

اثر هیپوتیروئیدیسم پس از تولد بر نورونهای حاوی نیتریک اکسید کورتکس نوزادان موش صحرایی

جعفر وطن پرست ^{1*}، ژیلا بهزادی ^{2*} Ph.D.

^{1*} دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

^{2*} دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

³ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۱۸۱-۱۹۸۳۵، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، گروه فیزیولوژی

چکیده

هدف: بررسی اثر هیپوتیروئیدیسم پس از تولد به روش القای شیمیایی بر نورونهای حاوی آنزیم NADPH-diaphorase (ND) در نواحی مختلف کورتکس نوزادان موش صحرایی

مواد و روشها: موشهای صحرایی مادر از روز زایمان به دو گروه تقسیم شدند. گروه کنترل آب خوراکی نوشیدند و گروه آزمون از روز زایمان محلول پروپیل تیواوراسیل (PTU: 6-n-propyl-2-thiouracil) ۰/۱ درصد دریافت می‌کردند. در روزهای ۴، ۷، ۱۰، ۱۵، ۲۳ و ۳۰ پس از تولد شاخصهای رشد نوزادان گروههای آزمون و کنترل ثبت شد. در این روزها مغز نوزادان پس از پرفیوز و تثبیت، توزین و سپس برش‌گیری و با استفاده از روش NADPH-Diaphorase نورونهای حاوی آنزیم سنتزکننده نیتریک اکسید نشاندار شدند. نواحی مختلف کورتیکال با استفاده از اطلس در میکروسکوپ نوری مطالعه و عکسبرداری شدند.

یافته‌ها: از روز هفتم پس از تولد وزن بدن و مغز نوزادان گروه آزمون به طور معنی داری کمتر از گروه کنترل بود. در طی تکوین کورتکس، توزیع و فراوانی نورونهای ND⁺ تغییر می‌کند به طوری که در هفته اول پس از تولد نورونهای ND⁺ اغلب در لایه‌های عمقی (V, VI) حضور دارند ولی به تدریج و با افزایش سن تراکم در لایه‌های سطحی (II, III) بیشتر می‌شود. در گروه هیپوتیروئید در تمام روزهای مطالعه به استثنای روز پانزدهم پس از تولد تعداد نورونهای ND⁺ در کورتکس سینگولیت (Cg: Cingulate)، فرونتال (Fr: Frontal)، Forelimb/Hindlimb (FL/HL) و پارینتال شماره یک (par1) به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود. در گروه هیپوتیروئید نورونهای ND⁺ دیرتر به فرم بالغ رسیده و به ویژه در روزهای بیست و سوم و سی‌ام پس از تولد از نظر اندازه جسم سلولی و طول نوریتها از گروه کنترل کوچکترند.

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده نشان می‌دهد الگوی تغییرات نورونهای ND⁺ با روندهای تکوین و لامیناسیون کورتکس مرتبط است. افزایش سریع و قابل توجه نورونهای ND⁺ در گروه هیپوتیروئید نشان می‌دهد نورونهای حاوی آنزیم سنتزکننده نیتریک اکسید شدیداً به هیپوتیروئیدیسم حساسند و این احتمال وجود دارد که این نورونها با تولید نیتریک اکسید (NO: Nitric Oxide) در القای اثرهای هیپوتیروئیدیسیم بر کورتکس نقش داشته باشد.

کل واژگان: هیپوتیروئیدیسیم پس از تولد، نیتریک اکسید، NADPH-diaphorase، کورتکس، موش صحرایی

مقدمه

هورمونهای تیروئید برای تکوین طبیعی سیستم عصبی ضروری اند (۱). در انسان و مدل‌های حیوانی تغییر در میزان دسترسی به هورمونهای تیروئید مخصوصاً در طی دوره رشد بحرانی (CP)^۱ اختلالات شدید و اغلب غیرقابل جبران در سیستم عصبی مرکزی ایجاد می‌کند. دوره رشد بحرانی در انسان معادل سه ماهه سوم جنینی و در موش صحرایی معادل ۲ تا ۳ هفته اول پس از تولد است (۲، ۳).

فرم اولیه هورمون تیروئید که به وسیله مغز گرفته می‌شود، تیروکین (T₄) است که در درون سلولها به وسیله آنزیم دیدیناز نوع II (D₂) به تری‌یدوتیرونین (T₃) - فرم فعالتر هورمون تیروئید - تبدیل می‌شود (۴). برای القای هیپوتیروئیدسم شیمیایی در موش صحرایی اغلب از داروی گواتروژن پروپیل تیواوراسیل استفاده می‌شود. این دارو به طور خوراکی قابل تجویز می‌باشد و یک داروی مطمئن برای القای هیپوتیروئیدسم در نوزادان شیرخوار است زیرا وارد شیر نیز می‌شود (۵). PTU با مهار آنزیم تیروپراکسیداز مستز هورمونهای تیروئید را کاهش می‌دهد. همچنین با مهار آنزیم D₂ تبدیل T₄ به T₃ را کاهش داده و از این طریق فعالیت بیولوژیک هورمونهای تیروئید را کم می‌کند (۱، ۵). کاهش هورمونهای تیروئید اغلب فرایندهای مربوط به تکوین مغز را به تعویق می‌اندازد. در این زمینه بیشترین مطالعات در مورد مخچه، هیپوکامپ و کورتکس صورت گرفته است (۱). بسیاری از اختلالات عصبی ناشی از هیپوتیروئیدسم از تغییرات سیستم‌های نوروترانسمیتری مخصوصاً سیستم کولینرژیک ناشی می‌شود (۳).

در حین تکامل برخی از نورونهای قشر مغز حاوی آنزیم NOS^۲ بوده و قادر به تولید گاز NO هستند (۶، ۷). NO در مغز نقشهای متعددی ایفا می‌کند. جریان خون موضعی را با فعالیت نورونها تطبیق می‌دهد، به عنوان یک نوروترانسمیتر استثنایی رهایش سایر نوروترانسمیترها را تعدیل می‌کند و در روندهایی چون LTP^۳ و LTD^۴ نقش دارد (۸). NO با اثر بر بیان ژنها و روند آپاتوزیس در بلوغ نورونها و لایه‌بندی کورتکس نیز نقش دارد (۹). همچنین تغییر در تعداد نورونهای NO در کورتکس در موارد پاتولوژیک، پیری و سوء تغذیه گزارش شده است. توان NOS نورونی در اکسیداسیون NADPH باعث شد تا روش ND که بر پایه توانایی آنزیم در اکسیداسیون NADPH استوار است برای شناسایی آن به کار رود. در برشهای مغز تثبیت شده با پارافرمالدئید، NOS نورونی تنها آنزیمی است که فعالیت ND خود را حفظ می‌کند. محققین مختلف نشان دادند فعالیت ND نورونها با حضور آنزیم NOS نورونی مطابقت دارد (۱۰).

با اینکه اثرهای هیپوتیروئیدسم بر کارکرد نورونهای نواحی مختلف قشر مغز در طول رشد بررسی شده است (۲، ۳) ولی تاکنون هیچ گزارشی تحقیقی در ارتباط با اثر هیپوتیروئیدسم بر نورونهای مستز کننده NO منتشر نشده است، بنابراین در این تحقیق با هدف بررسی اثرهای هیپوتیروئیدسم پس از تولد بر نورونهای دارای

آنزیم NOS نورونی، جمعیت، نحوه توزیع و مورفولوژی نورونهای ND⁺ در نواحی سینگولیت، کورتکس حرکتی فرونتال، ناحیه سنسوری موتور FL/HL و کورتکس سنسوری موتوری و کورتکس سرماتوسنوری پارینال شماره یک نوزادان هیپوتیروئید و طبیعی بررسی شد.

مواد و روشها

این مطالعه روی نوزادان موش صحرایی نژاد Sprague-Dawley انجام شد. موشهای باردار در قفسهای مجزا و در شرایط استاندارد با چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از زایمان از بین نوزادان هر مادر، به طور تصادفی ۶ نوزاد انتخاب و در کنار مادر نگهداشته شد. مادران گروه آزمون داروی گواتروژن پروپیل تیواوراسیل را با غلظت ۰/۱ درصد در آب خوراکی دریافت کردند. روز زایمان به عنوان روز صفر (P0) در نظر گرفته شد. در روزهای ۷، ۱۰، ۱۵، ۲۳ و ۳۰ پس از تولد نوزادان هر دو گروه وزن شدند. در طول دوره مطالعه شاخصهای رشد، مانند زمان رویش موی بدن، باز شدن پلک چشم و کانال گوش ثبت شد. در این تحقیق جمعاً ۱۳۸ نوزاد مطالعه شدند که روی ۴۲ نمونه مطالعه نوروهیستوشیمیائی انجام گرفت. برای مطالعه نوروهیستوشیمیایی، در روزهای ذکر شده حداقل سه نوزاد از هر گروه به وسیله اثر بیهوش شدند و سپس با توجه به جثه حیوان، پرفیورن آنها توسط ۲۰-۵ میلی‌لیتر نرمال سالین ۰/۹ درصد و ۵۰-۱۰ میلی‌لیتر محلول پارافرمالدئید ۴ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار انجام شد. به دنبال آن مغزها از مجسمه خارج شدند و پس از توزین برای چند ساعت در محلول تثبیت کننده نگهداری شدند. از مغز فدامی^۵ بلوکهایی به اندازه مناسب تهیه و به وسیله دستگاه ویبراتوم برشهای کرونال به ضخامت ۸۰ میکرومتر تهیه شد. از هر ۳ تا ۴ برش متوالی یکی انتخاب و روی برشهای انتخابی واکنش NADPH-diaphorase با استفاده از ماده 6NADPH (سیگما، 1mg/ml)، نیترپولوترازولیوم (سیگما، 0.1mg/ml، NBT) و Triton X100 (۰/۳ درصد) در محیط بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH=۷/۴ انجام شد. برای آشکار سازی نورونهای حاوی NOS نورونی، انکوباسیون به مدت ۱ تا ۲ ساعت در دمای ۳۷ سانتی‌گراد انجام گرفت. سپس برشها به لامهای ژلاتینه منتقل و پس از آبگیری با الکل و شفاف سازی با گریزل، لامگذاری انجام شد. کلیه نمونه‌ها با کمک میکروسکوپ نوری مطالعه و سلولهای نشاندار شده در نقاط مختلف قشر با استفاده از اطلس پاکسینوس و واتسون (۱۱) تعیین محل و بررسی شدند. برای مقایسه مشخصه‌های کمی بین گروههای کنترل و آزمون از آزمون t جفت نشده (Unpaired t-test) استفاده شد.

1. Critical Period
2. Nitric Oxide Synthase
3. Long Term Potentiation
4. Long Term Depression
5. Forebrain

یافته‌ها

* تغییرات در وزن و شاخصهای رشد

وزن بدن و مغز نوزادان گروه آزمون در تمام روزهای مطالعه کمتر از گروه کنترل بود که این تفاوت در روزهای هفتم پس از تولد و بعد از آن از نظر آماری معنی دار بود. در روز هفتم پس از تولد میانگین وزن بدن نوزادان گروه آزمون ۱۷ درصد و میانگین وزن مغز آنها ۱۲ درصد کمتر از گروه کنترل بود که تفاوت تا روز سیام پس از تولد به ترتیب به ۶۳ درصد و ۲۴ درصد رسید. در گروه آزمون سایر شاخصهای رشد نیز با تأخیر بروز نمودند به طوری که رویش موی بدن دو تا سه روز، باز شدن چشم سه تا پنج روز و باز شدن کانال گوش شش تا یازده روز نسبت به گروه کنترل با تأخیر همراه بود.

* هیستوشیمی

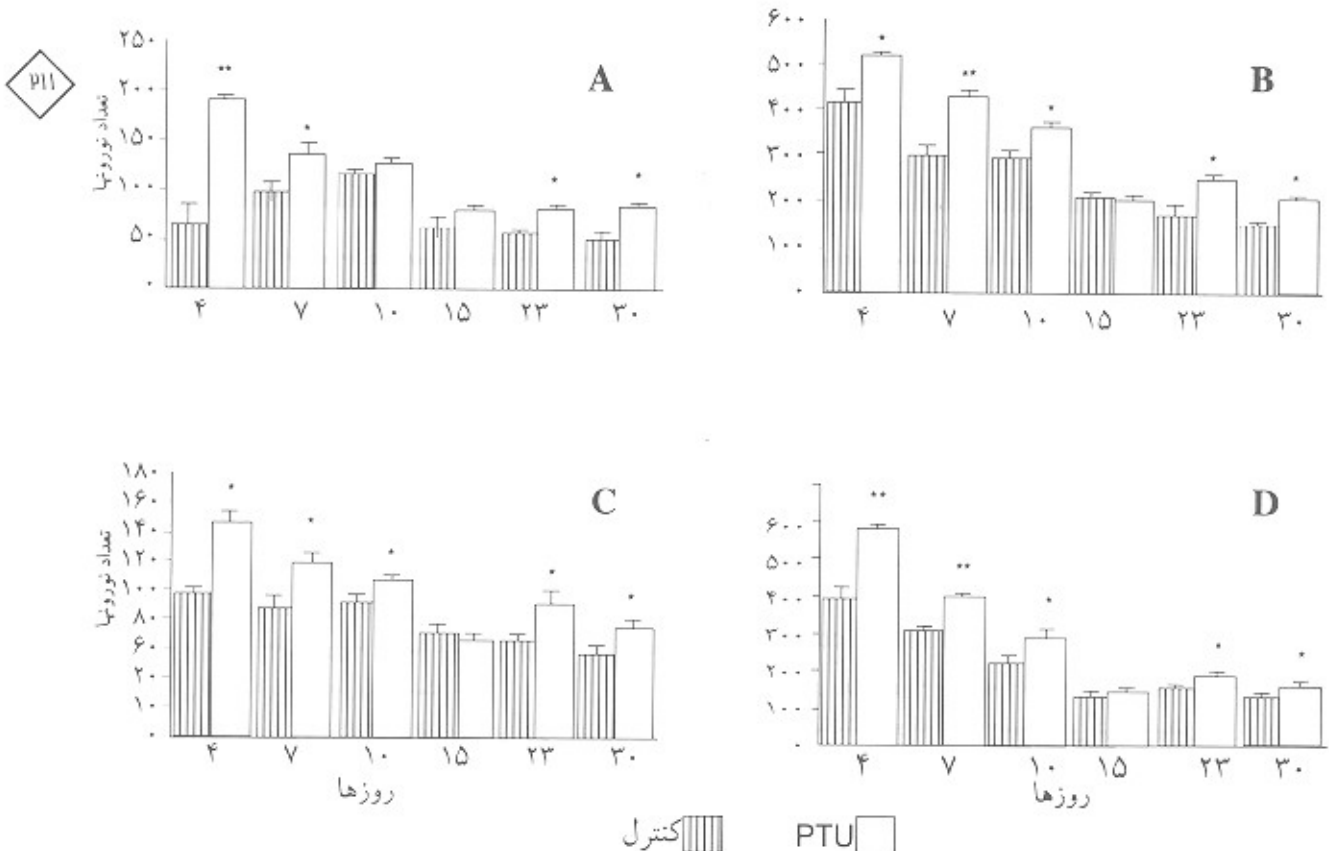
مطالعه میکروسکوپی برشهای مغز حضور نورونهای دارای فعالیت NADPH-diaphorase را در تمام روزهای مطالعه و در نواحی مختلف کورتکس نوزادان کنترل و آزمون نشان داد. در روش ND علاوه بر نورنها بافت زمینه نیز رنگ می‌گیرد که میزان آن در نواحی و لایه‌های مختلف کورتکس با توجه به تراکم بخشهای

نورویل حاوی آنزیم NOS نورونی متفاوت است. رگهای خونی نیز تا حدی رنگ می‌گیرند. این دو ویژگی از نظر تعیین موقعیت نورونها در کورتکس و نیز ارتباط آنها با رگهای خونی قابل توجه است.

* نواحی کورتیکال Cingulate cortex

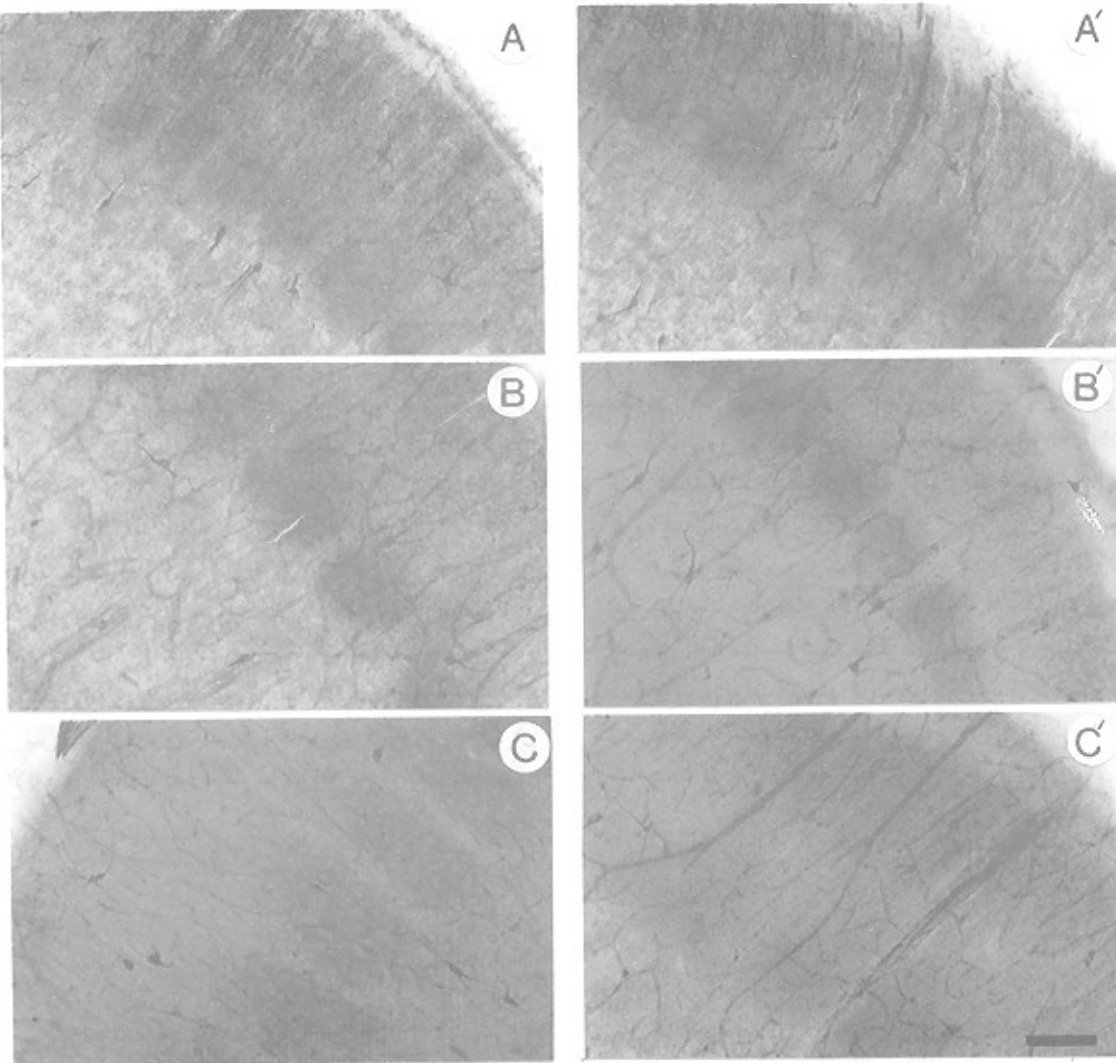
در روز چهارم پس از تولد نورونهای ND⁺ اغلب در لایه‌های V و VI قرار داشتند. نورونها دارای جسم سلولی کوچک به اشکال گرد یا بیضی با سه الی چهار نوریت اولیه و با رنگ پذیری متوسط بودند. نوریتها کوتاه و در طول خود دارای بخشهای متورم Varicos Like و با ظاهر تسبیح مانند بودند. در گروه آزمون تعداد نورونها ۰/۶۶ بیشتر از گروه کنترل بود (P<0.01).

در روز هفتم پس از تولد در گروه کنترل تعداد نورونها نسبت به روز چهارم افزایش نشان داد. تا این مرحله از رشد، نورونهایی که در لایه‌های II-VI مشاهده شدند بیشتر دو قطبی، و با جسم سلولی گرد یا بیضی شکل بودند. نوریتها در بخش پروکسیمال ضخیم و پیاپی شکل و در بخش دیستال نازک و دانه تسبیحی بودند (شکل ۲: A و B). این مشخصات در هر دو گروه مشابه بود.



نمودار ۱- روند تغییرات و مقایسه تعداد نورونهای ND⁺ در نواحی A، سینگولیت، B، فرونتال، C، PII و D، پارینتال کورتکس نوزادان کنترل و آزمون

برنامه سینگولیت به استثنای روزهایی ۱۰ و ۱۵ و بر بقیه نواحی به استثناء روز ۱۵ پس از تولد تعداد نورونهای ND⁺ در گروه آزمون به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل است. *P<0.05، **P<0.01



شکل ۱: تصویر میکروسکوپی از ناحیه پارینال کورتکس نوزادان کنترل و آزمون؛ روند تغییرات بارل فیلهها در لایه IV در روزهای ۷، ۱۰ و ۱۵ پس از تولد

A: در روز ۷ پس از تولد بارل فیلهها در گروه کنترل مشخص می‌شود. A': در گروه آزمون بارلها کوچکتر بوده و حدود آنها به خوبی مشخص نیست. B: در روز ۱۰ بارلها به خوبی از یکدیگر متمایزند. B': در گروه آزمون بارلها کوچکتر بوده و به خوبی از یکدیگر متمایز نیستند. C: در ۱۵ بارلها بزرگتر می‌شوند ولی کمتر رنگ می‌گیرند. C': در گروه آزمون بارلها به طور قابل توجهی نسبت به گروه کنترل کوچکتر و کمتر رنگ هستند. خط مقیاس ۹۸ میکرون

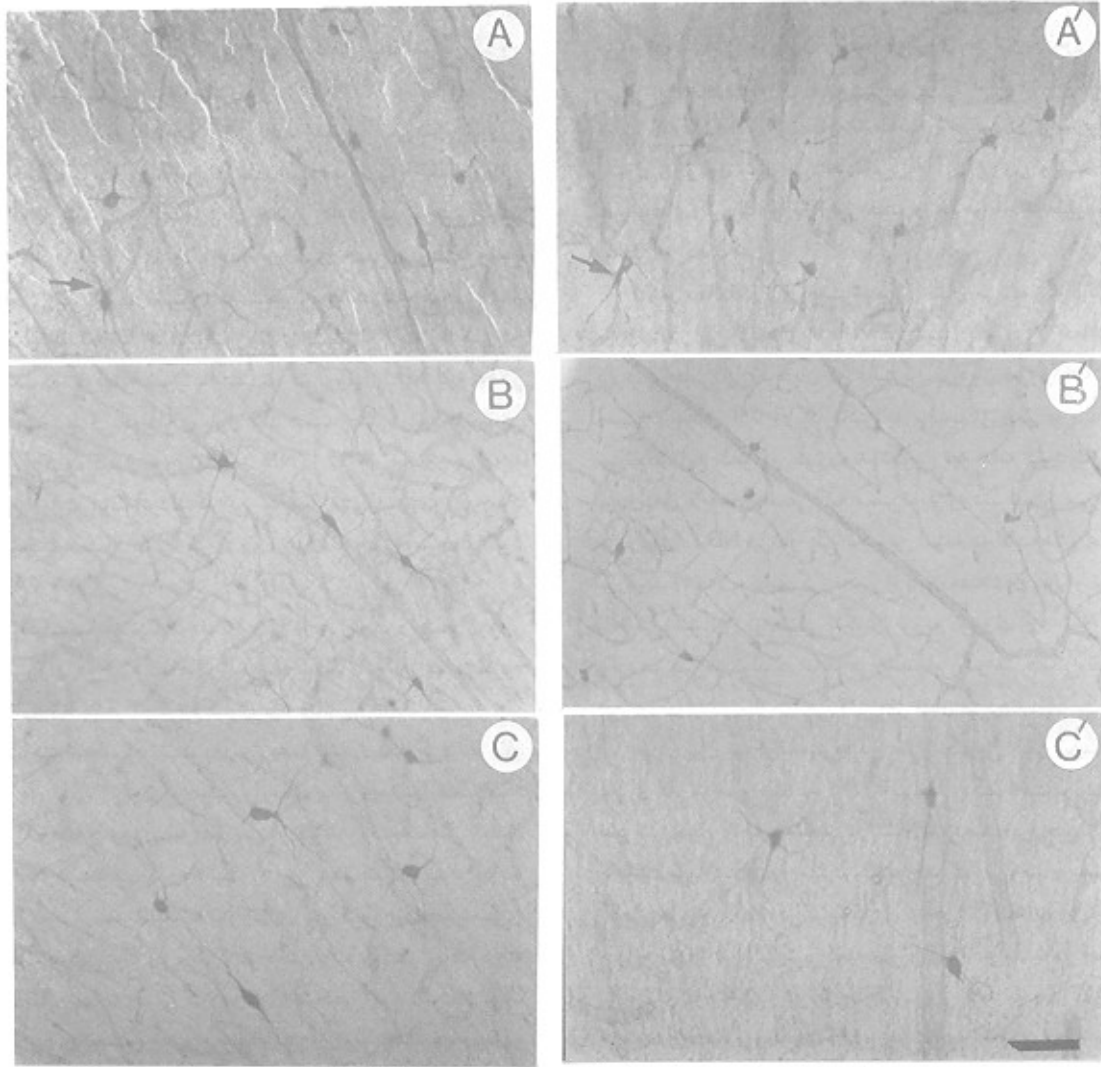
در روزهای بیست و سوم و سی ام پس از تولد الگوی توزیع نورونها در هر گروه مشابه روز پانزدهم بود، ولی تعداد نورونهای نشاندار شده در این روزها به ترتیب ۳۰ و ۴۲ درصد بیشتر از گروه کنترل بود. ($P < 0.05$) (نمودار ۱: A).

Frontal cortex

در روز چهارم نورونها اغلب در لایه‌های V و VI قرار داشتند. نورونها بیشتر دو قطبی با جسم سلولی گرد یا بیضی بوده و تعدادی از آنها به طور عمود به سطح Pial قرار داشتند. در گروه آزمون تعداد نورونها ۲۱ درصد بیشتر از گروه کنترل بود ($P < 0.05$) و نورونها به طور غیرمنظم و در جهات مختلف قرار داشتند. در روز هفتم پس از تولد تعداد نورونها در هر دو گروه نسبت به روز چهارم کاهش یافت ولی تعداد نورونها در گروه آزمون ۳۱ درصد بیشتر از گروه کنترل بود.

در روز هفتم پس از تولد در گروه آزمون با وجود کاهش تعداد نورونها نسبت به روز چهارم، این تعداد ۲۵ درصد بیشتر از گروه کنترل بود ($P < 0.05$). در گروه کنترل روند افزایش نورونهای ND⁺ تا روز دهم پس از تولد ادامه یافت این افزایش بیشتر در لایه‌های II و III مشاهده شد. در گروه آزمون تعداد نورونها نسبت به روز هفتم همراه با کاهش بود و با این حال هنوز ۸ درصد بیشتر از گروه کنترل بود که اختلاف معنی داری از نظر آماری نداشت.

در روز پانزدهم پس از تولد تعداد نورونها در گروه کنترل نسبت به روز دهم کاهش یافت و از طرف دیگر در این روز تعداد نورونها در گروه آزمون اندکی بیشتر بود اما این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود. در عین حال در این گروه جسم سلولی نورونها کوچکتر و استپاله‌های آنها کوتاهتر بود. در گروه کنترل نورونها اغلب در لایه‌های II و III و در گروه آزمون نورونها در لایه‌های VI-II توزیع شده بودند.



شکل ۲: تصویر میکروسکوپی ارتباط نورونهای ND⁺ با رگهای خونی در کورتکس نوزادان کنترل و آزمون

B-A و C این ارتباط را در نوزادان کنترل ۱۵.۷ و ۲۰ روزه نشان می‌دهند. B⁺A⁻ و C⁺ به طور معادل این ارتباط را در نوزادان آزمون ۱۵.۷ و ۲۰ روزه نشان می‌دهند. در هر دو گروه ارتباط نورونها با رگها دیده می‌شود ولی در گروه کنترل به دلیل رشد دندریتی بیشتر این ارتباط مشخص تر است. شکل خاص بندریت نورونها در هر گروه مشخص شده است: (↑) خط مقیاس A⁺B⁻ و A⁻B⁺ ۹۸ میکرون، C⁺ و C⁻ ۲۲ میکرون

(P<0.05) در گروه کنترل تعداد نورونهای ND⁺ در روزهای هفتم و دهم پس از تولد نسبت به روز چهارم تغییر چندانی نشان نداد ولی در این مدت تراکم در لایه‌های سطحی II و III بیشتر شد. در گروه آزمون تعداد نورونها به ترتیب ۲۵ و ۱۴ درصد بیشتر از گروه کنترل بود (P<0.05). در روز ۱۵ پس از تولد تعداد نورونها در هر دو گروه نسبت به روز ۱۰ کاهش یافت و تعداد نورونهای شاندار در گروه آزمون تا حدی کمتر از گروه کنترل بود و این تفاوت معنی دار نبود. در روزهای ۲۳ و ۳۰ پس از تولد تعداد نورونها در گروه آزمون به ترتیب ۳۵ و ۲۴ درصد بیشتر از گروه کنترل بود (P<0.05) (نموار ۱: C).

روند کاهش تعداد نورونهای ND⁺ در هر گروه در روزهای ۱۰ و ۱۵ پس از تولد ادامه یافت. در روز ۱۰ پس از تولد تعداد نورونهای ND⁺ گروه آزمون ۲۵ درصد بیشتر از گروه کنترل بود (P<0.05) ولی در روز ۱۵ پس از تولد تفاوت معنی دار نبود. در هر دو گروه نورونها در تمام لایه‌ها حضور داشتند ولی تراکم در لایه‌های II و III بیشتر بود. در روزهای ۲۳ و ۳۰ پس از تولد الگوی توزیع نورونها مشابه روز ۱۵ بود ولی تعداد نورونهای ND⁺ در گروه آزمون در این روزها به ترتیب ۳۲ و ۲۹ درصد بیشتر از گروه کنترل بود (P<0.05) (نموار ۱: B).

Parietal cortex area 1

در روز ۴ پس از تولد در هر دو گروه بیشترین نورونها در لایه‌های V و VI قرار داشتند و تعداد نورونها در گروه آزمون ۳۳ درصد بیشتر از

Forelimb Hindlimb cortex

در روز ۴ پس از تولد نورونها اغلب در لایه‌های V و VI قرار داشتند و تعداد آنها در گروه آزمون ۳۴ درصد بیشتر از گروه کنترل بود

گروه کنترل بود ($P < 0.01$). در روز هفتم پس از تولد تعداد نورونهای نشاندار در هر دو گروه نسبت به روز چهارم کاهش یافت و در گروه آزمون ۲۱ درصد بیشتر از گروه کنترل بود ($P < 0.05$).

در بخشهایی از لایه IV ناحیه Par1 بافت زمینه به صورت تودههایی تقریباً مجزا رنگ گرفته بودند این امر نشان می‌دهد آنزیم NOS نورونی در نوروپیل این نواحی به مقدار زیاد حضور دارد. این نواحی همان بارلها (barrel fields) یا نواحی ختم آورانهای حسی مربوط به سبیل هستند. فواصل بین بارلها (سپتوم) که کمتر رنگ گرفتند محل ختم پروجکشنهای Callosal هستند. نورونهای نشاندار لایه IV هم در سپتوما و هم در بارلها حضور داشتند. تراکم نورونهای ND⁺ لایه IV در بخشهای شکمی طرفی که دارای بارل فیلد هستند بیشتر از نواحی پشتی میانی بود. در گروه کنترل نورونهای ND⁺ در نواحی مجاور بارلها به طور منظمی آرایش یافته بودند که این نظم در گروه آزمون وجود نداشت. همچنین حدود بارلها در گروه آزمون به خوبی مشخص نبود (شکل ۱: A و A').

در روز دهم پس از تولد تعداد نورونها در هر دو گروه کمتر از روز هفتم بود. نورونها در تمام لایهها توزیع شده بودند و تعداد آنها در گروه آزمون ۲۵ درصد بیشتر از گروه کنترل بود ($P < 0.05$). بارلها در هر دو گروه مشاهده شدند که نسبت به روز هفتم بیشتر رنگ گرفته بودند. ولی بارلها در گروه آزمون کوچکتر و رنگ پذیری آنها کمتر بود (شکل ۱: B و B'). تا روز پانزدهم پس از تولد روند کاهش تعداد نورونهای ND⁺ در هر دو گروه نسبت به روز دهم پس از تولد ادامه یافت. در این روز تفاوت تعداد نورونهای دو گروه از نظر آساری معنی دار نبود. بارلها در گروه آزمون کوچکتر بوده و کمتر رنگ گرفته بودند و فواصل آنها به خوبی کنترل مشخص نبود (شکل ۱: C و C'). در روزهای بیست و سوم و سیام پس از تولد تعداد نورونها در گروه آزمون به ترتیب ۱۵ و ۱۹ درصد بیشتر از گروه کنترل بود. در این روزها بارلها نسبت به روز پانزدهم پس از تولد کمتر رنگ گرفته بودند و با این حال تفاوت در اندازه بارلها بین دو گروه کاملاً مشخص بود. به طور کلی، در نوزادان گروه آزمون در تمام نواحی مورد مطالعه قشر مغز به ویژه در روزهای پانزدهم، بیست و سه و سیام پس از تولد، اندازه جسم سلولی نورونهای ND⁺ و زواید آنها نسبت به گروه کنترل کمتر بود. از روز پانزدهم تا سیام پس از تولد میزان رنگهای کورتکس دو گروه آزمون و ارتباط نورونهای ND⁺ با عروق خونی کمتر از گروه کنترل بود (شکل ۲).

۲۱۴

بحث

کندی افزایش وزن نوزادان گروه آزمون از کاهش شدید یا فقدان فعالیت تیروئید ناشی می‌شود. هیپوتیروئیدسم باعث کاهش سطح پلاسمایی و هیپوفیزی هورمون رشد و کندی روند افزایش وزن می‌شود به طوری که درجه شدت هیپوتیروئیدسم القا شده به خوبی در تغییرات وزن نوزادان منعکس می‌شود (۱۲، ۱۳). Meisami نشان داد که تجویز PTU ۰/۱ درصد از روز تولد به مادران شیرده غلظت هورمونهای تیروئید را قبل از روز دهم تا حد صفر کاهش می‌دهد (۱۲). کاهش وزن

مغز اغلب از کاهش میلین سازی و کاهش رشد و توسعه سلولی ناشی می‌شود نه کاهش هورمون رشد، به طوری که تزریق هورمون رشد به نوزادان هیپوتیروئید اثر بهبود بخشی بر روند بلوغ ساختارهای مغزی ندارد (۱، ۱۲). در این مطالعه، مقایسه شاخصهای رشد بین گروههای کنترل و آزمون نشان می‌دهد تجویز PTU از روز تولد به بعد، غلظت هورمونهای تیروئید را در روز هفتم و بعد از آن به طور قابل توجهی کاهش می‌دهد.

نتایج مطالعات نرو هیستوشیمیایی نشان می‌دهد که الگوی توزیع نورونها در بین لایه‌های II تا VI کورتکس با گرادیان شعاعی مطابقت دارد. براساس این گرادیان که غالبترین گرادیان نورونوتیک کتل مغز است، لایه‌های II تا VI کورتکس به ترتیب از عمق به سطح تشکیل می‌شوند. این الگو در طی روند تکوین نیز ادامه دارد به طوری که نورونهای لایه‌های عمقی که مسن‌ترین زودتر بالغ می‌شوند (۱۴). نورونهای ND⁺ نیز در طی تکوین ابتدا در لایه‌های عمقی ظاهر می‌شوند (۶). لایه بندی کورتکس تا پایان هفته دوم پس از تولد به شکل بالغ می‌رسد (۷) از طرفی الگوی توزیع نورونهای ND⁺ نیز تا روز پانزدهم پس از تولد به ثبات می‌رسد. این شواهد همگی نقش احتمالی این نورونها را در سازماندهی قشر مغز نشان می‌دهند.

میزان بیان نوروترانسمیترها در طی تکوین مغز ثابت نیست به طوری که برخی همانند VIP افزایش یکنواخت و برخی مانند هموکسیناز-۱ کاهش مداومی را نشان می‌دهند. در حین تکوین بیان NOS همزمان با شروع سیناپتوژنز به حداکثر می‌رسد و سپس میزان بیان کاهش می‌یابد (۱۵). در گروه کنترل نواحی FL/HL, Fr و Par1 در روز چهارم پس از تولد بیشترین تعداد نورونها را داراست، در حالی که تعداد نورونهای ناحیه Cg در روز دهم پس از تولد به حداکثر تعداد خود می‌رسد. احتمالاً روندهای تکوین مرتبط با NO در ناحیه Cg نسبت به سایر نواحی مطالعه شده دیرتر به حداکثر می‌رسند. Oermann و همکاران روند مشابهی را در موش سوری گزارش کردند؛ در موش سوری تعداد نورونهای ND⁺ نواحی حسی و حرکتی در روز اول پس از تولد به حداکثر خود می‌رسد و کورتکس سینگولیت هم مشابه موش صحرائی این روند را با تأخیر طی می‌کند (۱۶).

تراکم بیشتر نورونها در بخشهای شکمی جانبی در مقایسه با قسمتهای پشتی میانی از گرادیان عرضی و تفاوتی عملکردی نواحی مختلف نتیجه می‌شود. بخشهای شکمی جانبی کورتکس سوماتوسنسوری (Par1) که دارای بارل فیلد هستند، ورودیهای حسی مربوط به اطراف دهان و سبیلها را دریافت می‌کنند؛ در حالی که قسمت پشتی میانی که لایه IV نازکتری دارد به پا، پنجه‌ها و تنه مربوط است (۱۷، ۱۸). نوزادان برای شناسایی محیط و ارتباط با مادر شدیداً به ورودیهای حسی که از سبیل و اطراف دهان می‌آیند، وابسته‌اند. بر همین اساس کورتکس سوماتوسنسوری در بخشهای شکمی جانبی زودتر از نواحی پشتی میانی تکامل می‌یابد (۱۸). تفاوت مشابهی در ناحیه حرکتی فرونتال مشاهده می‌شود. ناحیه طرفی فرونتال در مقایسه با

باعث تغییرات میکروسکوپی در فشر مغز شود. نورونهای ND⁺ کورتکس در پایان هفته دوم پس از تولد و همزمان با خشم لایه‌بندی کورتکس از نظر تعداد و توزیع در بین لایه‌ها به ثبات می‌رسند. در این زمان تفاوت تعداد نورونها ND⁺ دو گروه از نظر آماری معنی دار نیست، ولی روند کاهش تعداد نورونهای نشاندار به طور آهسته در نوزادان کنترل و هیپوتیروئید از روز بیست و سوم تا سی‌ام پس از تولد ادامه می‌یابد.

کاهش رشد دندربینی در نتیجه هیپوتیروئیدسم قبلاً در مورد نورونهای کولینرژیک مغز قدامی (۳) و نورونهای هرمی کورتکس شتوایی به روش گلژی نشان داده شده است (۲۵). این اثر اغلب از کاهش فاکتور رشد عصبی ناشی می‌شود (۲۴). از طرفی فیبرهای آوران به کورتکس برای تحریک رشد دندربینی و بلوغ نورونها ضروری‌اند (۱۷). کاهش ورودیهای کولینرژیک و آورانهای حسی در هیپوتیروئیدسم می‌تواند یکی از عوامل کاهش رشد نورونی باشد. کاهش واسکولاریزاسیون کورتکس نوزادان هیپوتیروئید تا حدودی از کاهش نیازهای متابولیک آن ناشی می‌شود (۱۰). کاهش رشد دندربینی نورونها در گروه هیپوتیروئید ممکن است عامل دیگر کاهش ارتباط نورونهای ND⁺ با عروق خونی باشد.

کاهش رشد کورتکس مغز یکی از اثرهای بارز هیپوتیروئیدسم است. حضور فراوان نورونهای حاوی نیتریک اکسید در کورتکس مغز به خصوص در طول رشد جنینی و نوزادی نشان دهنده نقش این نوروترانسمیتر در تکوین ساختاری و عملی کورتکس است. نتایج حاصل از تحقیق حاضر، افزایش نورونهای حاوی نیتریک اکسید را نشان می‌دهد که احتمالاً از کاهش پایانه‌های کولینرژیک کورتکس ناشی شده و می‌تواند یکی از عوامل اختلالات یادگیری در هیپوتیروئیدسم پس از تولد باشد.

بخشی میانی آن دارای تراکم بیشتری از نورونهای نشاندار بوده و زودتر به حداکثر تراکم می‌رسد. ناحیه جانی فرونتال مربوطه به بخش حرکتی آوارده‌ها است (۱۷) و شاید تمایز سریعتر این ناحیه که با افزایش نورونهای نشاندار همراه است به دلیل فعال شدن سریعتر آوارده‌ها به منظور مکیدن شیر باشد.

اغلب آسیبهای عصبی با افزایش تعداد نورونهای حاوی NOS یا ND همراهند (۱۹، ۲۰) در مغزهای الکلی و تحت استرسهای مزمن، افزایش تعداد نورونهای حاوی NOS مشاهده شده (۲۱، ۲۲) در حالی که در موشهای بزرگسال تعداد این نورونها گزارش شده است (۲۳). در حال حاضر گزارشی از اثرهای هیپوتیروئیدسم بر نورونهای ND⁺ سیستم عصبی در دسترس نیست. در هیپوتیروئیدسم پس از تولد تعداد پایانه‌های کولینرژیک مغز قدامی در قشر مغز و هیپوکامپ شدیداً کاهش می‌یابد (۳، ۲۴). Sabbatini و همکاران نشان دادند تخریب الکترولیتیک هسته NBM¹ فعالیت واکش ND را در نورونهای کورتکس Fronto-parietal افزایش می‌دهد. NBM هسته کولینرژیک Basal forebraine است که فیبرهای کولینرژیک خود را به کورتکس فرونتال و پاریتال می‌فرستد (۱۹). بنابراین افزایش معنی‌دار تعداد نورونهای ND⁺ در نواحی مختلف قشر مغز نوزادان هیپوتیروئید ممکن است از کاهش نرمینالهای کولینرژیک قشر مغز (ناشی از هیپوتیروئیدسم) نتیجه شده باشد. افزایش نورونهای ND⁺ در کورتکس موشهایی که قابلیت یادگیری ضعیفی دارند نیز مشاهده شده است (۱۶). بنابراین افزایش نورونهای ND⁺ در قشر مغز احتمالاً در اختلال حافظه و یادگیری ناشی از هیپوتیروئیدسم نوزادی نقش دارد. در این تحقیق افزایش تعداد نورونهای ND⁺ در روز چهارم پس از تولد نیز مشاهده شد که نشان می‌دهد تیمار PTU می‌تواند قبل از کاهش معنی‌دار غلظت هورمونهای تیروئید با کاهش فعالیت بیلوژیک آنها

References

1. Braverman LE: The Thyroid. A fundamental and clinical text. Lippincott Raven 1996
2. Goldy ES, Kehn LS: Effects of developmental hypothyroidism on auditory and motor function in the Rat. Toxicol Pharmacol 1995; 135: 67-76
3. Oh J, Butcher LL, Woolf NJ: Thyroid hormone modulates the development of cholinergic terminal fields in the rat forebrain: relation to nerve growth factor receptor. Dev Brain Res 1991; 59: 133-142
4. Bernal J, Guadano A, Thyroid hormone and the development of the brain. current opinion in Endocrinology and Diabetes 1998; 5: 296-302
5. Halpern R, Cooper DS: Propylthiouracil (PTU) pharmacology in the Rat. I. Serum and thyroid PTU measurements by radioimmunoassay. Endocrinol 1983; 113(3): 915-920
6. Samama B, Chateau D, Boehm N, Expression of NADPH- diaphorase in the rat forebrain during development. Neuroscie Lett 1994; 184: 204-207
7. Yan XX, Garey LJ, Jen LS: Development of NADPH-diaphorase activity in the rat neocortex. Dev Brain Res 1994; 79: 29-38
8. Schuman EM, Madison DV: Nitric oxide and synaptic function. Annu Rev Neuroscie 1994; 17: 153-83
9. Szabo C: Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. Brain Res Bull 1996; 41(3): 131-144
10. Hammani C, Tenorio F: Loss of NADPH-diaphorase positive neurons in the hippocampal formation of chronic pilocarpine - epileptic rats. Hippocampus 1999; 9: 303-313
11. Paxinos G, Watson C: The rat brain in the



- stereotaxic coordinations. 2ed Academic press 1986
12. Meisami E: Complete recovery of growth deficits after reversal of PTU-induced postnatal hypothyroidism in the female rat : A model for catch-up growth. *life science* 1984; 34: 1487-14956
 13. Ruiz Marcos A, Sanchez Toscano F: Severe hypothyroidism and the maturation of the rat cerebral cortex. *Brain Res* 1979; 162: 315-329
 14. Paxinos G: The rat nervous system. Academic press, New York, 1994
 15. Ogilvie P, Schilling K: Induction and variants of neuronal nitric oxide synthase type I during synaptogenesis. *FASEB J* 1995; 9(9): 799-806
 16. Oermann E, Bidmon HJ: The distribution of nitric oxide synthase-I and NADPH-diaphorase containing Neurons in the cerebral cortex of different strains of Mice and its association with learning and memory. *J Brain Res* 1998; 39(1): 65-75
 17. Kolb B, Tees RC: The cerebral cortex of the rat. the MIT press, Massachusetts, 1990
 18. Bravo H, Inzunza O: Distribution of NADPH-d positive neurons during postnatal development of the rat somatosensory cortex correlates with gradient of neurogenesis and development. *Neurosci Lett* 1997; 234: 103-106
 19. Sabbatini M, Bronzetti E, Felici L: NADPH-diaphorase histochemistry in the rat cerebral cortex and hippocampus: Effect of electrolytic lesions of the nucleus basalis magnocellularis. *Mechanisms of Ageing and development*. 1999; 107: 147-157
 20. Benzing W, Mufson EJ: Increased number of NADPH-d- positive neurons within the substantia innominata in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1995; 670: 351-355
 21. Quinn MR, Harris CL: Lead inhibits Ca⁺⁺-stimulated nitric oxide synthase activity from rat cerebellum. *Neurosci Lett* 1995; 196: 65-68
 22. Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I: Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. *J Neurochem* 2000; 74(2): 784-791
 23. Quinn MR, Harris CL: Lead inhibits Ca⁺⁺-stimulated nitric oxide synthase activity from rat cerebellum. *Neurosci Lett* 1995; 196: 65-68
 24. Sawin S, Brodish P, Carter CS: Development of cholinergic neurons in rat brain regions: Dose-dependent effects of propylthiouracil induced hypothyroidism. *Neurotoxicol Teratol* 1998; 20(6): 627-635
 25. Ruiz-Marcos A, Salas J: Effect of neonatal and adult-onset hypothyroidism on pyramidal cells of the rat auditory cortex. *Dev Brain Res* 1983; 9: 205-213

