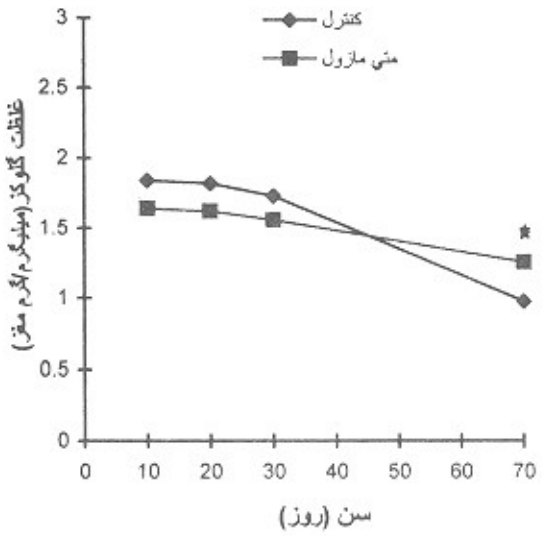
$$\text{میزان گلیکوژن مغز} = \text{میزان گلوکز تام مغز} - \text{میزان گلوکز آزاد مغز}(mg/ml)$$

روش اندازه‌گیری پروتئین:

اسید فسفومولیبدوتنگستیک می‌تواند با کمپلکس پروتئین و مس حاصل از واکنش بیوره به علت وجود اسیدهای آمینه تیروزین و تریپتوفان ترکیب شده و ایجاد رنگ آبی کند. مقدار اسید آمینه تیروزین با مقدار پروتئین متناسب بوده و با این روش می‌توان به میزان پروتئین نیز



نمودار شماره ۳: تغییرات فعالیت آنزیم آکونیتاز در مغز Rat در طی دوره‌های زمانی مشخص و رژیم دارویی



نمودار شماره ۴: تغییرات میزان گلوکز مغز Rat در طی دوره‌های زمانی مشخص و رژیم دارویی ($P<0.05$ *)

پی برد (۲). آزمایش با استفاده از اسپکتروفتومتر و در طول موج ۷۵۰ نانومتر صورت پذیرفت.

$$\text{مقدار پروتئین نمونه} = \frac{\text{ابزوربانس نمونه}}{\text{ابزوربانس استاندارد پروتئین}} \times \text{غلظت استاندارد پروتئین (mg/ml)}$$

نتایج:

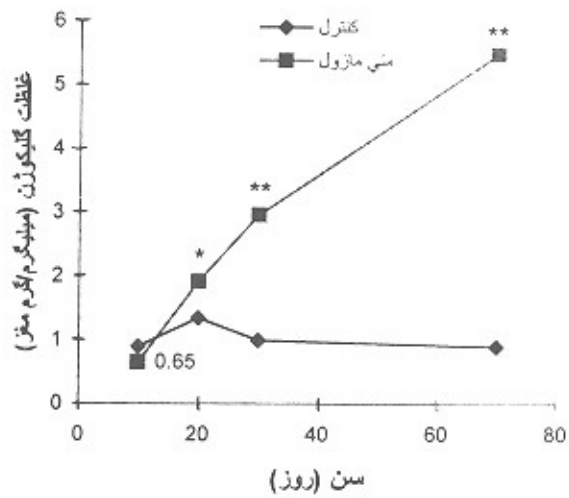
در نمودار شماره ۱ میزان تغییرات فعالیت آنزیم هگزوکیناز در مغز Rat در طول رشد در حالت هیپوتیروئیدیسم تجربی در مقایسه با کنترل نشان داده شده است. طی دوران رشد در گروه کنترل حداکثر فعالیت این آنزیم تقریباً ۲۰ روز بعد از تولد مشاهده می‌شود و بعد از آن میزان فعالیت آنزیم تا حدودی کاهش می‌یابد که از نظر آماری معنی‌دار نیست. در حالت هیپوتیروئیدیسم افزایش فعالیت این آنزیم دیده می‌شود، که میزان این افزایش در Ratهای ۱۰ روزه قابل ملاحظه نیست، ولی در Ratهای ۳۰ روزه تا حدود ۹۰٪ افزایش در فعالیت این آنزیم مشاهده می‌گردد و از آن پس می‌توان گفت که تغییرات معنی‌داری در فعالیت این آنزیم بروز نکرده است. نمودار شماره ۲ تغییرات فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز را در حالت هیپوتیروئیدیسم در مقایسه با کنترل نشان می‌دهد. مشاهده می‌شود که آنزیم LDH بیشترین افزایش فعالیت خود را در حالت طبیعی (کنترل) تقریباً در ۲۰ روز اول زندگی نشان می‌دهد و بعد از آن تغییر قابل توجهی در فعالیت این آنزیم به وجود نیامده است. میزان فعالیت این آنزیم در حالت کم‌کاری تجربی غده تیروئید در تمام طول رشد کاهش یافته است، که این کاهش تنها در ۱۰ روزگی معنی‌دار نیست و در بقیه دوران رشد قابل ملاحظه می‌باشد ($P<0.05$).

نمودار شماره ۳ تغییرات فعالیت آنزیم آکونیتاز را در طول رشد نشان می‌دهد. در هر ۲ گروه، بیشترین افزایش در فعالیت آنزیم، مربوط به ۲۰ روز ابتدای زندگی بوده و پس از این مدت افزایش در فعالیت آنزیم در هر دو گروه به آرامی و با شیبی ملایم صورت گرفته است و فعالیت آنزیم در هر دو حالت تقریباً مشابه یکدیگر می‌باشد.

مطالعه بر روی میزان گلوکز در طول رشد مغز در

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 13:01 +0330 on Saturday September 23rd 2017

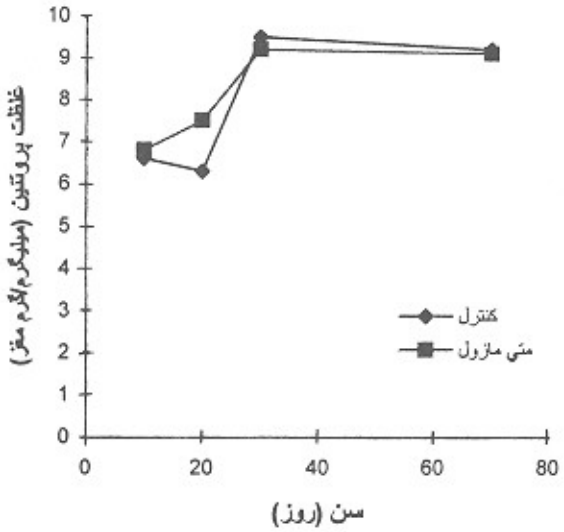
Downloaded from journal.skums.ac.ir at 13:01 +0330 on Saturday September 23rd 2017



نمودار شماره ۵: تغییرات میزان گلیکوژن مغز Rat در طی دوره‌های زمانی مشخص و رژیم دارویی($P<0.05$* $P<0.01$**)

Ratها نشان می‌دهد که یک کاهش نسبی در میزان این ترکیب به ازای افزایش سن در هر ۲ گروه وجود دارد (نمودار شماره ۴). البته بایستی در نظر داشت که این کاهش در ماه اول زندگی در Ratهای نرمال زیاد نیست ولی در حالت بلوغ (۷۰ روزگی) کاهش محسوسی را نشان می‌دهد. در حالت هیپوتیروئیدیسم میزان گلوکز در ماه اول کمی کمتر از حالت کنترل می‌باشد، ولی این امر در دوران بلوغ مشاهده نشده و اندکی افزایش در میزان آن دیده می‌شود که از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد.

نمودار شماره ۵ نمایانگر تغییرات میزان گلیکوژن در دوره‌های سنی مختلف در حالت هیپوتیروئیدیسم و نرمال می‌باشد. مقایسه Ratهای مبتلا به هیپوتیروئیدیسم با گروه کنترل بیانگر وجود یک افزایش شدید در ذخیره گلیکوژن مغزی این گروه از حیوانات می‌باشد. این میزان افزایش در روزهای ابتدای زندگی (۱۰ روزگی) دیده نمی‌شود ولی در ۲۰ روزگی به صورتی محسوس و در ۳۰ روزگی به طور قابل توجهی مشاهده می‌شود (حدود ۳ برابر). میزان این افزایش



نمودار شماره ۶: تغییرات میزان پروتئین تام مغز Rat در طی دوره‌های زمانی مشخص و رژیم دارویی

درRatهای ۷۰ روزه مبتلا به هیپوتیروئیدیسم تجربی در مقایسه با حالت کنترل بسیار چشمگیر می‌باشد و از ۰/۹ میلی‌گرم در هر گرم بافت مغز به ۵/۵ میلی‌گرم در هرگرم از این بافت می‌رسد، که افزایشی در حدود ۶ برابر می‌باشد.

نمودار شماره ۶ نیز میزان پروتئین تام مغز را در طول رشد در هر ۲ گروه نشان می‌دهد. بررسی میزان پروتئین در هر دو گروه تقریباً نشان دهنده عدم تغییر میزان این ترکیب در حالت کم کاری نسبت به کنترل می‌باشد. به طور کلی می‌توان گفت که میزان پروتئین در هر دو گروه مورد آزمایش تقریباً یکسان بوده و زیاد دستخوش تغییرات نمی‌گردد.

بحث:

بررسی میزان گلوکز به عنوان سوبسترای اصلی در متابولیسم انرژی مغز در حالت هیپوتیروئیدیسم و نرمال در توجیه و بررسی تغییرات فعالیت آنزیمهای کاتالیز کننده آن در این حالت پاتولوژیک در طول رشد مؤثر می‌باشد. آزمایشهای انجام شده بر روی میزان فعالیت

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 13:01 +0330 on Saturday September 23rd 2017

آنزیم هگزوکیناز نشان می‌دهد که این آنزیم در حالت هیپوتیروئیدیسم تجربی نسبت به کنترل دارای فعالیت بیشتری است (نمودار شماره ۱). افزایش فعالیت آنزیمهایی مانند هگزوکیناز در مغز در حالت پرکاری غده تیروئید امری طبیعی می‌باشد که به علت افزایش غلظت هورمونهای این غده و تأثیر آنها بر روی DNA در جهت افزایش سنتز آنزیم صورت می‌پذیرد (۵). اما در افزایش فعالیت این آنزیم در کم کاری غده بایستی مکانیسمهای دیگری مؤثر باشند، زیرا در این حالت غلظت هورمون به علت تزریق داروی متی‌مازول کاهش یافته است. شاید بتوان این مسئله را شبیه به افزایش فعالیت آنزیم هگزوکیناز در کمبود اکسیژن دانست. در کاهش اکسیژن فعالیت آنزیم هگزوکیناز شدیداً افزایش یافته و میزان اسید لاکتیک حاصل در مغز بعد از یک دقیقه حالت آنوکسی به ۵ تا ۸ برابر می‌رسد (۱۱). مطالعات نشان می‌دهد که در کمبود تیروکسین نیز تجزیه اکسیژن از هموگلوبین دچار اختلال می‌گردد (۲). البته در ادامه بحث مشخص خواهد شد که در حالت کم کاری غده تیروئید فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز و به عبارت دیگر تولید اسید لاکتیک دچار افزایش نخواهد شد. همانگونه که در نمودار شماره ۲ مشاهده شد، در حالت کم کاری تجربی غده تیروئید فعالیت آنزیم LDH نسبت به کنترل کاهش یافته است. این امر با توجه به نقش هورمونهای تیروئیدی در افزایش فعالیت این آنزیم (۲)، کاملاً منطقی به نظر می‌رسد. در مورد آنزیم آکونیتاز، فعالیت این آنزیم در هیپو تیروئیدیسم تجربی در مقایسه با کنترل، تغییر قابل ملاحظه‌ای را نشان نمی‌دهد. این نتیجه با توجه به عدم تأثیر هورمونهای تیروئیدی بر روی فعالیت آنزیمهای شرکت کننده، در سیکل کربس در داخل میتوکندری با کمک مغز قابل توجیه می‌باشد (۲). اما میزان ذخیره گلیکوژن در حالت کم کاری غده در حالی که در روز دهم دارای مقداری همانند گروه کنترل است.پس از آن در دوره‌های زمانی بعد افزایش چشمگیری یافته و با افزایش سن تأثیر داروی متی‌مازول در جهت سنتز گلیکوژن در مغز بیشتر می‌گردد و در ۷۰ روزگی این اختلاف بسیار معنی‌دار می‌گردد ($P<0.001$) و افزایشی در حدود ۶ برابر نسبت به حیوانات طبیعی در این سن مشاهده می‌شود. از آنجا که بافت مغز جهت تولید انرژی از ذخیره گلیکوژن استفاده نمی‌نماید (۱۱) و منبع اصلی تأمین گلوکز مصرفی، قند خون می‌باشد. پس می‌توان افزایش آنزیم هگزوکیناز را با توجه به کاهش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز و عدم تغییر فعالیت آنزیم آکونیتاز، در جهت افزایش فعالیت مسیر گلیکوژنز دانست.

میزان گلوکز تنها در Ratهای بالغ مبتلا به هیپوتیروئیدیسم افزایش نشان می‌دهد، که می‌تواند به دلیل ذخیره بیش از حد گلیکوژن در این دسته از Ratها باشد.

این افزایش گلیکوژن در بافت مغز در کم کاری تجربی غده تیروئید، شاید خود یکی از عوامل مؤثر در اختلالات مغزی در افراد مبتلا به این بیماری باشد.

منابع:

۱ـ صمتی قومن محمدصادق. اثر هورمونهای تیروئید روی فراکسیونهای مختلف چربی سرم و کبد. پایان نامه دکتری داروسازی. دانشگاه اصفهان: (۸۱)، ۱۳۶۵.

۲ـ نیکوکار مرتضی. اثر هیپرتیروئیدیسم تجربی بر فعالیت آنزیمهای هگزوکیناز، لاکتات دهیدروژناز و آکونیتاز در مغز رات در طول رشد. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ۱ (۱): ۷-۶۱، ۱۳۷۸.

3- Delong GR.; Adams RD. The neuromuscular system and brain in hypothyroidism. In: Brawerman LE.; Vtiger RD. The thyroid: From JB Lippincott Company. Philadelphia: USA, 6th ed. 1034-6, 1991.

4- Granner DK. Thyroid hormones. In: Murray RK.; Mays PA. Harpers biochemistry: From Appleton & Longe Company: USA, 24th ed. 537, 1990

5-Greengard O. Hormonal regulation of enzyme synthesies differentiating mammalian tissues. In: Hommes F.; Van Denberg CY. Normal and pathological development of energy metalolism: From Academic Press. london: UK, 55-9, 1975.

6- Greenspan F. Thyroid hormones. In: Greenspan F.; Forshan P. Basic and clinical endocrinology: From Pratic Hall International Inc. California: USA, 205, 1991.

7- Hall R. Thyroid. In: Hall R, Besser N. Fundamental of clinical endocrinology: From Longman Singapore Poblichers, 4th ed. 73, 1989.

8- Ingbar SH. The thyroid gland. In: Wilson JW, Foster DW. Williams textbook of endocrinology: From WB Saunders Company. Philadelphia: USA, 7th ed. 152, 1974.

9- Katzvng BG. Examination and bored reviw pharmacology: From Appleton and Lang Company, 3nd ed. 209-10, 1993.

10- Oppenheimer JH. Tissue and cellular effects of thyroid hormons and their mechanism of action. In: Burrow GN.; Oppenheimer JH, Volpe R. Thyroid function and disease: From WB Saunders Company. Philadelphia: USA, 94-5, 1989.

11- Vanpilsume JF. Metabolism of individual tissue. In: Devlin TM. Textbook of biochemistry with clinical correlations: From John Willey & Sons: Singapore, 837, 1986.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 13:01 +0330 on Saturday September 23rd 2017