ورزش با تردمیل از طریق مهار آپوپتوز منجر به بهبود بقاء نورونی در قشر پره‌فرونتال موش‌های صحرایی هیپوتیروئید مادرزادی می‌شود

سکینه شفیعا [۱](Ph.D)، مسلم محمدی [۲*](Ph.D)

۱- گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲- گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۱-۳۳۵۴۳۰۸۱ mohammadimo@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۵/۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۱۹

چکیده

هدف: کمبود هورمون‌های تیروئیدی در دوران تکامل می‌تواند اثرات زیان‌باری بر ساختار و عملکرد سیستم عصبی داشته باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات کمبود هورمون‌های تیروئیدی در دوران تکامل بر بقاء نورونی و بیان ژن‌های پروآپوپتوتیک Bax و آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 در قشر پره‌فرونتال موش‌های صحرایی هیپوتیروئید مادرزادی بود. نقش محافظتی احتمالی ورزش با تردمیل نیز بررسی شد.

مواد و روش‌ها: مدل هیپوتیروئید مادرزادی از طریق تیمار موش‌های صحرایی باردار نژاد ویستار با پروپیل‌تیواوراسیل (PTU) در آب آشامیدنی از روز ششم بارداری تا پایان دوره شیردهی ساخته شد. مادران کنترل در این دوره آب دریافت کردند. سپس فرزندان نر به دو گروه با/بدون تمرین چهار هفته‌ای با تردمیل تقسیم شدند. در ادامه، حیوانات قربانی شدند و قشرهای پره‌فرونتال برای بررسی بقاء نورونی و بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز (Bax و Bcl-2) به ترتیب توسط رنگ‌آمیزی کرزیل‌ویوله و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ریل‌تایم جدا شدند.

یافته‌ها: نتایج ما نشان داد کاهش بقاء نورونی با افزایش Bax و کاهش Bcl-2 در قشر پره فرونتال موش‌های صحرایی هیپوتیروئید مادرزادی همراه شد. ورزش با تردمیل توانست با کاهش Bax و افزایش Bcl-2 منجر به افزایش تعداد نورون‌های زنده شود؛ با این حال، اختلافات معنی‌دار با گروه کنترل هنوز باقی ماند.

نتیجه‌گیری: کمبود هورمون‌های تیروئیدی در زمان تکامل از طریق فعال کردن مکانیسم آپوپتوز منجر به آسیب عصبی می‌شود. ورزش می‌تواند با مهار آپوپتوز منجر به بهبود بقاء نورونی در قشر پره‌فرونتال موش‌های صحرایی هیپوتیروئید مادرزادی شود.

واژه‌های کلیدی: هیپوتیروئیدی مادرزادی، آپوپتوز، ورزش با تردمیل، قشر پره‌فرونتال، بقاء نورونی

مقدمه

هورمون‌های تیروئیدی، شامل تری‌یدوتیرونین (T_3) و تیروکسین (T_4)، در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیکی و تکاملی أکثر بافت‌های بدن نقش دارند [۱]. هورمون‌های تیروئیدی برای رشد طبیعی ضروری هستند و کمبود آن‌ها در دوران تکامل جنینی و پس از آن می‌تواند علاوه بر اختلال در رشد جسمی منجر به عقب‌ماندگی ذهنی نیز گردد [۳،۲]. هورمون‌های تیروئیدی اهمیت بسزایی در تنظیم بیان ژن‌های دخیل در بلوغ نواحی مختلف مغز در حال تکامل دارند [۴] و کمبود آن‌ها در این زمان می‌تواند اثرات مخربی بر سازمان‌دهی مدارهای عصبی، میلینه شدن و عملکرد سیستم‌های نورترانسمیتری مغز داشته باشد [۵]. هیپوتیروئیدی در دوران تکامل جنینی منجر به بروز عوارضی مانند اختلال در تکثیر و مهاجرت پروجنیتور نورونی می‌شود. کاهش سطوح هورمون‌های تیروئیدی پس از تولد نیز منجر به اختلال در فرایندهایی مثل میلینه‌شدن، شاخه‌شاخه شدن دندریتی و تقویت طولانی‌مدت (long term potentiation: LTP) می‌شود. بنابراین تأخیر در درمان و برگرداندن غلظت هورمون‌های تیروئیدی به سطوح طبیعی می‌تواند منجر به بروز اختلالات عصبی پایدار شود [۷،۶].

هیپوتیروئیدی مادرزادی (Congenital hypothyroidism) به کمبود هورمون‌های تیروئیدی در زمان تولد اطلاق می‌شود و ممکن است گذرا یا دائمی باشد [۸]. کمبود هورمون‌های تیروئیدی در هیپوتیروئیدی مادرزادی گذرا پس از تولد و با

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

گذشت زمان معمولاً در چند ماه یا سال اول زندگی اصلاح می‌شود، اما در هیپوتیروئیدی مادرزادی دائمی نیازمند درمان بلندمدت است [۱۰،۹]. هیپوتیروئیدی مادرزادی دائمی ممکن است اولیه یا ثانویه (مرکزی) باشد. هیپوتیروئیدی اولیه به دلیل نقص غده تیروئید ایجاد می‌شود و هیپوتیروئیدی ثانویه به دنبال اختلال در تحریک غده تیروئید به واسطه هورمون محرک تیروئیدی (TSH) به دنبال آسیب هیپوتالاموسی یا هیپوفیزی ایجاد می‌شود [۱۱]. دریافت داروهای آنتی‌تیروئید توسط مادر در دوران بارداری و کمبود ید نیز از علل شایع هیپوتیروئیدی مادرزادی می‌باشند [۱۳،۱۲].

آپوپتوز یکی از اشکال مرگ سلولی است که با چروکیده شدن سلول، متراکم شدن کروماتین و قطعه‌قطعه شدن هسته مشخص می‌شود و در زمان تکامل طبیعی برای حفظ هومئوستاز و در شرایط پاتولوژیکی اتفاق می‌افتد [۱۴]. دو مسیر سیگنالینگ اصلی برای آپوپتوز وجود دارد: مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی و مسیر خارجی یا مسیر وابسته به گیرنده. هر دو مسیر از طریق فعال نمودن کاسپاز ۳ منجر به قطعه‌قطعه شدن DNA و تخریب اسکلت سلولی می‌شوند [۱۵]. آپوپتوز وابسته به میتوکندری یکی از مهم‌ترین راه‌های القاء آپوپتوز به شمار می‌رود و توسط محرک‌های مختلف داخل و خارج سلولی تحریک می‌شود. پروتئین‌های خانواده لنفومای سلول B-2 (Bcl-2) تنظیم‌کننده‌های اصلی مسیر داخلی هستند و از طریق تنظیم عملکرد میتوکندری در فرایند آپوپتوز نقش دارند. این خانواده شامل پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوتیک مثل Bcl-2 و Bcl-xL و پروتئین‌های پروآپوپتوتیک مثل Bax و Bak می‌شود. تغییر در بیان ژن‌های مسئول رمزگذاری پروتئین‌های پروآپوپتوتیک و آنتی‌آپوپتوتیک و بهم خوردن تعادل بین این عوامل می‌تواند منجر به القاء یا مهار آپوپتوز گردد [۱۷،۱۶،۱۴].

با توجه به اهمیت هورمون‌های تیروئیدی در رشد و تکامل، نوع و شدت ناهنجاری‌های ناشی از کمبود آن‌ها در دوره‌های مختلف تکامل می‌تواند متفاوت است. مطالعات متعددی به منظور بررسی اثرات کمبود هورمون‌های تیروئیدی بر روی سیستم عصبی صرفاً در دوران جنینی، نوزادی یا در زمان بلوغ صورت گرفته است [۱۸،۷-۲۱]. با توجه به تداوم شکل‌گیری و تکامل سیستم عصبی تا مدت‌ها پس از تولد، در این مطالعه بر آن شدیم آسیب نورونی ناشی از کمبود هورمون‌های تیروئیدی در دوران جنینی و نوزادی و نقش آپوپتوز در بروز این آسیب‌ها را به ترتیب با بررسی بقاء نورونی توسط رنگ‌آمیزی کرزیل‌ویوله و بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ریل‌تایم (Real-time polymerase chain reaction: RT PCR) در قشر پره‌فرونتال بررسی نماییم. ورزش از طریق محور هیپوتالاموسی- هیپوفیزی- تیروئیدی (HPT) و تغییر در سطح هورمون‌های تیروئیدی در تنظیم هومئوستاز بدن نقش دارد [۲۲]. افزایش غلظت خونی T_3 و T_4 و بروز اثرات محرک آن بر روی سیستم عصبی مرکزی در افراد مبتلا به ناتوانی ذهنی گزارش شده است [۲۳]. بنابراین به منظور بررسی نقش محافظتی فعالیت فیزیکی، اثرات ورزش با تردمیل بر آسیب عصبی احتمالی ناشی از کمبود مادرزادی هورمون‌های تیروئیدی در قشر پره‌فرونتال نیز بررسی شد.

مواد و روش‌ها

موش‌های صحرایی نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم در این مطالعه استفاده شدند. حیوانات در دمای اتاق ۲۳±۲°C و با چرخه ۱۲ ساعت روشنایی/ ۱۲ ساعت تاریکی در مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مازندران نگهداری می‌شدند و آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. تمامی آزمایشات حیوانی با تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران (IR.MAZUMS.REC.1400.10287) صورت گرفت.

روش القاء هیپوتیروئیدی مادرزادی. چهار سر موش صحرایی نر بالغ و هشت سر موش صحرایی ماده بالغ در طول یک شب جفت شدند (۲ موش ماده با یک موش نر در هر قفس). با مشاهده پلاک واژینال و تأیید بارداری در صبح روز بعد (روز اول بارداری)، حیوانات باردار به دو گروه کنترل و هیپوتیروئید، تقسیم و به قفس‌های جداگانه منتقل می‌شدند. برای القاء هیپوتیروئیدی مادرزادی، داروی ضد تیروئید پروپیل‌تیواوراسیل (PTU) با غلظت ۲۵۰ ppm (شرکت سیگما، آلمان) از روز ششم بارداری تا روز ۲۸ پس از تولد به آب آشامیدنی حیوانات باردار اضافه می‌شد. حیوانات باردار در گروه کنترل در این مدت آب معمولی دریافت می‌کردند [۲۴]. پس از اتمام دوره شیردهی (۲۸ روز پس از زایمان)، با القاء بی‌هوشی و بی‌دردی عمیق توسط کتامین (۸۰mg/kg) و زایلازین (۱۰mg/kg)، نمونه‌های خون از قلب مادران تهیه و سرم آن‌ها برای اندازه‌گیری هورمون‌های تیروئیدی جداسازی شد. در ادامه فرزندان نر در هر یک از گروه‌های کنترل و هیپوتیروئید به طور تصادفی به دو گروه با تمرین تردمیل و بدون تمرین تردمیل تقسیم شدند (۲۰ سر در ۴ گروه).

روش اندازه‌گیری غلظت سرمی هورمون‌های تیروئیدی

به منظور تأیید القاء هیپوتیروئیدی، غلظت T_4 آزاد و T_3 آزاد نمونه‌های سرمی خون مادران در انتهای دوران شیردهی

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

با استفاده از کیت‌های الایزا و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (پیشتاز طب زمان، ایران) اندازه‌گیری شد. حداقل غلظت قابل شناسایی T_4 و T_3 آزاد به ترتیب ۰/۱ ng/dl و ۰/۵ pg/ml بود.

روش انجام فعالیت ورزشی با تردمیل. از روز ۲۹ پس از تولد، حیوانات در گروه ورزش به مدت ۴ هفته (پنج روز در هفته) بر روی تردمیل (برج صنعت، ایران) با شیب صفر درجه و بدون شوک الکتریکی تمرین اجباری داده شدند. بر اساس مطالعه قبلی [۲۵] و بررسی‌های مقدماتی، از یک پروتُکُل ورزشی با شدت کم تا متوسط و در حد تحمل حیوانات هیپوتیروئید به شکل زیر استفاده شد: ۲ متر در دقیقه (۵ دقیقه اول)، ۳ متر در دقیقه (۵ دقیقه دوم) و ۴ متر در دقیقه (۲۰ دقیقه آخر) برای دو هفته اول و ۲ متر در دقیقه (۵ دقیقه اول)، ۵ متر در دقیقه (۵ دقیقه دوم) و ۸ متر در دقیقه (۲۰ دقیقه آخر) برای دو هفته آخر. پس از ۱۰ دقیقه ورزش، به حیوانات ۵ دقیقه استراحت داده می‌شد. حیوانات گروه‌های بدون ورزش برای مدتی مشابه بر روی تردمیل ثابت قرار می‌گرفتند. بعد از هر جلسه ورزش، دستگاه با محلول اتانول ۷۰ درصد تمیز و خشک می‌شد.

روش تهیه نمونه‌های بافتی. یک روز پس از اتمام تمرین با تردمیل (روز ۵۵)، حیوانات به دنبال تزریق داخل صفاقی ترکیبات کتامین (۸۰mg/kg) و زایلازین (۱۰mg/kg) قربانی شدند. پس از خارج کردن کامل مغز، جداسازی قشرهای پره‌فرونتال صورت گرفت. قشر سمت راست داخل RNAlater قرار گرفت و تا زمان بررسی بیان ژن در ۸۰°C- نگهداری شد. به منظور انجام مطالعات بافتی با استفاده از رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله، قشر پره‌فرونتال چپ به مدت ۴۸ ساعت داخل پارافرمالدهید قرار می‌گرفت.

روش رنگ‌آمیزی کرزیل‌ویوله. پس از پردازش نمونه‌های تثبیت شده، قالب‌گیری با پارافین انجام شد. در ادامه، برش‌های بافتی ۶ میکرونی با کرزیل‌ویوله استات ۰/۱ درصد رنگ‌آمیزی شدند. سپس تصاویر بافتی مناسب با استفاده از میکروسکوپ نوری (Olympus AX70) مجهز به دوربین دیجیتال، تهیه و نورون‌های سالم با هسته‌های مشخص در سه مقطع جداگانه و غیرمجاور از هر نمونه با استفاده از نرم‌افزار ImageJ شمارش و به صورت میانگین تعداد نورون‌ها در هر میلی‌متر مربع گزارش شد [۲۶].

روش بررسی بیان ژن با روش Real time PCR . جهت بررسی میزان بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز در قشر پره‌فرونتال، دو جفت پرایمر برای ژن‌های Bax و Bcl-2 و یک جفت پرایمر برای ژن GAPDH به عنوان کنترل، طراحی و توسط شرکت تکاپو زیست ساخته شد (جدول ۱). از مقدار تقریبی ۰/۵ سانتی‌متر مکعب از هر نمونه بافتی، RNA تام داخل سلول‌ها با استفاده از کیت استخراج RNA (کیاژن، آلمان)، جداسازی و سپس cDNA با استفاده از کیت فرمنتاز (آلمان) ساخته شد. واکنش‌های PCR با روش سایبرگرین و در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس (تاکارا، ژاپن)، ۴ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها و ۴ میکرولیتر آب صورت گرفت. مراحل واکنش‌هایPCR در دمای ۹۵ °C به مدت ۲ دقیقه (دناتوراسیون اولیه) و سپس ۴۰ سیکل با پروتُکُل دمایی ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه (دناتوراسیون)، ۵۷°C به مدت ۳۰ ثانیه (اتصال) و ۷۲ °C به مدت ۴۵ ثانیه (تکثیر) انجام شد. واکنش‌ها در هر نمونه با دو بار تکرار انجام شد و میانگین هر چرخه آستانه (Ct) محاسبه گردید. سپس بیان نسبی هر ژن با استفاده از رابطه $2^{-\Delta\Delta Ct}$محاسبه و پس از نرمال کردن با HGPRTبه عنوان یک ژن مرجع داخلی، در مقایسه با گروه کنترل ارائه شد [۲۷].

با توجه به پیروی داده‌ها از توزیع نرمال، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) برای مقایسه بین گروه‌ها استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شدند و $P<۰/۰۵$ به عنوان سطح آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده

ژن	توالی پرایمر	اندازه محصول (جفت باز)	شماره دسترسی
Bax	For. 5´- GGC TGG ACA CTG GAC TTC -3´ Rev. 5´- CAG ATG GTG AGT GAG GCA -3´	152	NM_017059.2
Bcl-2	For. 5´- GTG GAC AAC ATC GCT CTG -3´ Rev. 5´- AGA CAG CCA GGA GAA ATC A -3´	141	NM_016993.1
HGPRT	For. 5´- CAG CGT CGT GAT TAG TGA -3´ Rev. 5´- GGT CAG CAA AGA ACT TAT AGC -3´	215	NM_000194.2

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

نتایج

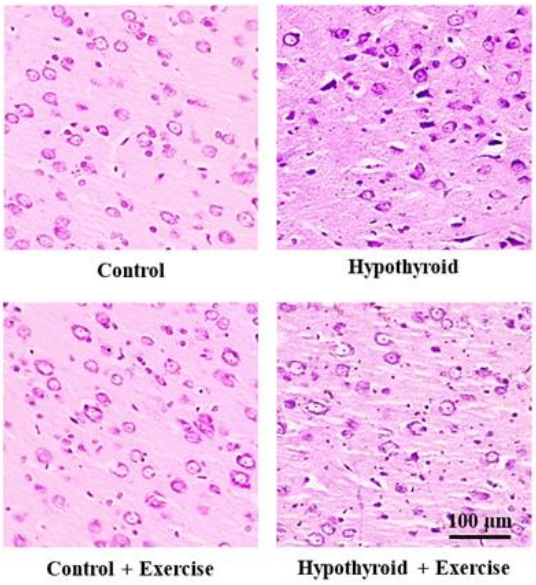
به منظور تأیید القاء هیپوتیروئیدی توسط تیمار با PTU، غلظت‌های سرمی T_4 آزاد و T_3 آزاد مادران در انتهای دوره شیردهی اندازه‌گیری شد. کاهش معنی‌دار ($P<۰/۰۰۱$) غلظت هورمون‌های تیروئیدی در مادران تحت تیمار با PTU در مقایسه با مادران کنترل از تأیید القاء هیپوتیروئیدی حکایت داشت (جدول ۲).

جدول ۲. غلظت سرمی هورمون‌های تیروئیدی در موش‌های صحرایی مادر

هورمون	کنترل	هیپوتیروئید
T4 آزاد (ng/dl)	۳/۰۳ ± ۰/۲۸	۱/۱۲ ± ۰/۲۱ **
T3 آزاد (pg/ml)	۲/۸۱ ± ۰/۳۲	۰/۹۶ ± ۰/۰۶ **

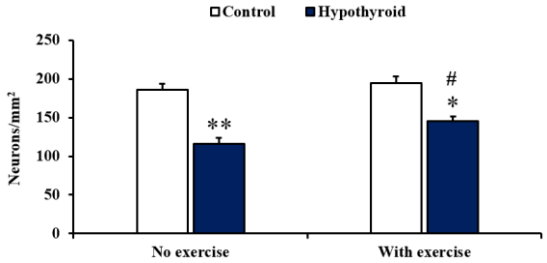
مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شده است.
** $P < ۰/۰۰۱$ در مقایسه با گروه کنترل (n = 4 Dams/group).

تصاویر میکروسکوپی قشر پره‌فرونتال که با رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله تهیه شده در شکل ۱ و میانگین تعداد نورون‌ها در گروه‌های مورد مطالعه در شکل ۲ نشان داده شده است. القاء هیپوتیروئیدی منجر به کاهش معنی‌داری ($P<۰/۰۰۱$) تعداد نورون‌ها در مقایسه با گروه کنترل شد. تمرین با تردمیل توانست منجر به افزایش معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) تعداد نورون‌ها در حیوانات هیپوتیروئید شود، با این وجود تعداد نورون‌ها هم‌چنان پایین‌تر از گروه کنترل باقی ماند.



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپی قشر پره‌فرونتال که با رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله تهیه شده است.

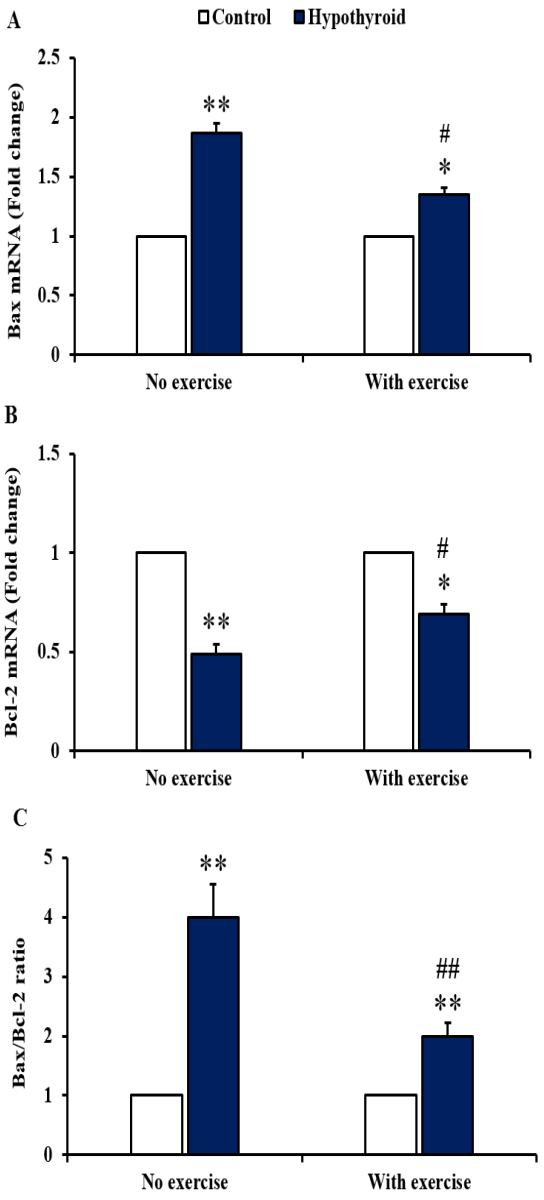
به منظور بررسی آپوپتوز، بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 در قشر پره‌فرونتال گروه‌های مورد مطالعه توسط Real time PCR اندازه‌گیری شد و نتایج آن در شکل ۳ نشان داده شده است. بیان ژن Bax در گروه هیپوتیروئیدی به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۰۱$) بیش‌تر از گروه کنترل بود. در مقابل، کاهش قابل ملاحظه‌ای ($P<۰/۰۰۱$) در بیان ژن Bcl-2 حیوانات هیپوتیروئید در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. بعلاوه، نسبت Bax/Bcl-2 نیز در حیوانات هیپوتیروئید در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری ($P<۰/۰۰۱$) بالاتر بود. تمرین با تردمیل در حیوانات هیپوتیروئید توانست منجر به افزایش معنی‌دار بیان Bcl-2 ($P<۰/۰۵$) و کاهش معنی‌دار بیان Bax



($P<۰/۰۵$) و نسبت Bax/Bcl-2 ($P<۰/۰۰۱$) شود، با این وجود اختلافات معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل هم‌چنان باقی ماند.

شکل ۲. میانگین تعداد نورون‌های در قشر پره‌فرونتال گروه‌های مورد مطالعه. نورون‌های سالم با هسته‌های مشخص در سه مقطع جداگانه و غیرمجاور از هر نمونه شمارش و به صورت تعداد نورون در هر میلی‌متر مربع گزارش شده است مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شده است (n = 5 rats/group). * $P < ۰/۰۵$ و ** $P < ۰/۰۰۱$ در مقایسه با گروه کنترل مربوطه؛ # $P < ۰/۰۵$ در مقایسه با گروه بدون تمرین ورزشی مربوطه.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]



شکل ۳. بیان ژن‌های Bax (A) و Bcl-2 (B) و نسبت Bax/Bcl-2 (C) در قشر پره‌فرونتال گروه‌های مورد مطالعه. سطوح mRNA توسط Real time PCR اندازه‌گیری و نسبت به HGPRT به عنوان کنترل داخلی نرمالیزه شد. مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شده است (n = 5 rats/group). * P < ۰/۰۵ و P < ۰/۰۰۱ ** در مقایسه با گروه کنترل مربوطه؛ # P < ۰/۰۵ و ## P < ۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه بدون تمرین ورزشی مربوطه.

بحث و نتیجه‌گیری

از داروهای آنتی‌تیروئید مثل PTU و متی‌مازول به منظور کاهش ساخت هورمون‌های تیروئیدی در افراد مبتلا به هیپرتیروئیدی استفاده می‌شود. بعلاوه، تجویز این داروها کاربرد گسترده‌ای در ایجاد مدل‌های حیوانی جهت بررسی اثرات ناشی از کمبود هورمون‌های تیروئیدی دارد. از آن‌جایی که داروهای آنتی‌تیروئید از جفت عبور می‌کنند و به داخل شیر نیز ترشح می‌شوند، استفاده از آن‌ها توسط زنان هیپرتیروئید در دوران بارداری و شیردهی به دلیل خطراتی که می‌تواند بر سلامت جنین و نوزاد داشته باشد ممنوع است یا باید با احتیاط صورت گیرد [۲۹،۲۸]. تیمار با یک ترکیب آنتی‌تیروئید در دوران بارداری و شیردهی به ترتیب منجر به ایجاد مدل هیپوتیروئیدی جنینی و نوزادی در فرزندان می‌شود [۳۰]. داروی آنتی‌تیروئید PTU از طریق مهار آنزیم تیروئیدپراُکسیداز منجر به اختلال در ساخت هورمون‌های تیروئیدی می‌شود و کاربرد زیادی در ایجاد مدل‌های حیوانی هیپوتیروئیدی دارد. از آن‌جایی که هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات ناشی از کمبود هورمون‌های تیروئیدی در دوران جنینی و نوزادی بود، تجویز PTU از روز ششم بارداری آغاز شد و تا انتهای دوران شیرخواری ادامه داشت. دوران شیرخواری در موش صحرایی معادل مرحله بین سه ماهه سوم بارداری تا سال دوم پس از تولد در انسان است [۷].

کمبود هورمون‌های تیروئیدی در دوران تکامل جنینی و حتی پس از آن می‌تواند اثرات ماندگاری بر تکامل و عملکرد نورون‌ها و سیستم‌های نوروترانسمیتری نواحی مختلف مغز از جمله قشر پره‌فرونتال داشته باشد. کمبود هورمون‌های تیروئیدی منجر به کاهش معنی‌دار تعداد نورون‌ها در قشر پره‌فرونتال گروه هیپوتیروئید در مقایسه با گروه کنترل شد. در توافق با یافته‌های مطالعه حاضر، القاء هیپوتیروتیدی مادرزادی با کمبود ید رژیم غذایی و PTU نیز توانست منجر به کاهش تعداد نورن‌های هیپوکامپ شود [۱۳]. کاهش تعداد نورون‌های قشر مغز و هیپوکامپ موش‌های صحرایی به دنبال القاء هیپوتیروئیدی جنینی توسط متی‌مازول نیز گزارش شده است [۳۱].

القاء آپوپتوز و استرس اکسیداتیو و تغییر در سیستم‌های نوروترانسمیتری مختلف از جمله مکانیسم‌هایی هستند که کمبود هورمون‌های تیروئیدی می‌تواند از طریق آن‌ها منجر به بروز آسیب‌ها و ناهنجاری‌های عصبی شود [۳۳،۳۲]. به منظور تعیین نقش آپوپتوز در کاهش مشاهده شده در تعداد نورون‌ها، تصمیم گرفتیم بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز Bax و Bcl-2 را بررسی نماییم. کاهش بیان Bcl-2 و افزایش بیان Bax و نسبت Bax/Bcl-2 در قشر پره‌فرونتال حیوانات هیپوتیروئید از فعال شدن مکانیسم آپوپتوز حکایت داشت. نتایج مطالعه حاضر همسو با مطالعات دیگری است که به دنبال بررسی اثرات کمبود هورمون‌های تیروئیدی در بازه‌های مختلف دوران تکامل و در نواحی دیگر مغز حاصل شده است. القاء هیپوتیروئیدی با اضافه کردن داروی آنتی‌تیروئید متی‌مازول به آب نوشیدنی از روز ۱۴ بارداری تا روز ۴۹ پس از تولد نیز توانست با افزایش Bax و کاهش Bcl-2 منجر به

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

القاء آپوپتوز در هیپوکامپ موش‌های صحرایی شود [۳۴]. در مطالعه‌ای دیگر، کاهش سطوح هورمون‌های تیروئیدی در دوران جنینی و پس از آن تا زمان بلوغ با افزایش نسبت پروتئین‌های پروآپوپتوتیک به آنتی‌آپوپتوتیک (افزایش Bax و کاهش Bcl-2 و Bcl-xl) منجر به القاء آپوپتوز در مخچه موش‌های صحرایی شد [۳۵]. ایجاد مدل هیپوتیروئیدی توسط تیمار با متی‌مازول از دوران بارداری تا دوران بلوغ توانست با القاء آپوپتوز منجر به کاهش تعداد نورون‌ها در هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر بالغ جوان شود [۳۶]. نتایج مطالعه‌ای که توسط Zhang و همکاران (۲۰۰۹) به منظور بررسی تأثیر کمبود هورمون‌های تیروئیدی در دوران تکامل پس از تولد بر بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز در هیپوکامپ موش‌های صحرایی صورت گرفت نیز از افزایش بیان ژن Bax و کاهش بیان ژن Bcl-2 حکایت داشت [۷].

فعالیت فیزیکی از طریق مکانیسم‌های مختلفی از جمله اثرات آنتی‌آپوپتوزی، ضدالتهابی، آنتی‌اُکسیدانی و افزایش رگ‌سازی و تولید فاکتورهای نوروتروفیک می‌تواند در افزایش بقاء نورونی و بهبود آسیب‌ها و اختلالات عصبی نقش داشته باشد [۳۷-۴۱]. در مطالعه حاضر تمرین با تردمیل توانست از طریق مهار آپوپتوز ناشی از کمبود هورمون‌های تیروئیدی منجر به افزایش بقاء نورونی در قشر پره‌فرونتال شود. در توافق با یافته‌های مطالعه حاضر، تمرین با تردمیل از روز ۲۴ پس از تولد نیز توانست با افزایش Bcl-2 و کاهش Bax و نسبت Bax/Bcl-2 منجر به سرکوب آپوپتوز ناشی از القاء هیپوتیروئیدی مادرزادی توسط متی‌مازول در هیپوکامپ موش‌های صحرایی شود [۳۴].

در مطالعه حاضر اثرات کمبود هورمون‌های تیروئیدی بر مکانیسم آپوپتوز تنها از طریق بررسی بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز در سطح mRNA صورت گرفت. اگرچه اندازه‌گیری هم‌زمان سطوح mRNA و پروتئین منجر به درک دقیق‌تر عملکرد ژن می‌شود، بررسی بیان ژن تنها در سطح mRNA نیز می‌تواند به طور قابل قبولی بیان ژن در سطح پروتئین را پیش‌بینی کند [۴۲]. انجام مطالعه بر روی تنها یک ناحیه مغز از دیگر محدودیت‌های مطالعه حاضر به شمار می‌رود.

به طور خلاصه، کمبود هورمون‌های تیروئیدی در دوران تکامل جنینی و شیرخواری توانست با افزایش Bax و کاهش Bcl-2 منجر به القاء آپوپتوز و کاهش بقاء نورونی در قشر پره‌فرونتال موش‌های صحرایی مبتلا به هیپوتیروئیدی مادرزادی شود. تمرین با تردمیل توانست از طریق سرکوب آپوپتوز منجر به بهبود نسبی بقاء نورونی در قشر مغز حیوانات هیپوتیروئید شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران به خاطر حمایت مالی این مطالعه (کد ۱۰۲۸۷) قدردانی می‌شود.

مشارکت و نقش نویسندگان

مسلم محمدی: ایده و طراحی مطالعه، سکینه شفیعا و مسلم محمدی: جمع‌آوری نمونه‌ها و داده‌ها، سکینه شفیعا و مسلم محمدی: آنالیز و تفسیر نتایج، مسلم محمدی: نگارش نسخه اول مقاله. همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تأیید نمودند.

منابع

[1] Anyetei-Anum CS, Roggero VR, Allison LA. Thyroid hormone receptor localization in target tissues. J Endocrinol 2018; 237: R19-R34.
https://doi.org/10.1530/JOE-17-0708
PMid:29440347 PMCid:PMC5843491

[2] Cherella CE, Wassner AJ. Update on congenital hypothyroidism. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2020; 27: 63-69.
https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000520
PMid:31789720

[3] Ghaffari Z, Vafaei AA, L. R-PA, Hadjzadeh MAR, Hosseini SM. Effects of maternal hypothroidism during preganacy on anxiety-like behaviors in adulthood rats: Impact of moderate treadmill exercise. Koomesh 2016; 17: 707-717. (Persian)

[4] Morte B, Díez D, Ausó E, Belinchón MM, Gil-Ibáñez P, Grijota-Martínez C, Navarro D, de Escobar GM, Berbel P, Bernal J. Thyroid hormone regulation of gene expression in the developing rat fetal cerebral cortex: prominent role of the Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase IV pathway. Endocrinology 2010; 151: 810-820.
https://doi.org/10.1210/en.2009-0958
PMid:20056827

[5] Sui L, Anderson WL, Gilbert ME. Impairment in short-term but enhanced long-term synaptic potentiation and ERK activation in adult hippocampal area CA1 following developmental thyroid hormone insufficiency. Toxicol Sci 2005; 85: 647-656.
https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi095
PMid:15673845

[6] Rovet JF, Ehrlich R. Psychoeducational outcome in children with early-treated congenital hypothyroidism. Pediatrics 2000; 105: 515-522.
https://doi.org/10.1542/peds.105.3.515
PMid:10699102

[7] Zhang L, Blomgren K, Kuhn HG, Cooper-Kuhn CM. Effects of postnatal thyroid hormone deficiency on neurogenesis in the juvenile and adult rat. Neurobiol Dis 2009; 34: 366-374.
https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.02.006
PMid:19233274

[8] Brady J, Cannupp A, Myers J, Jnah AJ. Congenital Hypothyroidism. Neonatal Netw 2021; 40: 377-385.
https://doi.org/10.1891/11-T-699
PMid:34845088

[9] Rastogi MV, LaFranchi SH. Congenital hypothyroidism. Orphanet J Rare Dis 2010; 5: 17.
https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-17
PMid:20537182 PMCid:PMC2903524

[11] Peters C, van Trotsenburg ASP, Schoenmakers N. Diagnosis of endocrine disease: Congenital hypothyroidism: update and perspectives. Eur J Endocrinol 2018; 179: R297-R317.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

hypothyroidism alters gene expression of glucose transporters and impairs glucose sensing apparatus in young and aged offspring rats. Cell Physiol Biochem 2017; 43: 2338-2352.
https://doi.org/10.1159/000484386
PMid:29073628

[25] Mohammadi M, Zare Z. Effects of treadmill exercise on cognitive functions and anxiety-related behaviors in ovariectomized diabetic rats. Physiol Behav 2020; 224: 113021.
https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113021
PMid:32569602

[26] Zare Z, Tehrani M, Zarbakhsh S, Farzadmanesh H, Shafia S, Abedinzade M, et al. Effects of paraoxon exposure on expression of apoptosis-related genes, neuronal survival, and astrocyte activation in rat prefrontal cortex. Neurotox Res 2020; 37: 356-365.
https://doi.org/10.1007/s12640-019-00106-x
PMid:31493121

[27] Zare Z, Tehrani M, Rafiei A, Valadan R, Mohammadi M. Differential expression of glutamate transporters in cerebral cortex of paraoxon-treated rats. Neurotoxicol Teratol 2017; 62: 20-26.
https://doi.org/10.1016/j.ntt.2017.06.001
PMid:28603072

[28] Andersen SL, Andersen S. Antithyroid drugs and birth defects. Thyroid Res 2020; 13: 11.
https://doi.org/10.1186/s13044-020-00085-8
PMid:32607131 PMCid:PMC7320591

[29] Ghanbari M, Ghasemi A. Maternal hypothyroidism: An overview of current experimental models. Life Sci 2017; 187: 1-8.
https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.08.012
PMid:28807719

[30] O'Shaughnessy KL, Wood CR, Ford RL, Kosian PA, Hotchkiss MG, Degitz SJ, Gilbert ME. Thyroid hormone disruption in the fetal and neonatal rat: predictive hormone measures and bioindicators of hormone action in the developing cortex. Toxicol Sci 2018; 166: 163-179.
https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy190
PMid:30085217 PMCid:PMC6727986

[31] Dogan HO, Alcigir ME. The Protective effect of P7C3 against DNA and neuron damage in rat pups with congenital hypothyroidism. Biomed Pharmacother 2018; 99: 499-503.
https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.058
PMid:29665652

[32] Alcigir ME, Dogan HO, Atalay Vural S, Yilmaz FM. Neuroprotective activity of cannabinoid receptor-2 against oxidative stress and apoptosis in rat pups having experimentally-induced congenital hypothyroidism. Dev Neurobiol 2017; 77: 1334-1347.
https://doi.org/10.1002/dneu.22516
PMid:28799288

[33] Cattani D, Goulart PB, Cavalli VL, Winkelmann-Duarte E, Dos Santos AQ, Pierozan P, et al. Congenital hypothyroidism alters the oxidative status, enzyme activities and morphological parameters in the hippocampus of developing rats. Mol Cell Endocrinol 2013; 375: 14-26.
https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.05.001
PMid:23693027

[34] Shin MS, Ko IG, Kim SE, Kim BK, Kim TS, Lee SH, et al. Treadmill exercise ameliorates symptoms of methimazole-induced hypothyroidism through enhancing neurogenesis and suppressing apoptosis in the hippocampus of rat pups. Int J Dev Neurosci 2013; 31: 214-223.
https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.01.003
PMid:23328696

[35] Singh R, Upadhyay G, Kumar S, Kapoor A, Kumar A, Tiwari M, Godbole MM. Hypothyroidism alters the expression of Bcl-2 family genes to induce enhanced apoptosis in the developing cerebellum. J Endocrinol 2003; 176: 39-46.
https://doi.org/10.1677/joe.0.1760039
PMid:12525248

[36] Mishra J, Vishwakarma J, Malik R, Gupta K, Pandey R, Maurya SK, et al. Hypothyroidism induces interleukin-1-dependent autophagy mechanism as a key mediator of
https://doi.org/10.1530/EJE-18-0383
PMid:30324792

[12] Andersen SL, Knøsgaard L, Olsen J, Vestergaard P, Andersen S. Maternal thyroid function, use of antithyroid drugs in early pregnancy, and birth defects. J Clin Endocrinol Metab 2019; 104: 6040-6048.
https://doi.org/10.1210/jc.2019-01343
PMid:31408173

[13] Gong J, Dong J, Wang Y, Xu H, Wei W, Zhong J, Liu W, Xi Q, Chen J. Developmental iodine deficiency and hypothyroidism impair neural development, up-regulate caveolin-1 and down-regulate synaptophysin in rat hippocampus. J Neuroendocrinol 2010; 22: 129-139.
https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01943.x
PMid:20025630

[14] Malhi H, Guicciardi ME, Gores GJ. Hepatocyte death: a clear and present danger. Physiol Rev 2010; 90: 1165-1194.
https://doi.org/10.1152/physrev.00061.2009
PMid:20664081 PMCid:PMC2943859

[15] Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. Immunity 2005; 22: 355-370.
https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.02.004
PMid:15780992

[16] Leber B, Lin J, Andrews DW. Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. Apoptosis 2007; 12: 897-911.
https://doi.org/10.1007/s10495-007-0746-4
PMid:17453159 PMCid:PMC2868339

[17] Zare Z, Zarbakhsh S, Tehrani M, Mohammadi M. Paraoxon-induced damage in rat hippocampus is associated with alterations in the expression of apoptosis-related proteins. Pestic Biochem Physiol 2020; 166: 104580.
https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104580
PMid:32448426

[18] Braganhol E, Bruno AN, Bavaresco L, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ, Battastini AM. Neonatal hypothyroidism affects the adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from rat brain. Neurochem Res 2006; 31: 449-454.
https://doi.org/10.1007/s11064-006-9041-y
PMid:16758352

[19] Cesur G, Eren MK, Eren E, Ergin K, Ek RO, Yıldız Y, et al. Effect of experimentally induced hypothyroidism during gestation period on activity dependent neurotrophic factor (ADNF) in newborn rat brain tissue. Horm Mol Biol Clin Investig 2018; 36.
https://doi.org/10.1515/hmbci-2017-0069
PMid:30256757

[20] Mohan V, Sinha RA, Pathak A, Rastogi L, Kumar P, Pal A, Godbole MM. Maternal thyroid hormone deficiency affects the fetal neocorticogenesis by reducing the proliferating pool, rate of neurogenesis and indirect neurogenesis. Exp Neurol 2012; 237: 477-488.
https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.07.019
PMid:22892247

[21] Xing Q, Shan Z, Gao Y, Mao J, Liu X, Yu J, et al. Differential expression of MicroRNAs and miR-206-mediated downregulation of BDNF expression in the rat fetal brain following maternal hypothyroidism. Horm Metab Res 2018; 50: 696-703.
https://doi.org/10.1055/a-0658-2095
PMid:30119135

[22] Ylli D, Wartofsky L. Can we link thyroid status, energy expenditure, and body composition to management of subclinical thyroid dysfunction? J Clin Endocrinol Metab 2019; 104: 209-212.
https://doi.org/10.1210/jc.2018-01997
PMid:30247562

[23] Altaye KZ, Mondal S, Legesse K, Abdulkedir M. Effects of aerobic exercise on thyroid hormonal change responses among adolescents with intellectual disabilities. BMJ Open Sport Exerc Med 2019; 5: e000524.
https://doi.org/10.1136/bmjsem-2019-000524
PMid:31423321 PMCid:PMC6678003

[24] Gholami H, Jeddi S, Zadeh-Vakili A, Farrokhfall K, Rouhollah F, Zarkesh M, et al. Transient congenital

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

hippocampal neuronal apoptosis and cognitive decline in postnatal rats. Mol Neurobiol 2021; 58: 1196-1211. https://doi.org/10.1007/s12035-020-02178-9 PMid:33106949

[37] Lovatel GA, Elsner VR, Bertoldi K, Vanzella C, Moysés Fdos S, Vizuete A, et al. Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus. Neurobiol Learn Mem 2013; 101: 94-102. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.01.007 PMid:23357282

[38] Lu Y, Dong Y, Tucker D, Wang R, Ahmed ME, Brann D, Zhang Q. Treadmill exercise exerts neuroprotection and regulates microglial polarization and osxidative stress in a streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis 2017; 56: 1469-1484. https://doi.org/10.3233/JAD-160869 PMid:28157094 PMCid:PMC5450951

[39] Mahalakshmi B, Maurya N, Lee SD, Bharath Kumar V. Possible neuroprotective mechanisms of physical exercise in neurodegeneration. Int J Mol Sci 2020; 21. https://doi.org/10.3390/ijms21165895 PMid:32824367 PMCid:PMC7460620

[40] Rezaee Z, Marandi SM, Alaei H, Esfarjani F. Neuroprotective effects of endurance training in 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. Koomesh 2020; 22: 556-562. (Persian) https://doi.org/10.29252/koomesh.22.3.556

[41] Zare Z, Zarbakhsh S, Tehrani M, Mohammadi M. Neuroprotective effects of treadmill exercise in hippocampus of ovariectomized and diabetic Rats. Neuroscience 2022; 496: 64-72. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.06.012 PMid:35700817

[42] Guo Y, Xiao P, Lei S, Deng F, Xiao GG, Liu Y, et al. How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2008; 40: 426-436 https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2008.00418.x PMid:18465028

[10] Wassner AJ. Congenital Hypothyroidism. Clin Perinatol 2018; 45: 1-18. https://doi.org/10.1016/j.clp.2017.10.004 PMid:29405999

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

Koomesh -Volume 25, Issue 4 July and August 2023, 452 - 459

Treadmill exercise improves neuronal survival by inhibiting apoptosis in the prefrontal cortex of congenital hypothyroid rats

Sakineh Shafia (Ph.D)[1], Moslem Mohammadi (Ph.D)[* 2]
1- Dept. of Physiology, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
2 – Dept. of Physiology, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

* Corresponding author. +98 11 335430811 mohammadimo@yahoo.com Received: 29 Jul 2023; Accepted: 10 Sep 2023

Introduction*:* Thyroid hormone deficiency during development can have detrimental effects on the structure and function of the nervous system. This study aimed to examine the effects of developmental thyroid hormone deficiency on neuronal survival and gene expression of pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2 in the prefrontal cortex of congenital hypothyroid rats. The possible protective role of treadmill exercise was also investigated.

Materials and Methods*:* A congenital hypothyroid model was made by treatment of pregnant Wistar rats with propylthiouracil (PTU) in drinking water from the sixth day of gestation until the end of the lactation period. Control mothers received water during this period. The male offspring were then divided into two groups with/without four weeks of treadmill exercise. Next, the animals were sacrificed and prefrontal cortices were isolated to examine neuronal survival and expression of apoptosis-related genes (Bax and Bcl-2) using cresyl violet staining and real-time polymerase chain reaction, respectively.

Results: Our results demonstrated that decreased neuronal survival was associated with a significant increase in Bax and a significant decrease in Bcl-2 gene expression in congenital hypothyroid rats. Treadmill exercise was able to increase the number of surviving neurons by decreasing Bax and increasing Bcl-2 levels; however, significant differences still remained compared to the control group.

Conclusion: Developmental thyroid hormone deficiency leads to neuronal damage by activating the apoptosis mechanism. Exercise can improve neuronal survival by inhibiting apoptosis in the prefrontal cortex of congenital hypothyroid rats.

Keywords*:* Congenital Hypothyroidism, Apoptosis, Treadmill Exercise, Prefrontal Cortex, Neuronal Survival

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]