

Effekt av medfødt hypothyreose på hjerneutvikling.

**En litteraturgjennomgang og resultater fra en
pilotstudie av eksperimentell hypothyreose på
kyllingfoster.**

Hanne Fredlund Tollefsen
Trine Sun Johansson

Medisinsk fakultet, Universitetet i Oslo
August 2010

Veiledere:

Jan Mæhlen

Professor

Patologisk anatomisk avdeling, Oslo Universitetssykehus avd. Ullevål

Petra Anden

Stipendiat og barnenevrolog

Patologisk anatomisk avdeling, Oslo Universitetssykehus avd. Ullevål

Innholdsfortegnelse:

Abstract

Ordliste/forkortelser

Teoretisk del

Generelt om skjoldbruskkjertelen

Anatomi

Utviklingen av tyroidea

Tyroksinmetabolisme

Tyroideahormonenes funksjon

Regulasjon av tyroideahormonene

Hypothyreose

Kongenitt hypothyroidisme

Screening

Behandling

Prognose

Observasjoner på dyr

Hypothyreose hos gravide som årsak til utviklingsforstyrrelser

Cerebellum

Embryologi

Anatomi

Funksjonsfordeling i cerebellum

Signaloverføring i lillehjernecortex

Cerebellums funksjon

Tyroksins virkning på cerebellum og andre deler av sentralnervesystemet

TH og lillehjerne av kyllingembryo

Eksperimentell del

Innledning

Kyllingmodellen

Kyllingembryologi

Cerebellum hos pattedyr

Utgangspunkt for den eksperimentelle studien

Methimazole

Metode

Resultat

Diskusjon

Referanser

Abstract

Congenital hypothyroidism may cause stunted physical and mental growth (cretinism). In the western world this is prevented by neonatal screening combined with hormonal substitution of affected individuals, but the condition is still common in non-western regions where maternal nutritional deficiency of iodine occurs.

Even though the screening program is a success, some studies do suggest that motor and cognitive abilities may be lower than normal in children treated for congenital hypothyroidism. This may indicate that low levels of thyroid hormones prior to birth may have permanent effects on the brain.

We have tested whether hypothyroidism induced by Methimazole treatment disturbs the rates of mitosis and apoptosis of cerebellar granule neurones in the chicken embryo.

Eggs were injected with three different concentrations of Methimazole or control NaCl on embryonic day (ED) 16 and sacrificed on ED 17 when the mitotic and apoptotic rate peaks in cerebellar granule neurones.

We found a tendency that some doses of Methimazole reduced the mitotic rate while no increase in apoptotic rate was detected. We propose that larger scaled experiments should be performed in order to obtain statistically significant results.

Ordforklaringer:

BrdU - Bromodeoxyuridine

CNS - Sentralnervesystemet

DIT - Dijodert tyrosin

GABA – Gamma amino smørsyre

HCG – human chorionic gonadotropin

HE – Hematoxylin + Eosin farging

KonHT – Kongenitt hypotyreose

MIT - Monojodert tyrosin

NS - Nervesystemet

PTU - Propylthiouracil

RTH – Resistans mot tyroideahormoner

SD – Standaravvik

SE – Standardfeil

T3 – Trijodtyronin

T4 - Tyroksin

TBG - Tyroksinbindenoglobulin

TG - Tyroglobulin

TH – Tyroideahomoner

TR - Tyroideahormonreseptor

TR α 1 – Reseptor på purkinjecellene

TRAS – Tyroideareseptor antistoff

TRE - Tyroideahormon respons element

TRH – Tyroidea releasing hormone

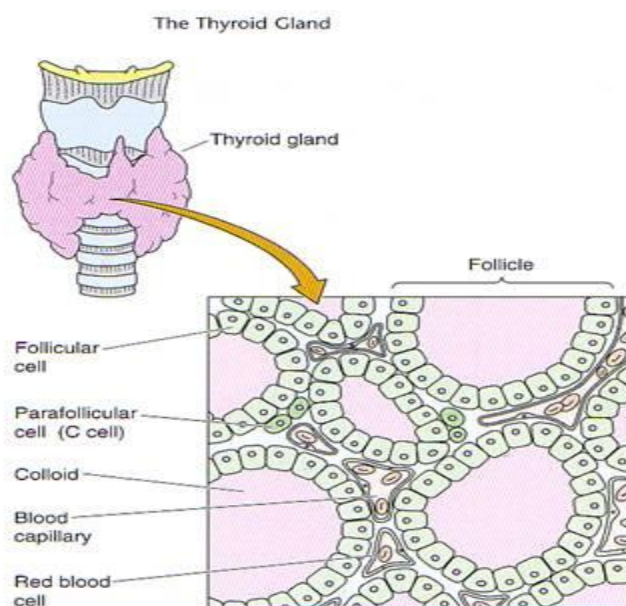
TSH – Tyroidea stimulerende hormon

Teoretisk del

Generelt om skjoldbruskkjertelen

Anatomi

Tyroidea (skjoldbruskkjertelen) er en endokrin kjertel med vekt på 20-30g, som ligger nedenfor larynx. [1] Den utvikler seg fra celler i den primitive munnhulen. Den består av to lapper, som er festet til trakea, og knyttet sammen gjennom en smal vevsbro. De hormonproduserende kjertelcellene danner follikler som har kolloidholdig lumen. Mellom folliklene er det bindevev med kapillærer og C-celler som lager calcitonin. Kjertelen har stor blodgjennomstrømning.

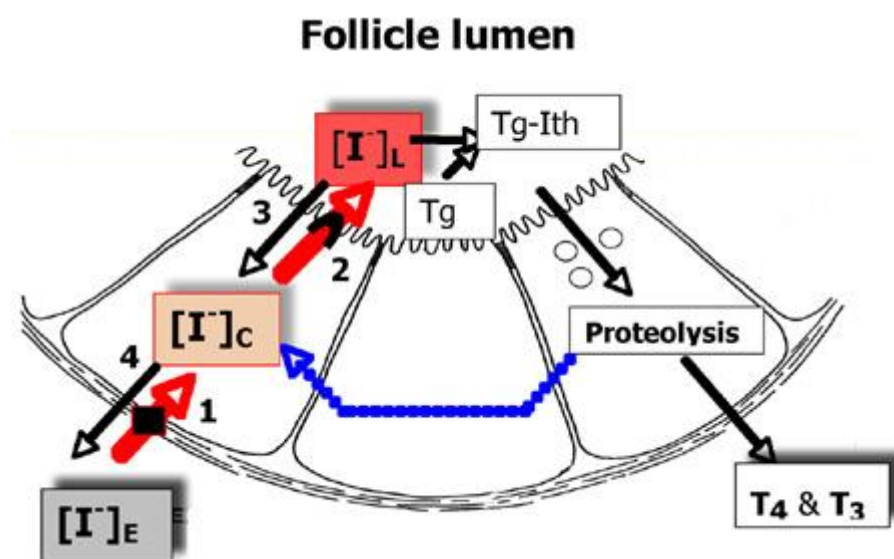


Utviklingen av tyroidea

Glandula tyroideas utvikling begynner som epitelproliferasjon i farynx midtlinje i området som senere blir til foramen caecum. [2] Deretter migrerer kjertelen ned foran svelget og os hyoideum, som et divertikkel med to lobi. Sin endelige plass foran trakea finner den i gestasjonsuke syv. Den består da av en istmus med to lobi. Under vandringsen nedover beholder kjertelen forbindelse til tungen ved ductus thyroglossus. Denne embryonale strukturen forsvinner senere. Cystiske rester av ductus thyroglossus, "thyroglossuscyster", kan finnes hvor som helst på tyroideas migrasjonsvei. De ligger alltid i halsens midtlinje. Thyroglossusfistler er åpninger fra en thyroglossuscyste til overflaten. Disse dannes som regel etter ruptur av en cyste. Enkelte ganger kan utviklingen være ufullstendig. Tyroideavev kan derfor finnes hele veien fra farynx til den endelige plasseringen foran trakea (og noen ganger nedenfor denne, for eksempel ved intrathorakalt struma). Hyppigst ses det ved basis av tungen. Noen ganger kan kjertelen også mangle helt. Kjertelen begynner å fungere i slutten av tredje svangerskapsmåned.

Tyroksinmetabolisme

Proteinet tyreoglobulin (TG) blir syntetisert i follikkelcellenes endoplasmatiske retikulum. [3] Det pakkes i blærer i Golgi apparatet, og tømmes ved eksocytose inn i follikkellumen, hvor det utgjør hovedbestandelen i kolloidet. Et tyreoglobulinmolekyl består av ca 70 aminosyrer. Jod er nødvendig for syntese av tyreoidhormonene, det blir tatt sekundært aktivt opp i follikkelcellene ved hjelp av en Na/I symport. For at jodet skal kunne binde seg direkte til TGs tyrosinaminosyrer må det først oksideres. Dette skjer ved hjelp av en peroksidase, et enzym som ligger i den apikale celledmembranen eller i nær tilknytning til den, og hydrogenperoksid, et sterkt oksidasjonsmiddel som produseres i follikkelcellene. [4] Det oksiderte jodidet reagerer med en jodase, et enzym som øker hastigheten av bindingen av det oksiderte jodet til TGs tyrosiner når TG skilles ut i follikkellumen. Det dannes monojodert tyrosin (MIT), og diiodert tyrosin (DIT). Joderte tyrosiner som kommer i nær kontakt med hverandre pga tyreoglobulinets folding, danner T3 (trijodtyronin) og T4 (tyroksin). Follikkelcellene tar opp kolloidvesikler ved endocytose. Vesiklene smelter sammen med lysosomer som frigjør tyreoidhormonene fra tyreoglobulinet. Hormonene er små og fettløselige, og diffunderer derfor gjennom celledmembranen og ut i kapillarene som omgir folliklene [3]. MIT og DIT frigjøres også. Disse er uten biologisk virkning. De deioderes av en deiodase. Jodet brukes deretter på nytt til jodering av mer tyreoglobulin. Normalt utgjør T4 90% av hormonsekresjonen. T3 10%.



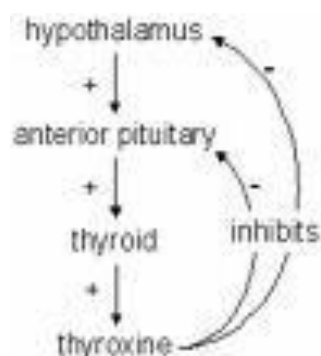
T4 og T3 transporteres bundet til forskjellige plasmaproteiner. [1] Tyroksinbindende globulin (TBG) binder 70-80%. Tyroksinbindende prealbumin (transtyretin) 10-15% og albumin 10-20%. Av total konsentrasjon er kun 0,03% T4 og 0,3% T3 fritt. Det er kun dette som er biologisk aktivt, fordi kun de frie hormonene har anledning til å diffundere ut av blodbanen og inn i målcellene. Under vanlige forhold er kun ca halvparten av TBGs kapasitet i bruk. Ved stor hormonutskillelse vil TBG derfor være en buffer, som beskytter mot skadevirkning av for mye frigjort hormon. Ved ankomst hos målcellen diffunderer T3 og T4 over celledmembranen og deioderes. Begge hormonene bindes som ligand til tyreoidreseptoren i kjernen (T3 har størst reseptoraffinitet). Hormon-hormonreseptorkomplekset danner så dimer med

retinoid X reseptor, og denne heterodimeren er transkripsjonregulerende ved å binde seg til Tyroidea Hormon Resonselementer (TRE) på DNA.

Tyroideahormonenes funksjon

Tyroideahormonene stimulerer metabolismen i de fleste celler.[1] De regulerer energiomsætningen, og er nødvendig for normal lengdevekst. De er også nødvendig for normal utvikling av sentralnervesystemet (CNS) hos fosteret og det nyfødte barnet. Det sympatiske nervesystemet stimuleres, og impulsledningshastigheten i nervesystemet (NS) øker.

Regulasjon av thyroideafunksjonen



Hypothalamus produserer thyroidea releasing hormone (TRH) som stimulerer adenohypofysen til å skille ut thyroideastimulerende hormon (TSH). [1] TSH binder til reseptorer på follikkelcellenes overflate. Dette aktiverer en adenyl cyclase, som gir økt dannning av cAMP, som igjen stimulerer follikkelcellene til syntese og sekresjon av hormoner. Dersom TSH er forhøyet over lang tid vil det kunne føre til at follikkelcellene deler seg hyppigere enn normalt, og det utvikles struma.

Hvis konsentrasjonen av thyroideahormoner i blodet øker, gir dette en negativ tilbakekoblingseffekt på hypofysen og hypothalamus, som senker sin produksjon av TSH og TRH. [1] Resultatet blir at produksjonen av thyroideahormon synker, og konsentrasjonen i blodet beveger seg mot normal igjen.

Hypothyreoidisme (HT)

Den første kjente beskrivelsen av syndromet ble gjort av Gull i 1874. [5] HT er en sykdom som gir for lav aktivitet i glandula thyroidea. [6] Ved primær HT ligger den utløsende sykdomsprosessen i selve kjertelen. Ved sekundær og tertiær HT ligger sykdommen henholdsvis i hypofysen og hypothalamus. HT er en av de vanligste endokrine sykdommene, med en prevalens i Storbritannia på 1% hos kvinner og under 0,1% hos menn. [6] Slike pasienter kan fremstå som bradikarde og trege, ha tørt hår, tykk hud og dyp stemme, plages av vektøkning, kuldeintoleranse, og obstipasjon. I enkelte tilfeller kan pasienter med HT utvikle myksødem, som skyldes akkumulasjon av mucopolysakkarider i subcutant vev.

Kongenitt hypothyreoidisme (konHT)

I Norge antar man en prevalens av konHT på 1 per 3200. [7] Dette skyldes enten dysorganogenese eller dyshormonogenese. Av dysorganogeneser er kjertelektopi hyppigst forekommende. Kjertelvevet finner man da gjerne igjen ved tungeroten. Nest hyppigst er kjertelhypoplasi, og deretter thyroidea agenesi. Dyshormonogenesene er resultat av reseptor eller enzymdefekter knyttet til hormonproduksjonen. Dette skyldes i de fleste tilfeller mutasjoner arvet recessivt fra foreldrene. Det er i dag identifisert mutasjoner knyttet til seks forskjellige typer dyshormonogeneser. Det er også funnet TSH reseptor defekter hos enkelte barn med thyroideahypoplasi. Ubehandlet vil konHT kunne utvikle seg til kretinisme. [8] Dette er et syndrom som viser seg med mental retardasjon, døvhet, kortvoksthet og karrakteristiske ansiktsdeformasjoner.



KonHT forekommer i en forbigående og en permanent variant. Ved den forbigående varianten normaliseres TSH og fritt T4 verdiene vanligvis i løpet av cirka en uke, men dette kan også ta noe lenger tid. Det er vanskelig å skille disse fra hverandre i nyfødtp perioden. Alle barn med positiv screeningtest skal derfor behandles. Ved usikkerhet om barnet kan ha en forbigående HT bør barnet behandles til det har passert tre års alderen, fordi en utredning krever at man seponerer behandlingen for en lengre periode.

Screening



I 1934 oppdaget legen Asbjørn Følling, at to tilbakestående barn hadde en enzymdefekt som gjorde at aminosyren fenylalanin ikke ble omgjort til tyrosin. [9] Hans arbeid viste at det var sammenheng mellom barnas mentale tilstand og denne enzymdefekten, og sykdommen fikk navnet Føllings sykdom. I løpet av 1950-årene ble det vist at de som hadde en slik defekt, ble bedre hvis de gikk på en fenylalanin-fattig diett. Det ble i 1970-årene bestemt at alle nyfødte skulle screenes for denne sykdommen, og screeningen er i dag en del av det offentlige helsetilbudet.

Screeningen er i dag utvidet til også å gjelde hypotyreose, og det er en kilde til diskusjon om man skal screene for flere tilstander. Prøven tas som en blodprøve i hælen når barnet er mellom 60 og 72 timer gammel. Blodet dryppes på et filterpapir, luftørkes og sendes til Pediatrisk Forskningsinstitutt ved Rikshospitalet. Tilbakemelding gis bare i de tilfellene hvor det er avvikende funn eller hvor det er nødvendig med en kontroll. [7] Medfødt hypotyreose kan være primær, sekundær eller tertiær. Det er den primære varianten en fanger opp fordi man kun analyserer for TSH, mens en sekundær eller tertiær ikke vil oppdages før barnet utvikler symptomer senere. TSH normalverdien for nyfødte som er 3-4 dager gamle er $<8\text{mIE/l}$.

Behandling

Et patologisk screeningsresultat er en øyeblikkelig-hjelp situasjon. [7] Barnet trenger behandling for å hindre utvikling av hjerneskade. Innen 1 døgn, før svaret foreligger på kontrollblodprøver startes det med tyroksin substitusjon. Normalt $10\text{-}15\mu\text{g/kg}$. Det utføres en tyroidea scintigrafi så snart som mulig. Behandlingsmål er å få TSH verdiene ned til mellom $0,5\text{-}4\text{mIE/l}$. Kontrollprøve tas ca 14 dager etter behandlingsstart. Stabilt TSH nivå oppnås først etter 5-6 uker. Man tilstreber en fT4 nivå på ca 20mIE/l de to første leveårene pga tyroksins betydning for hjernens utvikling. Ved mistanke om transitorisk HT seponerer man medikamentet i tre års alder og gjør deretter nye målinger etter 4 uker. [10] Diagnosen Kon HT stilles ved at det påvises for høye verdier av TSH, og behandlingen vil bestå av livslang tilførsel av tyroksin.

Prognose

Etter at nyfødtscreeningen ble innført har prognosen for barn med konHT bedret seg betraktelig [11] På tross av dette viser mange studier at disse

barna scorer dårligere på motoriske og kognitive tester enn barn som har vært friske ved fødsel. En studie av konHT fra den norske nyfødtscreeningen sammenlignet cerebral utvikling inkludert IQ, motorisk funksjon og ferdigheter relatert til skolegang hos pasienter og deres søsken (av samme kjønn og nærmest mulig i alder) [12] Det ble funnet signifikant forskjell i IQ. KonHT gruppen scoret 2/3 standardavvik lavere enn kontrollgruppen. Det var ingen signifikant forskjell i motorisk hastighet, men koordineringen var signifikant dårligere i konHT gruppen. I lese- og skrivetester fant man ingen forskjell, men gruppen med konHT var signifikant dårligere i navnsetting og aritmetiske tester.

I en studie ved *Institute of Child Health, London*, ble kognitiv funksjon, motoriske ferdigheter og atferd hos 57 femåringer som hadde blitt diagnostisert med konHT sammenlignet med 51 kontroller. [12] Det ble kontrollert for alder, kjønn, sosial klasse og språkbakgrunn. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i IQ og atferd i forhold til den friske kontrollgruppen, men barn med konHT viste svekkede motoriske ferdigheter, særlig i forhold til balanse. Barna med alvorlig HT ved diagnosetidspunkt (plasma tyroksin nivå under 20nmol/l) viste signifikant lavere IQ og dårligere motoriske ferdigheter enn barna med mindre alvorlig HT (plasma tyroksin nivå over 60nmol/l)

En Nederlandsk studie undersøkte 70 personer med konHT oppdaget ved nyfødtscreening.[13] Gjennomsnittsalder ved behandlingsdebut var 28 dager. Gjennomsnittsalderen ved undersøkelse var 21,5 år. 49 av de undersøkte hadde også blitt undersøkt ved 9-10 årsalder. Avhengig av T4 konsentrasjonen før behandlingsstart ble konHT klassifisert som alvorlig, moderat eller mild. Særlig de med alvorlig konHT ved behandlingsstart viste nedsatte motoriske ferdigheter og noe lavere IQ. Det ble etter studien konkludert med at alvorlighetsgraden av konHT ved behandlingsstart, men ikke når behandlingen starter, påvirker alvorlighetsgraden av utvikling av nedsatte kognitive og motoriske ferdigheter.

Dette er tre eksempler på studier hvor man har sammenlignet barn med konHT som har mottatt behandling, med kontroller med tanke på særlig motoriske ferdigheter og IQ. De konkluderer alle med at nedsatte motoriske ferdigheter er knyttet til alvorlighetsgraden av den kongenitte hypotyreosen ved behandlingsstart. Oerbecks studie finner signifikant forskjell i IQ mellom barn med konHT og kontroller. Den engelske og nederlandske studien finner kun dette hos barn med alvorlig hypotyreose ved diagnosetidspunkt. Den nederlandske studien har sen gjennomsnittlig behandlingstart, noe som kan ha hatt innvirkning på det resultatet de har funnet. Noe man også burde prøve å avklare er om skaden allerede er skjedd før fødsel når fosteret har hatt for lite tyroideahormoner in utero.

Hypotyreose (HT) hos gravide som årsak for utviklingsforstyrrelser

1-2% av alle gravide blir behandlet med tyroksin på grunn av HT. [14] Under en normal graviditet vil sirkulerende østrogen øke konsentrasjonen av TBG, og dermed også konsentrasjonen av total T4. Konsentrasjonen av fT4 derimot endres lite før i siste trimester, hvor nivået synker. I første trimester vil HCG

svakt stimulere tyroidea. Dette gjør at TSHs referanseområdet er noe lavere i denne perioden. Fosteret er avhengig av TH fra mor i første trimester, og dersom mor har HT vil barnet også få for lite TH. Flere studier har vist at disse hormonene er essensielle for utvikling av fosteret hjerne, og uten behandling kan utviklingsforstyrrelser oppstå. Det finnes tre markedsførte preparater mot HT. [15] Levaxin og Euthirox inneholder begge T4, mens Liothyronin inneholder T3. Det er ikke påvist teratogen effekt av noen av disse legemidlene i dyrestudier, når medikamentet gis i terapeutiske doser. Tyroksin og tyronin passerer i små mengder over placenta. Begge virkestoffene er ansett som egnede ved behandling av gravide. Behandlingen styres etter TSH verdier, som bør ligge innenfor normalområdet.

I de tilfellene hvor både mor og fosterets tyroidea funksjon er utilstrekkelig, vil påvirkningen på fosteret bli forsterket. [16] Haddows studie fra 1999 tok for seg barn født av kvinner med en TSH verdi over 99,7 percentilen under graviditeten. Barna, som ikke hadde konHT ved fødselen, ble testet når de var mellom syv og ni år med tanke på blant annet intelligens, oppmerksomhet, språk, leseferdigheter og motorisk funksjon. Barna av kvinnene med for høy TSH-verdi under svangerskapet, scoret dårligere på alle testene enn kontrollgruppen. Konklusjon fra studien er at udiagnostisert HT hos gravide kan påvirke fosteret.

Hypertyreose hos gravide kan også være årsak til utviklingsforstyrrelser hos fosteret. [17] Graves sykdom er den vanligste formen for hypertyreose, og er en autoimmun sykdom hvor man vanligvis finner autoantistoffer mot tyroideahormon-reseptorene (TRAS). Siden TRAS er IgG antistoffer, passerer de placenta, og kan derfor gi HT hos fosteret. Hypertyreoid gravide vil bli behandlet med tyreostatika. Disse medikamentene passerer også placenta, og vil derfor også påvirke fosterets TH. Ved ubehandlet hypertyroidisme sees økning av komplikasjoner som spontanabort, svangerskapsindusert hypertensjon, prematur fødsel, abruptio placenta, hjertesvikt, dødfødsel, lav fødselsvekt, struma, hyper- og hypotyreose.

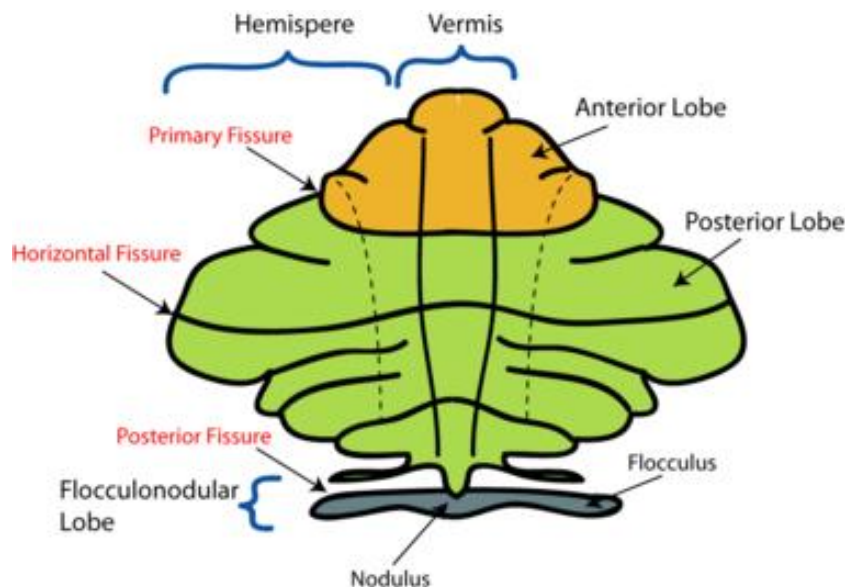
Observasjoner på dyr

Studien til Auso et.al fra 2004 var en av de første til å vise at lave tyroksinverdier, selv uten økning i TSH og klinisk HT, kan ha innvirkning på hjerneutviklingen. [18] Forskerne sammenlignet fosterutviklingen i gravide rotter fra tre eksperimentelle grupper og en kontrollgruppe. Drikkevannet til rottene i de tre gruppene inneholdt Methimazole fra svangerskapsdag 12 til 15. To av gruppene fikk deretter tilført T4. Tyroksinnivået sank til rundt 70% etter Methimazole inntaket. Alle rottene ble injisert med BrdU 20mg/kg. Avkommet ble avlivet ved dag 40 etter fødsel. Immunohistokjemi av hjernesnitt viste heterotope celler som ble identifisert som nevroner. Cytoarkitekturen og distribusjonen av BrdU merkede nevroner var signifikant endret i somatosensorisk cortex og hippocampus hos 83% av dyrene. Auso et al [18] konkluderte med at mangel på tyroideahormoner, spesielt i tiden mellom andre svangerskapsmåned og midten av svangerskapet, fører til irreversible forandringer i hjernens utvikling.

Både kliniske og dyreeksperimentelle observasjoner tyder på at tyroksinnivået i fosterlivet er viktig for at hjerneutviklingen og at for lavt tyroksinnivå kan gi varig hjerneskade. Det mangler imidlertid kunnskap om hva slags skader som oppstår og hvordan skadene kan forhindres. Vi ønsket derfor å undersøke om HT gir målbare skader i utviklingen av lillehjerne i kyllingfoster. Fordelen med dette enkle systemet er at det er mulig å kvantifisere endringer i proliferasjonsrate og apoptoserate i nervecellene i det indre korncellelaget.

Cerebellum

Embryologi



Cerebellum deriveres fra alarplaten i nevraltuben, og er en del av metencephalon. [19] Alle lillehjerneceller kommer fra et germinalt matrix, som går initialt fra istmus foran til plexus chorioideus bak. Det består av en nevroepitelial ventrikulær sone og en kaudal del, kalt den rhombencefaliske leppen. De første nevronene som forlater den ventrikulære sonen slår seg ned dypt i den cellebelare cortex. Dette skjer på embryonal dag 10-12 hos mus. Purkinjecellene dannes hos mus ved dag 11-13. Disse kommer fra den ventrikulære sonen. Dannelsen av det ytre korncellelag fra den rhombencefaliske leppen skjer omtrent når de nukleære cellene og purkinjecellene har sluttet å dele seg. Etter dannelsen av det ytre korncellelaget vil kornceller bevege seg fra det ytre til indre korncellelaget. På denne tiden dannes også stellatceller og basketceller ("kurvceller) som vandrer til det molekylære laget. Korncellenevoblaster migrerer innover langs gliaceller, såkalt Bergmann glia fra det ytre korncellelaget gjennom det molekylære laget og purkinjecellelaget til det indre korncellelaget. I denne perioden forandrer cerebellum seg fra å være en kurvet struktur til å bli en struktur med dype furer og vindinger. Det ytre korncellelag forsvinner i uke tre etter fødsel hos mus. Hos mennesket slutter denne prosessen først ved to års alder. Alle cellene i cerebellum kommer fra det ventrikulære nevroepitelet eller den romboide leppe.

Nyere forskning mener at cerebellums opphav ikke bare er i metencephalon, men også i mesencephalon. [19] Forskning har vist at det molekylære laget dannes uavhengig av det ytre korncellelaget. Det molekylære lagets internevrone har vist seg å stamme både fra metencephalon og mesencephalon.

Anatomi

Fra dorsalsiden består cerebellum av to sidedeler, hemisfærer, som er delt av et midtparti kalt vermis.[20] Foran er cerebellum forbundet med hjernestammen via tre stikker som består av hvit substans, og kalles henholdsvis nedre, midtre og øvre lillehjernerstilk. Disse sørger for at signaler fra medulla spinalis og hjernebarken når cerebellum, samt at signaler fra cerebellum når de motoriske områdene i hjernebarken. Cerebellum består av hvit substans i midten og et ytre lag, cerebellær cortex eller grå substans. Den hvite substansen består av både afferente og efferente nervefibre, mens den grå substansen består av neuronkropper og støtteceller. Midt i den hvite substansen finnes de sentrale cerebellarkjernene. Fra disse går efferente fibre til andre deler av sentralnervesystemet. Etter avsluttet utvikling av lillehjernen består cortex cerebelli av tre lag. [21] Ytterst ligger det molekylære laget. Det inneholder mest purkinjecelledendritter og aksoner fra korncellene i de dypere lagene, samt noen få nevroner. I midten ligger purkinjecellelaget med purkinjecellenes cellekropper. Innerst ligger korncellelaget, som består av små tettsittende nevroner. Under lillehjernebarken ligger det hvit substans. Aksonene fra korncellene går opp til det molekylære laget hvor de deler seg i to tversgående grener, disse kalles parallellfibre og danner synapser med purkinjecelledendritter. Purkinjecellene er de eneste efferente nevronene som sender sitt akson ut av cerebellarcortex. De inneholder GABA og virker inhibitorisk på cerebellarkjernene. Korncellene virker eksitatorisk på purkinjecellene via glutamat som neurotransmitter. Det er ingen assosiasjons- eller kommisuralfibre mellom de forskjellige delene av cerebellum.

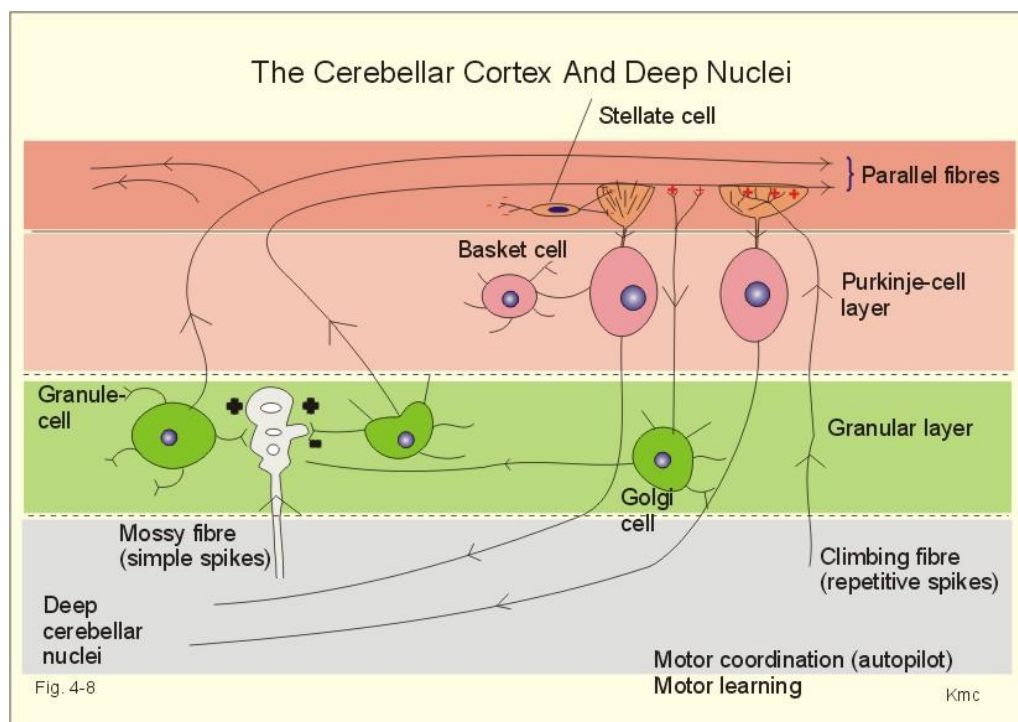
Funksjonsfordeling i cerebellum

Lobus flocculonodularis er den fylogenetisk eldste delen av cerebellum, og består av nodulus i midtlinjen og floccus på hver side.[21] Den mottar særlig fibre fra likevektsapparatet og likevektskjernene, og kalles derfor *vestibulocerebellum*. Resten av cerebellum kalles corpus cerebelli. Den omfatter vermis (unntatt nodulus) og de to lillehjernehemisfærene. Corpus deles i lobus anterior og lobus posterior av fissura prima. Hemisfærene kalt *cerebrocerebellum* får sin informasjon fra cortex cerebri via pons. Vermis og den tilgrensende intermediærsonen danner *spinocerebellum* og mottar særlig fibre fra medulla spinalis. De tre delene av cerebellum (*vestibulocerebellum*, *cerebrocerebellum*, *spinocerebellum*) sender efferente signaler tilbake til områdene de mottar fibre fra.

Signaloverføring i lillehjerne cortex

De afferente fibre til cerebellum deles inn i klatrefibre, som kommer fra olivaria inferior i medulla oblongata, og mosfibre, som inkluderer de fleste andre afferente fibre. [21] Klatrefibre "klatrer" langs purkinjecellens dendritter. Mosfibre ender i forgreninger med små oppsvulminger som i mikroskopiske snitt kan minne om mose, derav navnet. Mosfibre leder raskt, men har svak påvirkning. De ender i korncellelaget, hvor de danner synapse med korncellenes dendritter. Hver mosfiber kontakter en rekke kornceller som kontakter en rekke purkinjeceller. For at det skal dannes et aksjonspotensial i purkinjecellen må den påvirkes av mange mosfibre. Mosfibre virker eksitatorisk, antagelig med glutamat som neurotransmitter. Klatrecellene går direkte opp i det molekylære laget og danner synapse med

purkinjecellenes dendritter. De virker eksitatorisk med glutamat som neurotransmitter. Hver purkinjecelle er innervert av bare en klatrefiber. Aktivisering av denne utløser en kortvarig skur av aksjonspotensialer i purkinjecellen. Frekvensen av aksjonspotensialer i klatrefibre er lav under naturlige forhold.



Cerebellums funksjon

Cerebellum kontrollerer bevegelser i samarbeid med basalganglier og motorisk cortex. [21] Hvis den fjernes eller skades endres bevegelses mønsteret på grunn av manglende koordinasjon. Cerebellum mottar kontinuerlig signaler fra motorisk cortex, og fra periferien via sensoriske fibre, og er aktiv i å planlegge bevegelse en brøkdelen av et sekund i forveien. Dette gir smidige og nøyaktige bevegelser. På grunn av stor evne til å variere impulsfrekvens er mosfibrene egnet til å bringe presis informasjon om bevegelsers retning og hastighet, styrke, varighet, lokalisasjon av hudstimuli og motoriske kommandoer som utgår fra cortex. Flere teorier sier at klatrefibrene informerer om feil i utførelsen av en bevegelse. Noen forsøk tyder på økt impulsfrekvens i klatrefibrene ved forstyrrelse av en pågående bevegelse. Cerebellarlidelser gir særlig motoriske funksjonsforstyrrelser.

I dyreforsøk skiller man mellom tre forskjellige syndromer utifra hvilken del av cerebellum som er skadet. [21] "Det flokkunodulære syndrom", "lobusanterior-syndromet" og "det neocerebellare syndromet". Hos mennesket utgjør neocerebellum 90% av cerebellums volum, og "det neocerebellare syndrom" er ikke overraskende mest utbredt. Isolert skade av lobus flocculonodularis hos aper gir likevektsforstyrrelser og nystagmus. Hos mennesket kan lignende symptomer observeres ved enkelte tilfeller av svulster i bakre skallegrop. Nystagmus opptrer vanligvis kun ved skade av

vestibulocerebellum. Man ser ataktisk gange ved skader som særlig rammer vermis og intermediærsonen i lobus anterior. Ekstremitetsataksi er det mest fremtredende symptomet ved skader i cerebellarhemisfærene. I tillegg sees det en defekt i kontroll av kraft og særlig start og stopp av bevegelser. Bevegelsene utføres separat uten presis tidsmessig sammenheng.

Observasjoner har vist økt aktivitet i cerebellum ved utførelse av kognitive oppgaver. [21] En longitudinal studie av barn som hadde fått fjernet deler av cerebellum før 3 års alder pga svulster viste nedsatte motoriske ferdigheter, men ikke kognitive. Schmamann et al 1998 ønsket å undersøke cerebellums bidrag til funksjoner ut over det motoriske. [22] De gjorde nevrologiske, mentale, nevropsykologiske og radiologiske undersøkelser av 20 pasienter med sykdom begrenset til cerebellum. Pasienter med en mer utbredt sykdom, høy alder eller komorbiditet ble ekskludert fra studien. Hos de 20 aktuelle pasientene fokuserte de på å vurdere karakter og graden av endring i nevrologisk og mental funksjon fra en uke etter sykdomsdebut til seks år etter. Ved lesjoner i lobus posterior og vermis fant de atferdsendringer som det prominente. Dette i form av problemer med å planlegge, snakke sammenhengende, abstrakt resonnering og arbeidshukommelsen. Problemer med visuell spatiell organisering og hukommelse. Personlighetsendringer i form av disinhibisjon og upassende atferd, samt nedsatt språklig funksjon. Funksjoner som aktivering, samt oppmerksomhet var ikke påvirket. Semantisk og implisitt episodisk hukommelse var heller ikke affisert. Språklige problemer i form av apraksi, afasi og agnosi ble stort sett ikke observert. Dette komplekset av abnormale symptomer kalte de "the cerebellar cognitive affective syndrome". Særlig uttalt var symptomene ved akutt bilateral sykdom. Denne symptomsammensetningen gjør at det er naturlig å se for seg at den cerebellare moduleringen av nervebanene som knytter prefrontal cortex, posterior parietal cortex, superior temporal cortex og limbiske strukturer er rammet. Gjennomsnittlig skolegang hos de 20 aktuelle pasientene var 13,9 år, som er over gjennomsnittet. De med moderat eller alvorlig dysmetri gjennomgikk ikke testene som krevde gode motoriske ferdigheter. Nedsatte motoriske ferdigheter kan ikke forklare funn av lav verbal IQ. At både praktiske, spatielle, verbale og affektive forandringene sees skiller "the cerebellar cognitive affective syndrome" fra andre "subcortikale" tilstander, hvor alle disse symptomene sjelden foreligger samtidig. Hvor sterkt syndromet kom til uttrykk var avhengig av sykdommens utbredelse. Ved pancerebellar sykdom kom det sterkest til uttrykk. Særlig hos de hvor sykdommen hadde hatt en brå start. Ved affeksjon av vermis ble det hos 14 pasienter observert dramatiske humørsvingninger og svimmelhet. Dette ble ikke observert hos pasientene med lesjoner som ikke involverte vermis. Lesjoner i lobus anterior ble kun sett å gi mindre endringer i utøvende og visuelt spatielle funksjoner. Alt i alt er det nok ennå for tidlig å trekke sikre konklusjoner om hva cerebellum betyr for kognitive funksjoner.

Tyroksins virkning på cerebellum og andre deler av sentralnervesystemet

Det var lenge et rådene syn at det sirkulerende nivå av TH i fosteret var lavt, og at placenta dannet en effektiv barriere mot overførsel mellom mor og foster. [23] Man konkluderte derfor med at TH ikke var nødvendig for fosterets utvikling. I nyere tid er dette bildet noe forandret. Før uke 14 er fosteret avhengig av tyroksin fra mor. Fosteret begynner egenproduksjon av TH i svangerskapsuke 14-20, men hormoner fra mor passerer placenta i hele svangerskapet. Tyroideahormonene ser ikke ut til å virke inn på de store tidlige utviklingsprosessene som dannelse av nevralkrøret og etablering av polaritet i fosteret, men regulerer derimot senere prosesser som nevronogenese, migrasjon av nevroner, myelinisering og synapsedannelse. Flere studier har funnet effekt av TH på migrasjon av kornceller i hippocampus og cerebellum, utvikling av pyramidecellene i cerebellum og stimulerer videre gliogenese og myelinisering.

Perinatal T3 mangel gir betydelig reduksjon i vekst og forgrening av purkinjecellenes dendrittdannelse. [24] Den molekylære mekanismen for dette er dårlig forstått. Heuer et.al studerte effekten av T3 ved hjelp av cellekulturer fra musecerebellum. Kulturene inneholdt kornceller, purkinjeceller, internevroner og astroglia. Visse kulturer ble tilsatt T3 i forskjellige konsentrasjoner. Etter 14 dager ble kulturene fiksert, og immunfarget med et anti-Calbindin antistoff for å få frem purkinjecellene. Tilsetning av T3 til kulturene førte til en stor økning i purkinjecelledendritters forgreningen i et dose- og tidsavhengig forhold. De viste at T3 virker på purkinjecellene direkte gjennom aktivering av TR α 1 uttrykt på purkinjecellene. Dette indikerer at T3 virker inn på purkinjecelledifferensieringen gjennom aktivering av TR α 1. I hypotyreoide rotter finner man unormal organisering av purkinjecellens dendrittrær og færre dendritter. De parallelle korncellefibrene er færre og har mindre kontakt med purkinjecellene. Tidligere studier har antydnet at kornceller er regulatorer av purkinjecellenes utvikling. Heuer's studie tyder på at T3 virker inn på purkinjecellene direkte gjennom TR α 1.

Carrasco et.al [24] fant at HT gir forsinket forsvinning av ytre korncellelag, forsinket migrering av kornceller samt feil i utviklingen av prallel fibre. Dette gir igjen økt celledød av korncellene på grunn av manglende utvikling av forbindelsespunkter mellom korncellene og purkinjecellene. De påviste redusert uttrykk av EGF-reseptor i cerebellum hos hypotyreote mus og mener at dette også kan være en direkte årsak til økt celledød ved HT. [25][25][24][24]

TH og lillehjerne av kyllingembryo

I kylling begynner cerebellums utvikling tidlig og prosessen går raskt. [26] Purkinjecelleforgreningen og korncelle migrasjonen er nesten ferdig innen egget klekkes. I Darras et al sin studie av kyllingembryoer finner man T3 og T4 i hjernen allerede fra dag 4 i embryonalutviklingen. Direkte morforlogiske bevis for at tyroideahormoner er nødvendige i første halvdel av utviklingen i egg finnes ikke så langt, men mikromatriseanalyse av telecephalon viser klart divergerende genuttrykk i hypotyreoide embryo. Genekspresjonen i hjernevev fra eutyreoide embryoer ble sammenlignet med hjernevev fra hypotyreoide embryoer klekket av høner som var behandlet med Methimazole (disse hadde

25-30% av normalt TH nivå). RNA fra telencefalon ble analysert på dag 4 og 8. Ved begge anledninger ble det påvist store forskjeller i hvilke gener som ble uttrykt. Jodothyronindejodaser er viktige i TH metabolismen. De aktiverer T4 til T3. I tillegg inaktiverer de irreversibelt T4 og T3. Slike dejodaser har blitt påvist hos kylling (D1-3). D2 er den viktigste T3 dannende, D3 den viktigste T3 inaktiverende. De har strukturell og funksjonell likhet med dem vi finner hos pattedyr. Under utviklingen av kyllinghjernen finner man dejodasene i cerebellum fordelt slik: D1 i kornceller, D2 i Bergman gliaceller og purkinjeceller, D3 i kornceller og purkinjeceller. Studien viser at Methimazole induisert hypothyreodisme ved inkubasjonens siste dager gir nedsatt aktivitet av D3, noe som viser at dejodasene responderer på endret TH status på en kompensere måte. Et annet funn forskerne presenterer er at migrasjonen av kornceller fra ytre til indre korncellelag hos hypothyreote individer blir forsinket. Dette er også bekreftet gjennom andre studier. Blant annet studien utført på rotter av Carrasco et al. [25] De finner at forsinkelsen skyldes forlenget proliferasjonsfase.

Eksperimentell del

Innledning

Kyllingmodellen

Historisk sett var Aristoteles en av de første som studerte kyllingembryoer. [27] Han åpnet kyllingegg på forskjellige utviklingstrinn, og sammenlignet utviklingen. Frem mot 1900-tallet ble embryoene i hovedsak studert ved observasjon, men nå begynte man å eksperimentere med embryoene. På grunn av den intense forskningen kjenner man de intracellulære reguleringsmekanismene for organutvikling hos kylling godt. [28] Dette gjør at kyllingene enkelt kan manipuleres. Det er vist at kyllingens tyroideakjertel produserer TH allerede på dag 10 under inkuberingen, og hjernen er ved klekking nesten ferdig utviklet. [26] T4 nivået i plasma, er høyere enn T3 nivået, og øker gradvis mellom inkubasjonens dag 15 og 20. I hjernen derimot finnes det mer T3 enn T4.

I vår studie ønsket vi å hemme produksjonen av TH, dette er mulig på grunn av embryoets egen TH produksjon. Kyllingembryoer er enkle å arbeide med, og kravene til utstyr er lave. Dette gjør eksperimentene relativt billige. Dessuten kan kyllingembryoenes sammenlignes med humane foster, hvor siste ruge-uke tilsvarer siste del av andre og tredje trimester.

Kyllingembryologi

I kylling skjer de tidligste stadiene av utviklingen mens egget fremdeles er i moren. [29] Embryoet er dekket av en membran som skiller det og plommesekken fra eggehviten. Kyllingembryoet er foreløpig flatt og sirkulært og består av to ringer med celler. All embryonal masse er derivert fra et epitelcellelag, epiblasten. Epiblasten vil etter 6-8 timer differensieres til tre lag: ektoderm, mesoderm og endoderm. I løpet av gastruleringen vandrer de forskjellige celletypene til sine rettmessige plasser. Dette er en prosess som krever stor grad av koordinert cellebevegelse. I løpet av denne prosessen går de cellene som tilhører mesoderm og endoderm inn i embryoet og danner det som kalles primitive streak. Primitive streak danner kroppens akse som definerer hvor de forskjellige organene skal befinne seg. Et av de første organsystemene som dannes er det vaskulære systemet. Hjertet begynner å slå etter 42 timer, og man kan se blodsirkulasjon ca. 2 dager etter befruktning. Sentralnervesystemet deriveres fra neuraltuben som er av ektodermal opprinnelse etter 21 timer. Embryoet vokser kontinuerlig, hovedregionene begynner å bli synlige etter 22 timer for eksempel hode, overkropp og hale. Etter fire-fem dager kan man se ekstremiteter, øyer, lunger etc. Fra dag ti og frem til kyllingen klekkes skjer det hovedsaklig vekst. Det skjer samtidig en differensiering av celler og vev, ben ossifiserer og de endelige fjærene dannes.

Cerebellum hos pattedyr

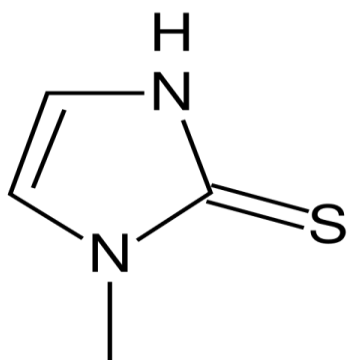
Innenfor pattedyrene finner man store forskjeller i cerebellums form og størrelse. [30] Larsel (1970) finner at man kan dele alle pattedyrs cerebellum inn i ti lobuli. Den primære, sekundære, prepyromidale og den posteriolaterale fissur kan identifiseres gjennom artene. Antigenet zebrin II er assosiert med

den hjernespesifikke aldolase C. Den brukes mye i komparative studier av cerebellum. I pattedyr danner purkinjeceller som uttrykker zebrin II en rekke av parasagittale striper. Man finner zebrin II også i fisk. Sillitoe et.al. studerte konserveringen av cerebellums anteriore vermismråde i en rekke pattedyr og ikke-pattedyr. Resultatet viser at uavhengig av størrelse finner man hos pattedyr karakteristiske striper i vermismrådet. Zebrin II er godt konservert gjennom vertebratene.

Utgangspunkt for den eksperimentelle studien

Vi ønsket å teste hypotesen at lavt nivå av TH under fosterutviklingen gir økt apoptoserate og nedsatt mitoserate i cerebellums indre korncellelag. Vi vil hemme TH produksjon med Methimazole, et tyreostatikum.

Methimazole:



Methimazole tilhører en gruppe legemidler som kalles thioamider [31] Methimazole har en thiocarbamid-gruppe (S-C-N) som er essensiell for deres antityroide aktivitet. Virkningsmekanismen er ikke fullt ut kjent, men Methimazole hemmer bindingen av jod til tyrosin i tyroglobulinene. Man tror at den tyroperoksidase-katalyserende oksideringsaktiviteten reduseres fordi Methimazole virker som et substrat for peroxidase-jod komplekset slik at interaksjonen med tyrosin hindres. Methimazole fordeles i alle kroppens væskefaser med en halveringstid på 6-15 timer. Methimazole passerer placenta og går over i morsmelk. Thioamidene vil etter nedbrytningen skilles ut via urinen.

Metode

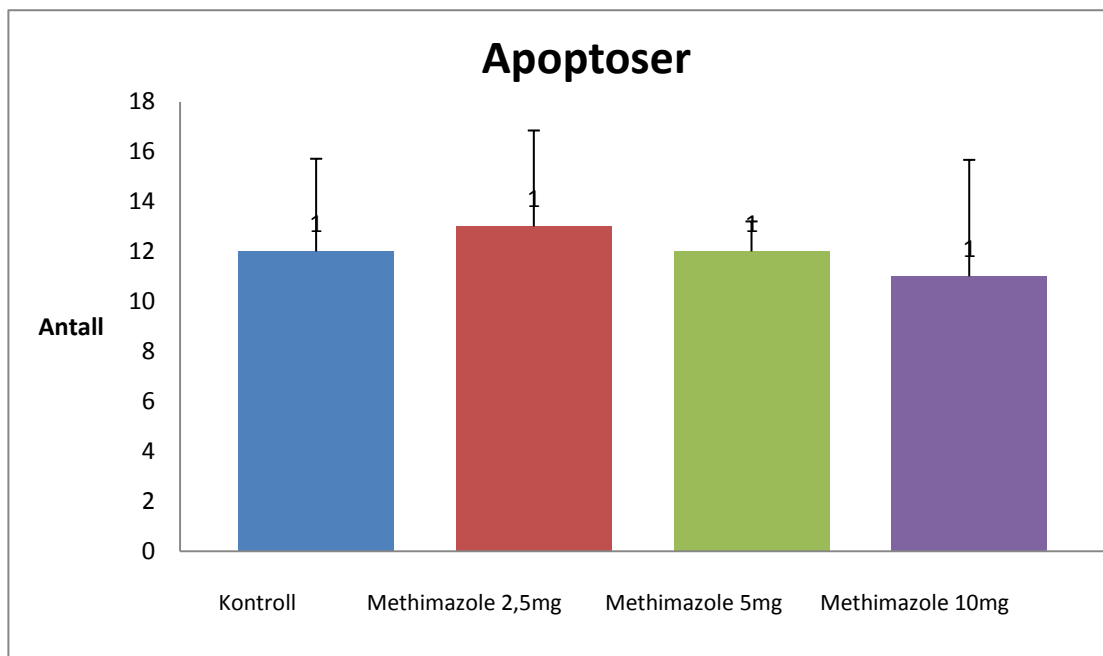
50-60g kylling egg av typen Gallus gallus ble kjøpt inn fra Samvirkekylling i Våler, Norge. Eggene ble innkubert i en rugemaskin ved 37°C (Covattuttu 20+20, Novital) i 16 dager. På dag 16 ble det injisert Methimazole i tre forskjellige konsentrasjoner inn i amnionhulen via et 1 mm stort hull i skallet. Totalt ni egg ble injisert med Methimazole og saltvann, til sammen 250µL. Tre av eggene ble injisert med 2,5mg/kg, tre med 5mg/kg og tre med 10mg/kg, samt tre egg med kun 250µL saltvann. Blodårene ble unngått ved å gjennomlyse eggene før injiseringen. Eggene ble så innkubert videre i 24 timer, slik at Methimazolen ville få tid til å nå kyllingembryoene. Tre timer før avlivningen ble det injisert 0,080mgBrdU/1g egg og saltvann, til sammen 250µL, i alle tolv eggene. BrdU inkorporeres i DNA i de cellene som befinner seg i syntesefase av cellyklus. BrdU kan derfor brukes som en proliferasjonsmarkør. Embryoene ble deretter gitt anestesi og avlivet ved å klippe av hodet. Hodene ble fiksert ved å legge de i 4% paraformaldehyd i fosfatbufferløsning i 24 timer. Hjernen ble deretter tatt ut og fiksert i samme løsning i ytterlig 24 timer.

Det ble lagd coronarsnitt av cerebellum med omliggende vev, som ble farget med hematoxylin/eosin(HE) og BrdU-antistoff. Hematoxylin-komponenten farger cellekjernene blå/sort, og fremhever de intranucleære detaljene, mens eosin-komponenten farger cytoplasma og mesteparten av bindevevet rosa. BrdU er en uridin derivat som kan inkorporeres i DNA istedenfor tymidin. BrdU visualiseres ved hjelp av IgG antistoff rettet mot BrdU. Formalinfiksert parafininnstøpt preparater ble deparafinisert, rehydrert og demaskert i Target Retrieval Solution (TRS), pH 6-6,20, i mikrobølgeovn i 24 minutter. Monoklonalt anti-BrdU titer 1:100 ble brukt som primærantistoff. For å hindre uønsket bakgrunnsfarging ble endogen peroksidase aktivitet blokkert ved hjelp av hydrogenperoksid før tilsetning av primærantistoffet. Antigen-antistoff reaksjonen ble visualisert ved hjelp av DakoCytomation EnVision+ System-HRP med 3,3'-diamino-benzidin som kromogen. Snittene ble også farget med hematoxylin.

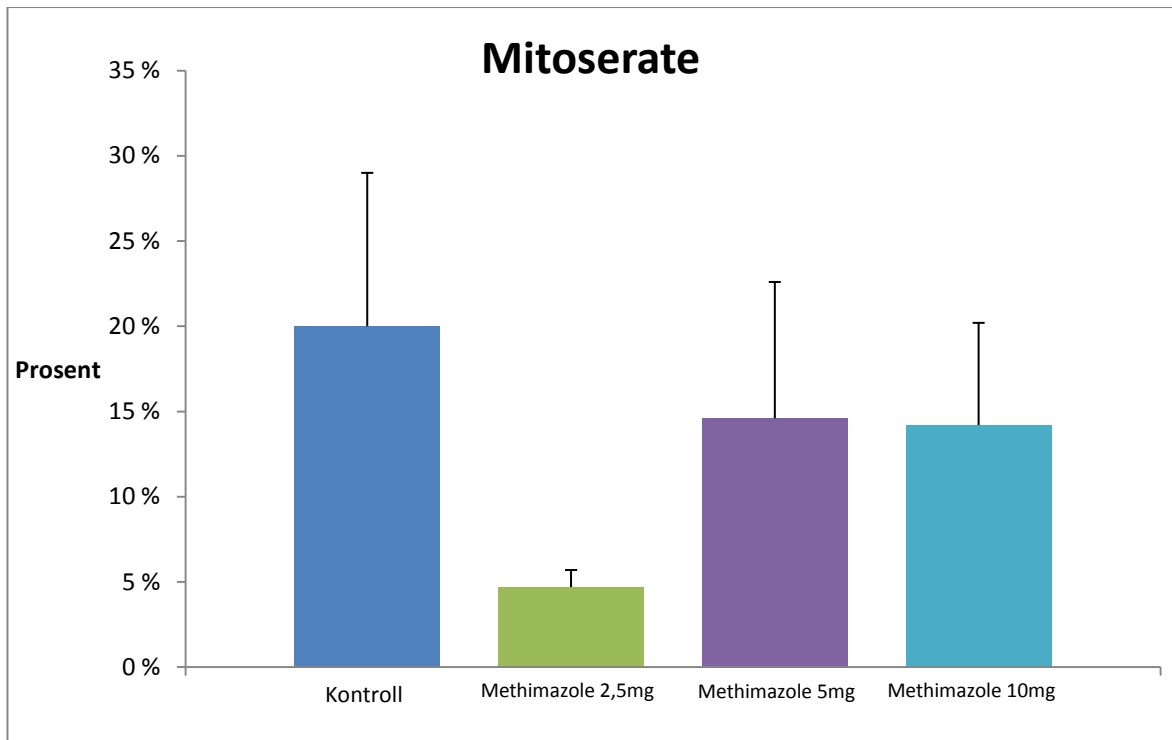
Det ble tatt tre bilder av hvert BrdU-snitt på 40x forstørrelse, og proliferasjon ble telt ved hjelp av dataprogrammet ImageJ. Et utsnitt fra hvert bilde ble analysert for totalt antall celler og antall brune celler. HE-snittene ble brukt for å telle apoptoser. I hvert snitt ble det telt apoptoser i 10 synsfelt ved 40x forstørrelse i lysmikroskop, og det ble utifra tellingene laget et gjennomsnitt for hvert snitt. Apoptotiske celler ble identifisert på bakgrunn av kondenserte og fragmenterte cellekjerner, samt eosinofilt cytoplasma.

Resultat

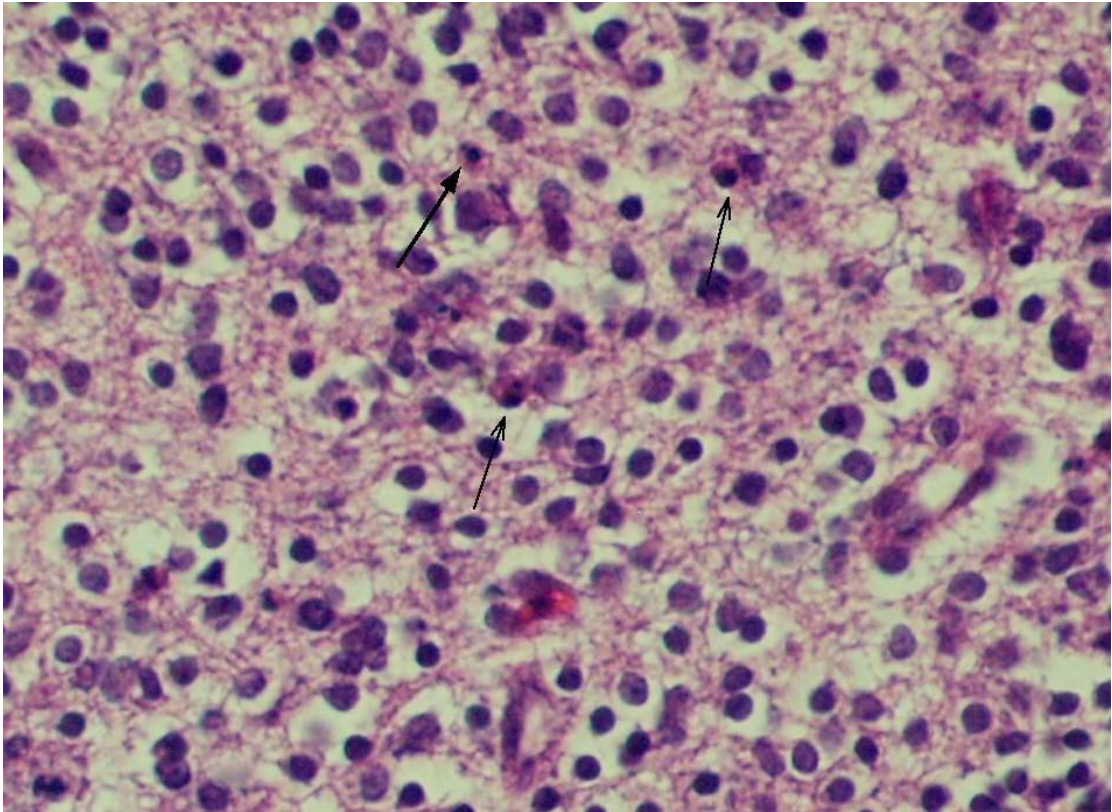
Methimazole behandling fører ikke til økt antall apoptotiske celler i eggene i forhold til kontrollene. Det sees dog en tendens til redusert mitoserate.



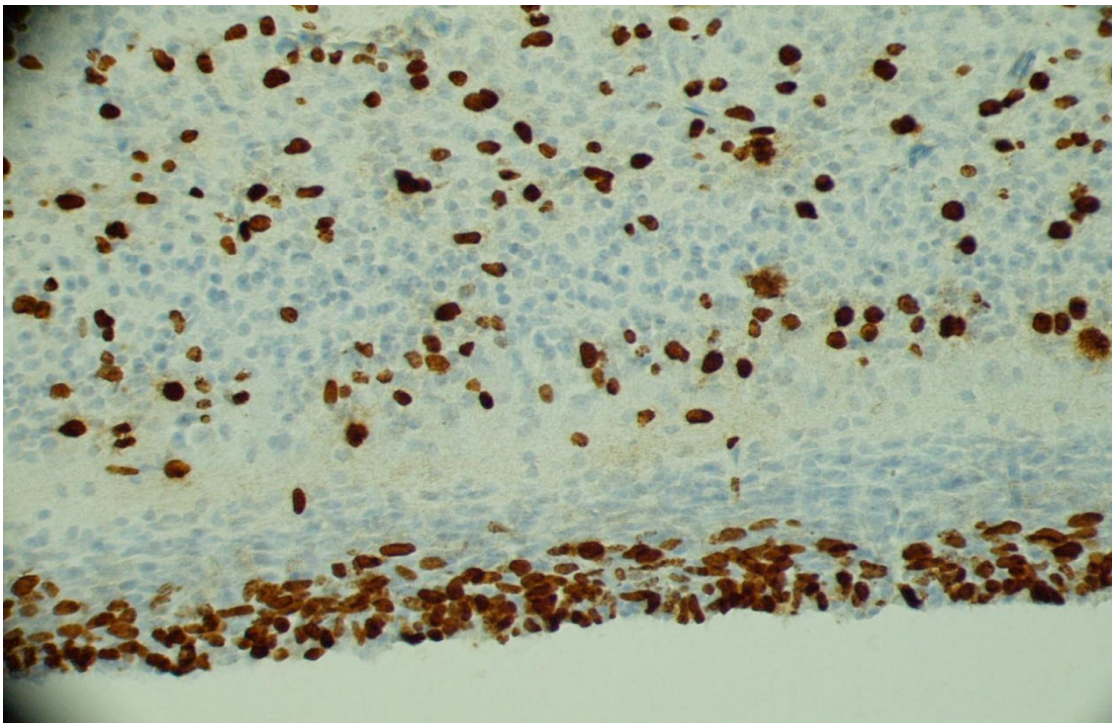
	Gjennomsnittlig antall apoptoser:	Antall egg	SD	SE
Kontroll	12	n=3	6,43	3,71
Methimazole 2,5mg	13	n=3	6,66	3,84
Methimazole 5mg	12	n=3	2,08	1,20
Methimazole 10mg	11	n=3	8,08	4,67



	Mitoserate	Antall egg	SD	SE
Kontroll	20,0%	n=2	0,13	0,09
Methimazole 2,5mg	4,7%	n=2	0,01	0,01
Methimazole 5mg	14,6%	n=2	0,11	0,08
Methimazole 10mg	14,2%	n=2	0,09	0,06



HE-farging av indre korncellelag i cerebellum fra kylling. Pilene viser apoptotiske celler



BrdU-farging. Prolifererende celler blir brune, mens de resterende cellene blir lyseblå

Diskusjon

Vår studie er en pilotstudie der hensikten er å undersøke om det er endringer i apoptoserate og proliferasjonsrate i cerebellums indre korncellelag ved for lavt nivå av TH.

Vi har valgt å bruke kyllingembryo som modellsystem. Dette systemet har mange fortrinn [27]: i) Kyllingembryo manipuleres lett inne i egg. ii) For eggruging finnes det ikke lovpålagt krav til dyrestall. iii) Organutviklingen skjer raskt, med en rugetid på 20-21 dager. iv) Den siste ukens cerebellare utvikling tilsvarer i sin histologisk utforming den siste delen av andre trimester og begynnelsen av tredje trimester hos mennesket.

Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller i antall apoptoser i vår pilotstudie. Dette tyder på at TH ikke virker inn på apoptoseraten og står i motsetning til funn av Xiao et al. [32] som fant i sin undersøkelse av HT hadde effekt på apoptoserate i cerebellums indre korncellelag hos rotte . Antall apoptoser var maksimalt i samme tidsrom hos både eutyreote og hypotyreote rotter, men de hypotyreote rottene hadde en fire ganger høyere apoptoserate [32].

Det ble funnet en tendens til redusert mitoserate ved bruk av Methimazole, men vi fant ingen sikker doseavhengig reduksjon i mitoseraten og det var størst reduksjon i mitoseraten ved den laveste dose Methimazole. Forsøkene med forskjellige doser av Methimazole ble dog bare gjennomført en gang og har lav statistisk styrke. For å kunne komme til en endelig konklusjon, bør derfor forsøket gjentas i større skala og i flere uavhengige eksperimenter. Det er også mulig at feil konsentrasjonsområde for Methimazole ble valgt. Dette må i tilfelle justeres i framtidige forsøk. Det ble heller ikke undersøkt om embryoene faktisk hadde fått induert hypotyreose så raskt at det har betydning i løpet av den 24 timer lange perioden etter Methimazole injeksjonen i egget. Dette bør undersøkes med en blodprøve ved en eventuell senere studie.

Vår hypotese var at hypotyreose i fosterlivet gir økt apoptose og redusert proliferasjon i cerebellums indre korncellelag. En dose-respons sammenheng ble forventet, men ikke observert. Det er ønskelig å gjøre flere eksperimenter for å forsøke og styrke eller svekke hypotesen.

Referanser

1. Olav Sand, Ø.V.S., Egil Haug, *Menneskets fysiologi, Kap. 5* 2001.
2. Sadler, T.W., *Langmans embryologi*. 2006.
3. Hall, G., *Textbook of Medical Physiology, Kap. 76*. 2006.
4. . *Store norske leksikon*. . Available from:
<<http://www.snl.no/hydrogenperoksid>>.
5. Setian, N.S., *Hypothyroidism in children: diagnosis and treatment*. J Pediatr (Rio J), 2007. 83(5 Suppl): p. S209-16.
6. Parveen Kumar, M.C., *Clinical Medicine Sixth edition, Kap. 18*. 2005.
7. universitetsklinikk, R. *Medfødt hypotyreose*. Available from:
<<http://avd.rikshospitalet.no/nyfscreen/default.asp?pageID=101>>
8. Roberts, C.G. and P.W. Ladenson, *Hypothyroidism*. Lancet, 2004. 363(9411): p. 793-803.
9. universitetsklinikk, R. *Asbjørn Følling*. 2004; Available from:
<http://avd.rikshospitalet.no/nyfscreen/default.asp?pageID=115>
10. universitetsklinikk, R. 2004; Available from:
<http://avd.rikshospitalet.no/nyfscreen/default.asp?pageID=111>
11. Oerbeck, B., et al., *Congenital hypothyroidism: influence of disease severity and L-thyroxine treatment on intellectual, motor, and school-associated outcomes in young adults*. Pediatrics, 2003. 112(4): p. 923-30.
12. Fuggle, P.W., et al., *Intelligence, motor skills and behaviour at 5 years in early-treated congenital hypothyroidism*. Eur J Pediatr, 1991. 150(8): p. 570-4.
13. Kempers, M.J., et al., *Intellectual and motor development of young adults with congenital hypothyroidism diagnosed by neonatal screening*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. 91(2): p. 418-24.
14. *Hypothyroidism in the pregnant woman*. Drug Ther Bull, 2006. 44(7): p. 53-6.
15. *Felleskatalogen 2009*. 2009.
16. Haddow, J.E., et al., *Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child*. N Engl J Med, 1999. 341(8): p. 549-55.
17. Inoue, M., et al., *Hyperthyroidism during pregnancy*. Can Fam Physician, 2009. 55(7): p. 701-3.
18. Auso, E., et al., *A moderate and transient deficiency of maternal thyroid function at the beginning of fetal neocortico-genesis alters neuronal migration*. Endocrinology, 2004. 145(9): p. 4037-47.
19. Goldowitz, D. and K. Hamre, *The cells and molecules that make a cerebellum*. Trends Neurosci, 1998. 21(9): p. 375-82.
20. Brodal, P., ed. *Sentralnervesystemet, Kap. 3*. 4 ed. 2007, Universitetsforlaget.
21. Brodal, P., *Sentralnervesystemet, Kap. 14*. 2007.
22. Schmahmann, J.D. and J.C. Sherman, *The cerebellar cognitive affective syndrome*. Brain, 1998. 121 (Pt 4): p. 561-79.

23. Williams, G.R., *Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone*. J Neuroendocrinol, 2008. 20(6): p. 784-94.
24. Heuer, H. and C.A. Mason, *Thyroid hormone induces cerebellar Purkinje cell dendritic development via the thyroid hormone receptor alpha1*. J Neurosci, 2003. 23(33): p. 10604-12.
25. Carrasco, E., et al., *Epidermal growth factor receptor expression is related to post-mitotic events in cerebellar development: regulation by thyroid hormone*. Brain Res Dev Brain Res, 2003. 140(1): p. 1-13.
26. Darras, V.M., et al., *Involvement of thyroid hormones in chicken embryonic brain development*. Gen Comp Endocrinol, 2009. 163(1-2): p. 58-62.
27. Wolpert, L., *Much more from the chicken's egg than breakfast--a wonderful model system*. Mech Dev, 2004. 121(9): p. 1015-7.
28. Coleman, C.M., *Chicken embryo as a model for regenerative medicine*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2008. 84(3): p. 245-56.
29. Davey, M.G. and C. Tickle, *The chicken as a model for embryonic development*. Cytogenet Genome Res, 2007. 117(1-4): p. 231-9.
30. Sillitoe, R.V., et al., *Conservation of the architecture of the anterior lobe vermis of the cerebellum across mammalian species*. Prog Brain Res, 2005. 148: p. 283-97.
31. H. P. Rang, M.M.D., J. M. Ritter, R. J Flower, *Rang and Dale's Pharmacology*. 2007: Churchill Livingstone Elsevier.
32. Xiao, Q. and V.M. Nikodem, *Apoptosis in the developing cerebellum of the thyroid hormone deficient rat*. Front Biosci, 1998. 3: p. A52-7.