

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**Deneyssel hipotiroidizm ile gelişen sinaptik plastisite ve davranış bozukluğunun
selenyumun verilen sıçanlarda incelenmesi**
Proje No:TDA-2015-5787

Proje Türü
Dış Kaynaklı Projeler İçin Acil İhtiyaç Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Prof.Dr.Nurcan Dursun
Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

Araştırmacı
Prof.Dr.Narin Liman

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından (TDA-2015-5787) ve Tübitak (3001 projesi, 114S015) tarafından
desteklenmiştir**

Ekim, 2015
KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.....	4
ABSTRACT.....	5
1. GİRİŞ/AMAÇ VE KAPSAM.....	6
2. GENEL BİLGİLER.....	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
4. BULGULAR.....	21
5. TARTIŞMA.....	32
6. KAYNAKLAR.....	35

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, sodyum selenitin, öğrenme ve hafızanın hücresel temeli olduğu düşünülen uzun vadeli potansiyasyon (LTP) üzerine hipotiroidi etkilerine karşı koruma sağlayıp sağlamadığını değerlendirmektir. Hipotiroidizm, tek başına veya selenyum tedavisi (Se, 10 ppm) ile kombinasyon halinde genç yetişkin sıçanlara 21 gün boyunca musluk suyu içinde 6-n-propil-2-tiourasil (PTU) konularak gerçekleştirilmiştir. Se tedavisi, hipotiroidili sıçanlarda serum serbest T3 düzeylerinde ve hipokampus Se düzeylerinde önemli bir artışa neden olmuştur. Grup ve zaman arasındaki etkileşim önemli bulunurken, tetanik stimülasyon süresince bu etkileşim anlamlı bulunmamıştır.

Sitimülasyonu takiben izlenen 45 dk boyunca baseline üzerindeki PS amplitüdü kontrol grubunda 307 ± 11 potansiyelize olurken, PTU grubunda ve PTU+Se grubunda kontrol grubuna göre sırasıyla 182 ± 11 , 247 ± 15 potansiyelizasyon gerçekleşmiştir. EPSP eğimi kontrol grubunda 142 ± 7 iken PTU grubunda ve PTU+Se grubunda kontrol grubuna göre sırasıyla 120 ± 10 125 ± 3 potansiyelizasyon gerçekleşmiştir.

Bu sonuçlar Se tedavisinin LTP indüklenmesi sonrasında hipotiroidi ile indüklenen bozuklukları düzeltebileceğini göstermiştir. LTP deki bozulma genç erişkin ve erişkin hipotiroidililerde meydana gelen hafıza problemlerinin altında yatan sebep olabilir ve Se tedavisi bu bozuklukları T3/T4 dönüşümü aktive ederek ve/veya antioksidan sistemleri aktive ederek azaltabileceği görüşündeyiz.

Anahtar Kelimeler: Selenyum, Hipotiroidizm, Uzun süreli güçlendirme, Hipokampus

ABSTRACT

The goal of this study was to evaluate whether sodium selenite could afford protection against the effects of hypothyroidism on long-term potentiation (LTP), which is thought to be the cellular basis for learning and memory. Hypothyroidism alone or in combination with Selenium treatment (Se, 10 ppM) was induced in young-adult rats by administration of 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) in tap water for 21 days. Se administration caused a significant increase in serum free T3 levels and in hippocampus Se levels in hypothyroid rats. Significant Group x Time interaction was found after, but not during tetanic stimulation.

45 min following the stimulation, the PS amplitude over baseline was potentiated by $307\pm11\%$ in control group compared with $182\pm11\%$ in PTU group and $247\pm15\%$ in PTU+Se group, while EPSP slope was potentiated by $142\pm7\%$ in control group compared with $120\pm10\%$ in PTU group and $125\pm3\%$ in PTU+Se group.

These results show that Se treatment is able to restore hypothyroidism-induced impairment after induction of LTP. We concluded that impaired LTP can be underlie memory problems experienced by adolescents with adult hypothyroidism and that Se treatment can reduce this impairment by activating conversion of T4 to T3 and/or antioxidant system.

Key words: Selenium; Hypothyroidism; Long-term Potentiation; Hippocampus.

1. GİRİŞ/AMAÇ VE KAPSAM

Bu projede selenyum (Se) takviyesinin, deneysel erişkin tip hipotiroidi modelinde oluşan bozulmuş hipokampal işleve etkisini ve olası iyileştirici etki mekanizmasının deiodinaz enzim sistemi üzerinden olup olmadığını araştırmak amaçlanmıştır.

Yetişkin dönemde ortaya çıkan hormonal dengesizliklerin beyindeki hipokampüsün fonksiyonlarını etkilediği ve öğrenme/bellek bozukluklarına neden olduğu bilinmektedir. Bunlar arasında tiroid hormon yetmezliği ile karakterize hipotiroidizm önemli bir yer tutar. Hayvan modellerinde tiroid dokusunun tamamen çıkartılması ile veya T4' hormonun aktif hali olan T3 hormonuna dönüşünün 6-*n*-propyl thiouracil (PTU) verilerek inhibe edilmesi ile deneysel hipotiroidi geliştirilebilir. Yenidoğan ve çocukluk döneminde oluşan tiroid hormon eksikliğinin beyin gelişimi üzerine olan ciddi olumsuz etkileri yanında, yetişkin dönemde tiroid hormonlarının az ya da çok salgılanmasının özellikle hipokampal nörogenezi ve hipokampal işlevleri olumsuz etkileyebileceği de bilinmektedir.

Önceki çalışma bulgularımız yetişkin tip hipotiroidi oluşturulmuş sıçanlarda hipokampal öğrenme bozukluğunun NMDA reseptörlerinin anlatımındaki bozulmayla birlikte olduğunu göstermektedir. Bu projede hipotiroidi ile oluşturulan hipokampal fonksiyon bozukluğunun selenyum yüklemesinden nasıl etkileneceği araştırılmıştır. Se antioksidan etkisi ve T4'ün T3'e doku seviyesinde dönüşümünü sağlayan deiodinaz enzimlerinin yapısında bulunması nedeni ile pek çok dokunun yanı sıra beyinin fonksiyonları bakımından da önemlidir. Beyin dokusu Se seviyesini çok iyi kontrol edebilen düzenleyici mekanizmalara sahiptir. Bu mekanizmalar, başka dokularda Se seviyesi azalsa bile beyin Se seviyesini sabit tutar. Buna rağmen beyin Se düzeyindeki azalmanın gelişim sırasında beyin defektlerine ve çeşitli beyin hastalıklarına neden olduğu ve ayrıca Se'un hipokampal nöronların büyüme ve gelişiminde çok önemli bir rol oynadığı da bildirilmektedir. Bu nedenle deneysel hipotiroidinin Se yüklemesi ile birlikte olması durumunda oluşacak olan hipokampal bozukluğu azaltması beklenilir

Laboratuvarımızda yapılan ön çalışmalarda, yeme eklenen Se'un, hipotiroidi oluşturulmuş sıçanlarda, Morris su tankı testi kullanılarak yapılan uzamsal işin öğrenilmesindeki bozulmayı azalttığına dair bulgular elde edilmiştir. Bu durum, hipotiroidili sıçanlara Se yüklenmesi halinde T4'ün T3' dönüşümünün, eklenmemesi haline göre daha fazla olması ve/veya Se'un antioksidan savunmayı kuvvetlendirmesine bağlı olabilir.

Selenyumun tiroide özgün otoimmün hastalıklarda görülen inflamatuvar aktivitenin baskılanmasındaki yararı çalışılmış olsa da, proje çalışmasının **özgün yönü**, hipotiroidiye bağlı

öğrenme/bellek bozukluklarında Se ilavesinin hipokampus fonksiyonlarının korunması/tedavisindeki olası etkinliğinin ilk kez çalışılmış olmasıdır.

Bu proje çalışmasında kurgulanan deney planı ile deiodinaz enzim sistemi üzerinden olan etki dikkate alınmıştır. Çalışma, yemlerine 0 ppm, 5 ppm, 10 ppm ve 20 ppm Se eklenmiş 4 hipotiroidili ve pozitif kontrol grubu olmak üzere oluşturan 8 grup erkek sıçanda (n=280, her bir grup n=35) yapılmıştır. Tüm sıçanların hipokampus bağımlı öğrenme performansları Morris Su Tankı; sinaptik plastisite gücü hipokampal formasyonun dentat girusundan kayıt edilen uzun dönemli güçlenme (UDG) yanıtlarının analizi ile; hipokampus dokularında deiodinaz ekspresyonu ise western blot analizi ile belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Merkezi sinir sisteminin yüksek seviyeli işlevlerinden olan bellek, deneyimlerin sonucunda organizmanın geliştirdiği / değiştirdiği davranışın (öğrenme) bir süre için (anlık, kısa veya

uzun erimli) daha kolayca ve daha mükemmel bir şekilde tekrarlanabilmesi ve davranış üzerindeki stabil bir değişimin kazanımı olarak tanımlanabilir. Bellek bu bilginin kodlandığı, depolandığı ve geri çağrıldığı bir süreçtir. Hipokampus ve ilişkili yapıların, insanda deklaratif bellekle ilişkili olduğu düşünülür (Morgado, 2005). Deklaratif bellek bilginin sırasıyla neokortikal assosiyatif alanlardan, parahipokampal korteks, entorinal kortekse, dentat girus, kornu ammonis [CA1, CA2, CA3 ve CA4 (Hilus)]'den tekrar geriye subikulum, entorinal korteks, parahipokampal alana ve sonrasında assosiyatif alana ulaşan bağlantılar ile işler (Rudy, 2009). Bu yolağın sinapsları yüksek bir sinaptik plastisite gücü gösterirler; yani sinyal yolağından geçen uyarının frekansı var olan sinapsların güçlenmesine veya kaybolmasına ya da yeni sinaptik bağlantıların oluşmasına neden olur.

İlk olarak, Bliss ve Lomo, entorinal korteksten dentat girusa gelen perforan yolu bir elektrot vasıtasıyla, yüksek frekanslı uyarı (HFS) ile uyardılar ve eksitator postsinaptik potansiyellerin (EPSP) granül hücre tabakasında artış gösterdiğini buldular (Bliss and Lomo, 1973). Hebbian sinapsların elektriksel gösterimi olan ve hipokampus kesitlerinde saatlerce kalabilen (Alger and Teyler, 1976; Andersen, 1977) bu güçlenmeye Uzun Dönemli güçlenme (UDG) adı verilmiştir. UDG potansiyeli bir sinaptik bağlantının plastisite gösterme yeteneğinin bir ölçüsü olarak yaygın şekilde kullanılır. Sıçanlarda hipokampus uzamsal öğrenme için kilit önemdedir ve hipokampal lezyonlar hem uzamsal öğrenme testlerini hem de UDG yanıtlarını bozar.

UDG, hipokampus dahil beyinde yaygın olarak bulunan bütün glutamaterjik sinapsların gösterdiği bir özellik olup, öğrenme ve belleği açıklayabilen bir hücresel model olarak düşünülür. Glutamaterjik sistem, özellikle neokorteks ve hipokampusun nöronal ağlarında bilgi işleme için çok önemli olan hızlı bir sinyalleşme sistemidir. Glutamaterjik sinapslarda eksitator postsinaptik potansiyelleri oluşturan iki bileşen vardır: Bunlar (S)-a-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropionik asit (AMPA) ve N-metil-D aspartat (NMDA) reseptör aracılı bileşenleridir. Glutamat'ın AMPA reseptörüne bağlanması, sodyumun hücre içine ve potasyumun hücre dışına akışına neden olarak membranı depolarize eder. Membranın depolarize olması, iyon akışını engelleyen Mg^{2+} iyonunu oradan ayırır ve glutamatın NMDA reseptör kanalına bağlanması hücre içine Ca^{2+} girişine neden olur. Glutamat, aynı zamanda metabotropik reseptörleri ve fosfolipaz C (PLC)'yi de aktive eder. UDG'nin geç fazında ise, hücre içinde yükselen Ca iyon seviyesi, Protein Kinaz C (PKC), kalmodulin kinaz (CaM kinaz) ve tirozin kinaz gibi kalsiyum bağımlı kinazların aktivitesini tetikler. CaM kinaz non-NMDA kanallarını fosforlar ve onların glutamat bağlama duyarlılığını artırır. Ayrıca bir

retrograd haberci sentezlenir ve bu presinaptik terminale daha fazla transmitter maddenin serbestlenmesini sağlamak üzere gönderilir. Ca-kalmodulin bağımlı kinazı (CaMK) ve adenil siklazı aktive eder. Adenil siklaz, ATP'yi cAMP'ye çeviren enzimdir ve böylece cAMP bağımlı protein kinaz (PKA) aktive olur. PKA üzerinden başlayan yeni protein sentezi süreci, yeni sinapsların oluşumuna neden olacak yapısal değişiklikleri meydana getirir. Yeni sinaps yapımının uzun süreli bellek oluşumu için yapısal bir zemin teşkil ettiği düşünülür (Coultrap and Bayer, 2012; Henley and Wilkinson, 2013; Sanhueza and Lisman, 2013).

Hormon bağımlı öğrenme ve bellek süreçlerinin anlaşılması, özellikle yaşlanmaya bağlı demansın, tıbbi hormon tedavilerinde yan etki olarak ortaya çıkan bilişsel bozuklukların ve davranışta görülen cinsiyet bağımlı farklılıkların anlaşılması bakımından önemlidir. Hormonların hipokampal bağımlı öğrenme ve UDG yanıtları üzerine olan etkisi konusunda çalışmalar varsa da sonuçları tartışmalıdır. Bu kapsamda, özellikle kronik strese ve overektomiye bağlı oluşan steroid yapılu hormonların kan düzeylerindeki değişmelerin öğrenme ve bellek performansı ve UDG üzerine olan etkisi yoğun bir şekilde çalışılsa da, steroid hormonlar gibi hücre içi reseptöre sahip olan tiroid hormonunun hipokampus dokusundaki etkileri hakkında bilinenler kısıtlıdır.

Tiroid hormonları (triiodotironin, T_3 ve tiroksin, T_4), merkezi sinir sisteminin normal gelişimi ve olgunlaşması için gerekli olup hücre proliferasyonu ve migrasyonu, apoptosis, nöronal integrasyon ve dentritik arborizasyon gibi bir seri olayı düzenler (Kilby, 2003; Lin et al., 1998; Zoeller and Rovet, 2004). Yenidoğan ve çocukluk döneminde oluşan tiroid hormon eksikliğinin beyin gelişimi üzerine olan ciddi olumsuz etkileri iyi bilinir. Deney hayvanlarında prenatal ve neonatal dönemlerde tiroid hormonu eksikliğinin şiddetli kognitif (bilişsel) bozukluklara neden olduğu (Porterfield and Hendrich, 1993) ve bu bozuklukların hipokampüste sinaptik plastisitenin azalmasıyla bağıntılı olduğu (Gilbert and Sui, 2006a) saptanmıştır. Tiroid hormonun yetişkin dönemdeki eksikliğinin de hipokampus gibi yapılarda devam eden nörogenezi, sinaptogenezi, uyarılabilirliği ve plastisiteyi bozarak hafıza bozukluğu halüsinasyon, depresyon gibi durumlara neden olabileceği (Davenport et al., 1976; Haggerty et al., 1993; Osterweil et al., 1992); deney hayvanlarında ise adult nörogenezin tiroid hormonlarının az ya da çok salgılanmasından etkilenebileceği (Ambrogini et al., 2005; Desouza et al., 2005) e düşük tiroid hormonu düzeylerinin, hipokampüste progenitör hücrelerde morfolojik değişikliklerin oluşumuna neden olabileceği ve bu morfolojik değişikliklerin hipokampal sinapsların etkinliğini dolayısıyla hipokampal öğrenme ve bellek performansını etkileyebileceği bildirilmektedir (Gilbert and Sui, 2006a; Rivas and Naranjo,

2007). Biz de yetişkin tip hipotiroidide hipokampal belleğin bozulduğunu Y-labirent kullanarak gösterdik (Artis et al., 2012a).

Tiroid hormonları beyinde non-genomic ve genomik etkilere sahiptir. Tiroid hormonlarının nongenomic etkileri tiroid hormon receptor (TR) ve tiroid hormonu arasındaki intranükleer etkileşimi gerektirmez ve sitoplazma ya da hücre membranında başlar. Beyin hücrelerindeki nongenomic etki, membran reseptörü üzerinden MAPK yolağının aktivasyonu (Calloni et al., 2005), mikrofilaman organizasyonunun (Farwell et al., 1995; Siegrist-Kaiser et al., 1990) ve Deyodinaz Tip II (D2) aktivitesinin (Leonard et al., 1981; Leonard et al., 1984; Leonard and Larsen, 1985; Leonard et al., 1990; Silva et al., 1984) düzenlenmesini içine alır. Tiroid hormonlarının genomik etkisi ise hormonun transkripsiyon faktörleri olan TR proteinlerine intranükleer bağlanmasıyla başlar ve çeşitli genlerin ekspresyonları negatif veya pozitif yönde etkilenir. Nongenomic etki T4 bağımlı iken, genomik etki T3'un kromatin bağlı ligandla aktive edilen TR'leri ile etkileşimdir (Viguerie and Langin, 2003; Yen, 2001). T3-bağımlı transkripsiyonal etki saatler ya da günler içinde gerçekleşirken, nongenomic etki saniye ya da dakikalar içinde meydana gelir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar tiroid hormonunun beyindeki bir diğer nongenomic etkisinin glutamaterjik nörotransmitter sistem üzerine olduğunu göstermiştir (Losi et al., 2008). Bu sistem, yularıda açıklandığı gibi UDG'nin ve sinaptik plastisitenin oluşumu yanında bazı patolojilerin oluşmasında da sorumlu görülmektedir. Beynin glutamat içeriğinin küçük bir kısmı ekstrasellüler ortamda bulunur ve ekstrasellüler glutamat düzeyinin yüksek düzeyde bulunması post-sinaptik nöronlarda hipereksitabiliteye ve sitotoksiteye neden olabilir (Danbolt, 2001). Bu nedenle glutamat nörotoksitesi epilepsi, Alzheimer hastalığı, serebral iskemide, Parkinson hastalığı ve şizofreni gibi bir çok patolojik olayda da önemli rol oynar (Reis et al., 2009). Tiroid hormonunun, ekstrasellüler glutamatın, özgül taşıyıcıları olan GLAST ve GLT-1 aktivitesini artırarak, astrositler tarafından alınmasını uyardıkları ve böylece nörotoksiteden nöronları ve glial hücreleri korudukları bilinmektedir (Danbolt, 2001; Davis et al., 2011). Hipotiroidizmde GLAST ve GLT-1 seviyelerinin azaldığı ve sonuçta ekstrasellüler ortamda biriken glutamatın nörotoksiteye zemin hazırladığı iddia edilmektedir (Coulter and Eid, 2012). T3 ile bağlanan ve birbiriyle yapısal olarak ilişkili farklı genle kodlanan iki tiroid hormon reseptörü [TR α (NR1A1) ve TR β (NR1A2)] hormonun genomik etkilerine aracılık eder. Her iki genin THR α 1, THR α 2, THR α 3, THR β 1, THR β 2 ve THR β 3 izoformları vardır (Cheng et al., 2010). Bunlardan THR α 1 ve THR β T3 duyarlıdır, ancak THR α 2 ve α 3'ün T3 bağlama aktivitesi bulunmamaktadır. THR

izoformlarının ekspresyonları sıçanda yaş ve beyin bölgesine özgü olup, bunlardan $THR\alpha 1$, $THR\alpha 2$ ve $THR\beta 2$ yetişkin sıçan beyinde hipokampüste yüksek oranda eksprese edilir (Bradley et al., 1992; Lechan et al., 1993; Puymirat et al., 1992). Hipotiroidinin TR ekspresyonunda bölgeye ve izoform tipine özgü değişiklikler oluşturduğu bildirilmektedir (Constantinou et al., 2005). Beyinde farklı reseptör izoformlarının fizyolojik rolleri tam olarak bilinmese de $TR\alpha$ 'nın sinaptik plastisiteye aracılık eden genleri modüle ettiği ve dolaşımda tiroid hormon azlığı veya $TR\alpha$ yoksunluğunun özellikle hipokampüste sinaptik plastisite için kritik olan proteinlerin ekspresyonunda azalmaya neden olduğunu ortaya konulmuştur (Desouza et al., 2005; Guadano-Ferraz et al., 2003; Thompson, 1996; Tong et al., 2007; Vallortigara et al., 2009; Venero et al., 2005; Wilcoxon et al., 2007). Deneysel olarak indüklenen hipotroidizmde UDG'nin engellendiği, Uzun Dönemli Baskılanmanın ise arttığı bildirilmektedir (Alzoubi et al., 2006a; Gerges and Alkadhi, 2004; Gilbert and Sui, 2006a; Montero-Pedrazuela et al., 2006). Buna bağlı olarak UDG için gerekli sinyal moleküllerinin (örneğin: adenyl cyclase 1, PKA, MAPK, CREB ve CAMKIV) düzeylerinin hipotroidizmde deprese edildiği ve tiroid hormonu replasmanının azalmayı geri çevirdiği rapor edilmektedir (Alzoubi et al., 2006a; Gerges and Alkadhi, 2004). Anatomik düzeyde dentritik spin yoğunluğunun hipo- ve hipertroidili sıçanlarda değiştiği (Sala-Roca et al., 2008), sinaptik plastisite ve nöroanatomi üzerindeki etkilerine ek olarak hipotroidizmin indüklenmesinin sıçanlarda uzamsal belleği engellediği (Alzoubi et al., 2006a; Carageorgiou et al., 2007; Smith et al., 2002) de rapor edilmektedir.

Beyinde tiroid hormonlarının homeostasisi, hormonun kan düzeylerinden bağımsız olarak (Lebaron et al., 2004; Shukla et al., 2010) kontrol edilir. Aktif tiroid bezi hormonu olarak kabul edilen ve hormonun genomik etkilerinden sorumlu tutulan $T3$ 'ün plazmadaki başlıca kaynağı Tiroid bezi tarafından yapıp kana salınan $T4$ 'dür ve bu $T4$ karaciğer ve böbrekte yoğun olarak bulunan Tip 1 deiyodinaz ($D1$) tarafından $T3$ 'e çevrilir. Beyin dokusunda ise $T3$ 'ün yaklaşık %80'i $T4$ 'den tip II deiyodinaz ($D2$) enziminin sayesinde sentezlenir. Diğer bir deiyodinaz olan tip III deiyodinaz ($D3$) ise $T3$ 'ü $rT3$ 'e dönüştürür. Böylece deiyodinazlar $T3$ 'ün lokal konsantrasyonunu düzenleyerek merkezi sinir sisteminde tiroid hormonlarının etkisinin kontrolüne katkı sağlarlar (Bianco and Kim, 2006). $D2$ enzimi, serebral korteks, hipokampus, amigdala, limbik ön beyin ve beyincikte bulunan astrositler ve üçüncü ventrikül tanisitleri tarafından eksprese edilirken, $D3$ enziminin ekspresyon düzeyi hipokampus ve piriform korteksde olmak üzere çoğu beyin bölgesinde bulunan nöronlarda oldukça yüksek seviyelerde bulunmuştur (Courtin et al., 2005).

Deiyodinaz enzimlerin ekspresyonunun kandaki tiroid hormonu değişikliklerine karşı beyinde lokal bir kontrol mekanizması oluşturduğuna dair araştırma bulguları vardır. Örneğin D2 enziminin hipotroidili sıçanların serebral korteksinde bulunan bazı internöronlar tarafından da sentezlendiği (Guadano-Ferraz et al., 2003); D2 enzim aktivitesi ve mRNA konsantrasyonunun artışına bağlı olarak beyin T3 konsantrasyonunun korunduğu (Silva et al., 1984); tiroid hormonlarının beyin dokusunda (Pallud et al., 1999) ve kùltüre edilmiş astrositlerde D3 aktivitesini ve mRNA konsantrasyonunu indüklediği (Esfandiari et al., 1992; Esfandiari et al., 1994; Pallud et al., 1999) bildirilmektedir. Hipotroidizmde D3 aktivitesi ve mRNA düzeyindeki azalmanın serebral korteks, hipokampüs ve beyincik gibi beyin bölgelerinde daha belirgin olarak gözlendiği rapor edilmektedir (Broedel et al., 2003; Lemkine et al., 2005; Leonard et al., 1984; Pallud et al., 1999; Peeters et al., 2001). D3 seviyesindeki bu azalma T3'ün bozulma (degradation rate) oranını ve ayrıca prohormon olan T4'ün bozulma oranını düşürür. Bu D3 baskılanması ile birlikte D2'nin yükseltilmesi doku T4 düzeyinin azalması karşısında doku T3 konsantrasyonundaki düşüşü azaltmaya hizmet eder (Meinhold et al., 1993). Yeni doğan sıçanlarda D1 enzimi bu enzim için spesifik bir inhibitör olan 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) ile inhibe dildiği zaman dolaşımdaki T3 seviyesi azalmaz (Calloni et al., 2005). Bu nedenle, D2 beyin, hipofiz, kalp ve plasenta gibi dokularda T3 üretimi için ve sistemik tiroid hormon homeostasisi için kritik önem taşır (Croteau et al., 1996). Beyin dolaşımdaki T3 konsantrasyonuna çok az katkıda bulunur ve beyindeki deiyodinaz aktivitesinin %90'ından fazlası D2 kaynaklıdır (Bianco and Kim, 2006). Beyinde D2 tarafından üretilen T3 ve plazmadaki T3'ün farklı gen alt popùlasyonlarının regùlasyonuna karışıkları bilinmektedir (Morte et al., 2010). Özellikle D2 aktivitesinin eksikliği T3 tarafından negative olarak regùle edilen TH-bağımlı genlerin ekspresyonunu etkiler (Morte et al., 2010). Böylece D2 aktivitesindeki azalma beyinde lokal hipotroidizm ile sonuçlanır (Khan et al., 2012).

Grubumuz tarafından TUBITAK desteği ile yapılan çalışmalarda hipotroidizmin sıçanların hipokampüsünde NMDA reseptör alt birimlerinin (NR1, NR2a ve NR2b) anlatımlarını baskıladığı, hipokampal UDG yanıtlarını ve öğrenme performansını bozduğu bulunmuştur. Yetişkin tip hpotiroidide bozulmuş öğrenme performansı (Artis et al., 2012a), baskılanmış UDG (Artis et al., 2012a; Lee et al., 2003) ve NR1 mRNA düzeyinde azalma (Lee et al., 2003) diğer araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Lee et al., 2003). Aktif T4 hormonun kan seviyesindeki azalmayı, doku seviyesinde kompanze edebilecek yukarıda açıklanan mekanizmanın varlığına ait kuvvetli delillere rağmen, yetişkin tip hipotiroidili sıçanlarda

bozulmuş öğrenme – bellek performansı bulunması şaşırtıcıdır. Öncelikle davranışsal bozulmanın hipotiroid sıçanların azalmış motor performansına bağlı olabileceği düşünülebilir. Ancak öğrenme testlerinde motor performansı yansıtan yüzme hızı gibi parametreler kontrol gruplarından farklı bulunmamıştır. ***Bu nedenle hipotiroidi durumunda deiyodinaz kompanzasyon mekanizmasının neden öğrenme ve bellekteki bozulmayı engelleyemediği sorusunun cevaplanması önemlidir.***

Deiyodinaz enzimler yapısında selenosistein aminoasiti formunda Selenyum (Se) bulundurur ve bu nedenle selenoprotein olarak da sınıflandırılırlar. Se, metabolik ve antioksidan savunma yollarının fonksiyonunda önemli görev alan bir eser elementtir. Merkezi sinir sisteminde inorganik iz elementlerin homeostasinin diğer organlara kıyasla belirgin farklılıklar gösterdiği uzun zamandır bilinmektedir (Spector, 1989; Takeda, 2004). Özellikle Se beyin normal fonksiyonları için gerekli temel mikro besindir (Chen and Berry, 2003; Savaskan et al., 2003; Schweizer et al., 2004a; Schweizer et al., 2004b). Son çalışmalar Selenyum durumunun beyin fonksiyonları için kritik olduğunu ve düşük beyin Se düzeylerinin gelişim sırasında beyin defektlerine ve çeşitli beyin hastalıklarına neden olduğunu ortaya koymaktadır (Arthur et al., 1997; Ramaekers et al., 1994; Savaskan et al., 2003). Beyinde Selenyumun bölgeye özgü bir dağılım gösterdiği özellikle hipokampus, korteks, olfaktorik bulb ve beyinciğin granüler hücre katmanı gibi boz madde bölgelerinde bol miktarda bulunduğu oysa striyum veya septum gibi nörondan zengin bazı yapılarda düşük düzeylerde olduğu rapor edilmektedir.

Se eksik beslenmenin deiyodinaz enzim aktivitesinde değişikliklere neden olduğu ve böylece de TH kontrolünde rol oynadığı öngörülmektedir. Bununla birlikte erişkin sıçanlarda besinsel Se eksikliğinin Tiroid ekseni üzerindeki etkisi nispeten ılımlıdır ve birkaç doku ile sınırlıdır (Arthur et al., 1990; Chanoine et al., 1992b). En belirgin etki hepatik ve renal D1 aktivitesinde %95 oranında bir azalma ve serum T4 konsantrasyonunda %40-50 oranında bir artıştır (Beckett et al., 1989). Bununla birlikte Serum T3 ve TSH düzeyleri ile tiroidal D1 ve beyin D3 aktiviteleri büyük ölçüde değişmez (Chanoine et al., 1992a; Meinhold et al., 1993). Bu hayvanlarda beyin D2 aktivitesinin azaldığı fakat bunun, Se eksikliğinin direkt etkisinden ziyade (Chanoine et al., 1992a; Chanoine et al., 1992b; Meinhold et al., 1993) dolaşımda yüksek oranda bulunan T4'ün düşürücü etkisine bağlı olduğu rapor edilmektedir (Leonard et al., 1984). Beyin ve tiroidin Se için lokal korunma mekanizmalara sahip olduğu ileri sürülmektedir (Buckman et al., 1993; Meinhold et al., 1993; Vadhanavikit and Ganther, 1993). Ayrıca selenyum eksik diyetle beslenen hayvanlarda TSH düzeyinde önemli bir

baskılanma görülmediği, ancak plazma T4 konstrasyonlarında %70-80 oranında azaldığı bildirmektedirler (Beckett et al., 1989). Bu yazarlar ayrıca selenyum eksikliğinde D2 aktivitesindeki bozulmadan dolayı T4 üretimindeki normal homeostatik geri-besleme kontrolünün kaybolduğunu ifade etmektedirler. TH'nın farelerde serum selenyum düzeylerini pozitif olarak etkilediğini, hipotroidizmde serum Se düzeylerinin düştüğünü belirlemişlerdir (Mittag et al., 2010).

Selenoprotein P (Sepp1) kandaki Se'u bağlar, beyin ve testis dokusunda bulunan apolipoprotein E (apoER2) reseptörlerine tutunarak hücre içine Se ile birlikte geçer (Burk and Hill, 2009; Coulter and Eid, 2012; Dringen and Hirrlinger, 2003). Başka dokularda Se seviyesi azalsa bile beyin Se seviyesi olabildiğince sabit tutulsa da (Burk and Hill, 2009; Chen and Berry, 2003; Hill et al., 2004; Hill et al., 2007), beyindeki selenyum düzeyinin kognitif performansda önemli etkisi olduğunu bildirmektedir (Akbaraly et al., 2007; Qin et al., 2008). Sepp1 bulunmayan farelerde beyin Se seviyesinin azaldığı; bu fareler Se eksik diyetle beslendiğinde beyin sapı ve talamusda ileri derecede aksonal dejenerasyona bağlı nörolojik bozukluklar ve ölüm geliştiği; hipokampusun CA1 bölgesinde basal sinaptik transmisyon ve kısa süreli plastisinin ve buna bağlı öğrenme eksikliğinin geliştiği; Se zengin diyet ile beslendiklerinde nörodejenerasyon ve nörolojik fonksiyon bozukluklarının önemli derecede azaldığı rapor edilmektedir (Caito et al., 2011; Valentine et al., 2005; Valentine et al., 2008). Ayrıca Se lipid, protein ve nukleik asitleri peroksit etkisinden koruyan GPx ve tiyoredüktaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesinde de önemli role sahiptir (Huang et al., 2004; Schweizer et al., 2004a).

Yukarda bulguları özetlenen çalışmalardan hareketle, hipotiroidi durumunda, selenyum düzeyinde, D2 enzim protein ekspresyonunun kompensatuvar olarak artmasına paralel bir artışın da olması durumunda öğrenme bellek fonksiyonun korunabileceği düşünülebilir. Bu olasılığı test etmek üzere, standart diyetle beslenen ve diyetine 10 ppm Se ilavesi yapılan hipotiroidili ve kontrol grubu sıçanların (n=7, her bir grup için) Morris su tankı performanslarını karşılaştırdık. Bu ön çalışmada hipotiroidi, periferdeki D1 aracılıklı dönüşümü inhibe eden ama beyindeki D2 aracılıklı dönüşüme etki etmediği bilinen PTU ile oluşturuldu (Sanders et al., 1997) ve diyetine Se eklenen sıçanlar, kontrol grubuna benzer ama hipotiroidi grubundan daha iyi öğrenme bellek performansı gösterdiler. Bu nedenle sunulan proje, ön çalışma bulgularına dayanılarak ve Se takviyesinin PTU ile oluşturulan öğrenme bellek bozukluklarının önlenabilir olup olmadığı konusunu araştırmak ve moleküler hedefi ortaya koyabilmek için verildi. Deneysel çıktının, Se takviyesinin hipotiroidi ile oluşturulan

davranışsal, elektrofizyolojik ve moleküler parametrelerdeki bozulmayı önlenmesi yönünde olması beklenmektedir. Bu çıktının potansiyel hedefleri, (1) yetişkin tip hipotiroidi hastalarında görülen ve hastaların yaşam kalitesini etkileyen bellek bozukluklarının tedavisinde selenyumun destekleyici bir ajan olarak kullanımı; (2) lokal tiroid hormon seviyesinin NMDA reseptör protein anlatımı ve UDG'nin oluşmasındaki önemi; (3) tiroid hormonlarının lokal düzeydeki etkinliğinin kontrolünde Se'un rolünün önemi ve (4) yeni hedef moleküller olarak deiyodinaz enzim sisteminin UDG ve NMDA reseptör anlatımındaki katkısının ortaya konmasıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

1. Deney Hayvanları ve grupların oluşturulması

Bu çalışma için, 280 adet erkek yetişkin (2-4 aylık) Wistar sıçan kullanılacaktır. Sıçanlar her birine 0, 5, 10 ve 20 ppm/gün Se verilecek olan kontrol ve hipotiroidi oluşturulmuş toplam sekiz gruptan birine rastgele ayrılacaktır. Bütün sıçanlar standart yem ve çeşme suyu ile beslenirlerken, Selenyum takviyesi için uygun grupların yemine selenyum (Na_2SeO_3 , Merck) ve içme suyuna 6-*n*-propyl thiouracil (PTU, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) eklenecektir. Uygulamalara 21 gün süreyle devam edilecektir. Yapılacak öğrenme testlerinin, hipokampal Sinaptik plastisiteyi etkileyebileceği düşüncesi ile çalışmada kullanılacak ölçüm yöntemlerinin her bir grup için ayrı alt gruplarda yapılması planlanmıştır. Bu nedenle her grupta bulunan 35 sıçanın 12'sinde Morris Su Tankı denemeleri; 8'sinde Western Blot analizleri (örnek miktarının yeterli olmaması nedeni ile 2 sıçandan elde edilen toplam 4 hipokampus dokusu birleştirilerek analiz edilecektir); 8'inde UDG kayıtları ve 7'sinde hipokampus Se düzeylerinin tayini (her sıçanın sağ ve sol hipokampusları birleştirilerek) ve plazma serbest T3 ve T4 tayinleri yapılacaktır.

Tablo 1. Planlanan deney grupları ve kodları

	0ppm Se	5 ppm Se	10 ppm Se	20 ppm Se
Kontrol grubu	K0	K5	K10	K20
Hipotiroidi grubu	H0	H5	H10	H20

2. Hipotiroidi Oluşturma

Deneyssel hipotiroidizm, kafeslerinde 2'şerli olarak tutulacak olan sıçanların içme sularına 3 hafta süresince 30 ppm PTU eklenmesi ile oluşturulacaktır (Artis et al., 2012a). Kafeslerdeki su tüketimi günlük olarak takip edilecek ve tazelenecaktır. PTU tiollanmış urasil kaynaklı bir antihipertiroid ilaçtır; Tip I deiyodinazı inhibe ederek, total ve serbest T3 düzeyini azaltırken; beyin dokusunda yaygın olarak anlatımı yapılan Tip II deiyodinazı etkilemez. Çalışmada Se'un tip 2 deiyodinaz enzimi etkinliğini artırması beklendiğinden hipotiroidinin D2 inhibisyonu yapmadığı bilinen (Manna et al., 2013) PTU ile oluşturulması planlanmıştır.

3. Plazma T4, T3, ve hipokampus Se Düzeylerinin Ölçümü

Çalışılacak gruplarda kan örnekleri alımı takiben derhal 3000 rpm’de 5 dakika süre ile santrifüj edilecek ve plazma örnekleri ölçüm yapılacak güne kadar -20°C’de saklanacaktır. Sebest T3 ve T4 ölçümleri için uygun ELISA kiti kullanılacaktır; Se düzeyleri Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde bulunan ICP-MS cihazında hizmet alımı karşılığında belilenecektir.

4.Öğrenme testleri

Davranışsal çalışmalar için, Morris Su Tankı testi, hipokampus bağımlı öğrenmenin değerlendirilmesine spesifik ve yüksek duyarlıklılı bir testtir. Morris su tankı testi, daire şeklinde içi su dolu bir tankta gizlenmiş olan bir platformun bulunmasının öğretilmesi ve daha sonra platform kaldırılarak platformun yerinin öğrenilip öğrenilmediğinin test edilmesi esasına dayanır. Öğrenme denemeleri ardışık 4 gün; günde 4 kez (20’şer dk ara ile); hatırlama denemesi (probe) ise 5nci gün bir kez olmak üzere toplam 17 denemede yapılacaktır. Kullanılacak su tankının çapı 131 cm ve derinliği 70 cm’dir. Tank her deneme gününde 50 cm seviyesinde taze su ile doldurulacak ve su toksik olmayan bir boya ile siyah renge boyanacaktır. Su sıcaklığının 22±2 oC’de olmasına dikkat edilecektir. Daire şeklindeki tankın Kuzey-Doğu çeyreğine, tüm öğrenme denemelerinde sabit kalmak üzere 12 cm çapında bir platform yerleştirilecektir. Platformun yüzeyi su yüzeyinden 1 cm aşağıda olacak ve su yüzeyinden görünmeyecektir. Her deneme sırasında, tek bir sıçan su tankına platformun bulunduğu çeyrek dışındaki çeyreklerin birinden (rast gele) yüzü tankın duvarına gelecek şekilde bırakılacaktır. Suya bırakılan sıçanın, altmış saniyelik süre içerisinde, etraftaki sabit görsel ipuçlarından faydalanarak platformu bulması beklenecektir. Bu süre içerisinde platformu bulamayan sıçanlara uygun bir çubuk yardımı ile yardım edilecek ve platformu bulmaları sağlanacaktır. Probe denemesinde platform kaldırılacak ve deneme aynen yapılacaktır. Tüm denemeler Noldus Video izleme ve analiz sistemi kullanılarak kayıt edilecek, sıçanların platformu bulma süreleri, platformu bulmak için yüzdükleri toplam mesafe, ortalama yüzme hızları ve platformlu çeyrek alanda geçirdikleri süre değerlendirilecektir.

5.Elektrofizyoloji

Uyarı ve Kayıt Sistemi. Anestezi altında (üretan; 1.2 g/kg, ip) stereotaksik çatıya yerleştirilen sıçanlara cerrahi prensiplere uygun olarak sağ kranyotomi yapıldıktan sonra, uyarım izolatörüne (A385, World Precision Instruments, USA) bağlı olan bir bipolar elektrot (Teflon kaplı, paslanmaz çelik, 127 µm çaplı, ucu dışında izole edilmiş) vasıtasıyla medyal perforan yol (bregmaya göre mm; AP: -8.0, ML: 4.2) ve dış çapı 1,5 mm ve uzunluğu 10 mm olan Borosilikate kapiller tüplerden (World Precision Instruments) dikey bir mikropipet çekici (P30, Sutter Instrument Co, USA) ile hazırlanan ve içi 3M NaCl ile doldurulan cam mikropipet (uç direnci 2–10 MΩ) dentat girusun hilusuna (bregmaya göre mm: AP: -3.5, ML: 2.15) yerleştirilecek. Boyun derisi altına yerleştirilen Ag-AgCl disk elektrot, referans elektrot olarak kullanılacaktır. Kayıt elektrodunun içine yerleştirilen klorlanmış bir gümüş tel ve referans elektrodu bir head-stage kullanılarak tek kanal epitelyal voltaj/akım kısaç yükseltecine (VCC600, Physiological Instruments) bağlanacaktır. Bütün sistem bir Faraday kafesi kullanılarak topraklanacaktır.

Tipik Elektriksel Yanıtın Elde Edilmesi. Hem uyarıcı hem de kayıt elektrodu, pozitif yönlü bir sapmayı (EPSP) takip eden negatif yönlü bir sapma (PS) elde edilene kadar derin yapılara indirilecek. Granül hücre tabakasının tipik yanıtı elde edilmeye başlandığında elektrotların derinlikleri 0,1mm artırılarak en büyük cevabın eldesi sağlanacak. Bütün deneyler sonucu ortalama elektrot derinlikleri uyarıcı elektrot için 2,51mm kayıt elektrodu için 2,97mm olarak ayarlanacak.

Veri Kazanımı ve Uyarım. Veri kazanımı ve uyarım işleminin kontrolü “Scope” yazılımı (AD Instruments, Colorado Springs, CO, USA) ile yapılacaktır. Tek fazlı 10 V 0,175-ms süreli palslar A/D çevirici (Powerlab/8SP, AD Instruments, Colorado Springs, CO, USA) vasıtasıyla oluşturulacak ve uyarı izolatörünün tetiklenmesinde kullanılacaktır. Kaydedilen biyolojik sinyaller 0.1-10 kHz band-genişliğinde bir yükselticide 1000x kez yükseltilecektir. Aktivite 20 ms için 40 kHz hızında çevirim-içi olarak rakamsallaştırılacaktır.

Girdi-Çıktı Eğrileri “Input – Output (I/O) Curve”. Elektrotların yerleştirilmesinden 15 dakika sonra 175 µs süreli tek-fazlı sabit akım palsları her 20 saniyede bir verilerek I/O eğrileri elde edilecektir. Bu sırada akım şiddeti 0,1 mA’den 1,5 mA’e kadar 0,2 mA adımlarla artırılacak. Her akım şiddeti için kaydedilen 3 ardıl yanıtın ortalaması akım şiddetine karşı grafiklenecektir. En yüksek PS genliğinin yarısını oluşturan akım şiddeti test uyaran şiddeti olarak belirlenecek ve deneyin sonraki aşamalarında bu akım şiddeti kullanılacak.

Uzun Erimli Güçlenme. Test uyararı ile 30sn’de bir uyarı verilerek 15 dakika süren bazal kayıt alınacaktır. Bazal kaydın ardından 5’er dakika ara 100 Hz frekansında 1 sn süren yüksek frekanslı uyarım (YFU) ile UDG indükleneyecektir. Son YFU’ı takiben toplam 90 dakika olacak şekilde 30sn’de bir test uyararı ile uyarıma devam edilecektir.

Veri Analizi. EPSP dalgasının eğimi, dalganın başlangıcı ve PS dalgasının başlangıcı arasındaki voltaj farkının %20–80 arasındaki eğriden; PS genliği ise ilk pozitif yükseltiden sonraki negatif yükselti arasındaki farktan hesaplanacaktır. Başlangıçtaki 15 dakikalık sürede tetiklenen 30 alan potansiyelinin EPSP ve PS’larından oluşan ortalama eğim ve genlik değerleri 100 kabul edilecek; YFU sonrasındaki her EPSP ve PS bunun yüzdesi cinsinden hesaplanacak. UEG’nin indüksiyonu için YFU sırasında oluşan eğim ve genliklerin; idame dönemi için ise son YFU’dan deney sonuna kadarlık bölümde oluşan eğim ve genlik değerlerinin ortalamaları alınacaktır.

6. Hipokampus D2 ve D3 enzim protein anlatımının belirlenmesi. Western Blot çalışmaları için ayılmış sıçanlar, grubuna uygun uygulamaların bitimini takiben dekapite edilerek beyinleri çıkartılacaktır. Beyin dokusunun sağ ve sol hemisferi ayrıldıktan sonra sağ ve sol hipokampuslar bir kaşık yardımı ile beyinden ayrılacak ve ağırlıkları tartılacak ve daha sonra hipokampus doku örnekleri bir camın üzerinde bistüri yardımıyla mekanik olarak parçalanacaktır. Dokular, RNAlater solüsyonu içeren tüplere alınıp -80°C’de bekletilecektir. Örnekler çalışılacağı zaman hipokampal dokulardan Tri reagent ile protein izolasyonu yapıldıktan sonra Bradford belirteci ile konsantrasyonları belirlenip her kuyucukta 50 µg protein olacak şekilde SDS jeli yüklenecek ilk jeli geçene kadar 100V, jeli geçtikten sonra ise 120 V’ta yürütülecek ve nitroselüloz membrana aktarılacaktır. %5 süt tozu (TBS-T içinde hazırlanmış) ile 1 saat bloklama yapıldıktan sonra, blotlar primer antikorlarla (anti-DIO2, 1:1000; anti-DIO3, 1:1000;) 12-16 saat, +4 °C’de inkübe edilecektir. İnkübasyondan sonra TBS-T ile yıkama işlemi gerçekleştirilip, HRP ile konjuge

edilmiş sekonder antikor (anti-mouse ve anti-rabbit, 1:5000 (Pierce-Thermo) %5 süt tozu içinde hazırlanan) ile 1 saat muamele edilecektir. ECL solüsyonu ile sinyal almak için görüntüleme işlemi yapılacaktır. Hiperkaset (Amersham Autoradiography cassette, 24x30 cm, RPN11643) içine yerleştirilen membranlar 1-10 dakika karanlık odada inkübe edilip membrandaki protein bantları hiperfilme (Amersham Hyperfilm ECL, 50 sheets, 18x24 cm 28906836) aktarılacaktır. Film developer (Developer, ILFORD Multigrade, Katalog No:757855) ve fiksatiften (Rapid Fixer, ILFORD Hypam, Katalog No:1758285) geçirilip, distile su ile yıkanacak ve ardından kurutulacaktır. Daha sonra bu filmler Gene Genius Bio Imaging System yardımıyla bilgisayara aktarılacaktır. Primer antikor olarak 1/400 oranında TBS-T sulandırılmış Beta actin veya beta tubulin antikorları kullanılacaktır. Blotlama, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesinde mevcut olan Bio-Rad Transblot Turbo sistemi ile yapılacaktır.

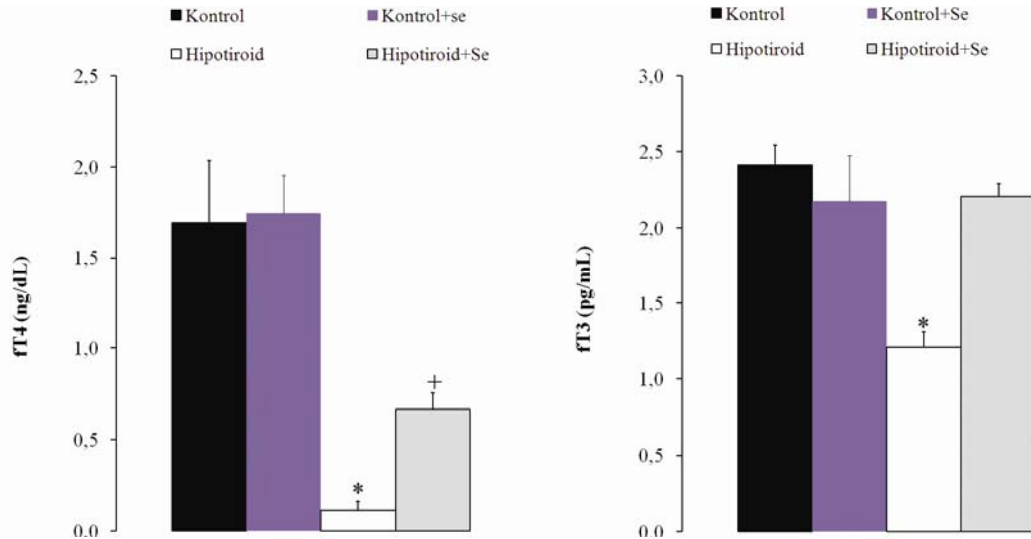
7. Veri analizi ve istatistik:

Çoklu grupların tek ölçümlü verilerinin karşılaştırılmasında tek-yönlü ANOVA, çok ölçümlü verilerin karşılaştırılmasında tekrarlayan ölçümlerle ANOVA testleri, iki grubun karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren veriler için t testi, normal olmayan dağılım gösteren veriler için Mann Withney U testi kullanılacaktır.

4. BULGULAR

Proje deneyleri, önerimizde belirtmiş olduğumuz bütün gruplarda gerçekleştirildi. Üç farklı dozda Se verilen sıçanların elde edilen bulguların istatistiksel analizi, bu gruplar arasında doz bağımlı bir etkinin olmadığını gösterdi (Tek yönlü ANOVA testi; P değerleri > 0.05). Verilerin sunumunda sadeliği ve anlaşılma kolaylığını sağlamak bakımından bu grupların değerleri birleştirildi. Bu nedenle bulgular, Se verilen ve verilmeyen kontrol grupları ve Se verilen ve verilmeyen hipotiroidi grupları olmak üzere 4 grup için verildi.

1. Tiroit hormon ölçümleri, hipotiroidinin verifikasyonu: Se verilen ve verilmeyen kontrol grupları ve Se verilen ve verilmeyen hipotiroidi gruplarının serum serbest T4 ve T3 konsantrasyonlarının ortlamaları ve standart hata değerleri Şekil 1’de görülmektedir. Bulguların istatistiksel analizi, serbest T4 konsantrasyonunun PTU uygulaması ile anlamlı düzeyde azaldığını ve Se uygulaması ile bu azalmanın kontrol değerlerine dönmediğini göstermiştir. Buna karşılık PTU verilen sıçanlarda azalan serbest T3 konsantrasyonları Se uygulaması ile kontrol değerlerine ulaşmıştır.

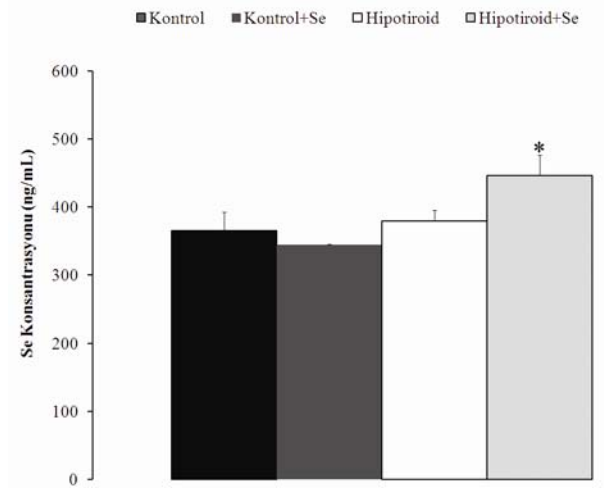


Şekil 1. Se verilen ve verilmeyen kontrol grupları ve Se verilen ve verilmeyen hipotiroidi gruplarının serum serbest T4 ve T3 konsantrasyonları. * Selenyum

verilen ve verilmeyen kontrol gruplarına göre; + diğer gruplara göre anlamlı farklılığı simgelemektedir ($p < 0.01$). Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

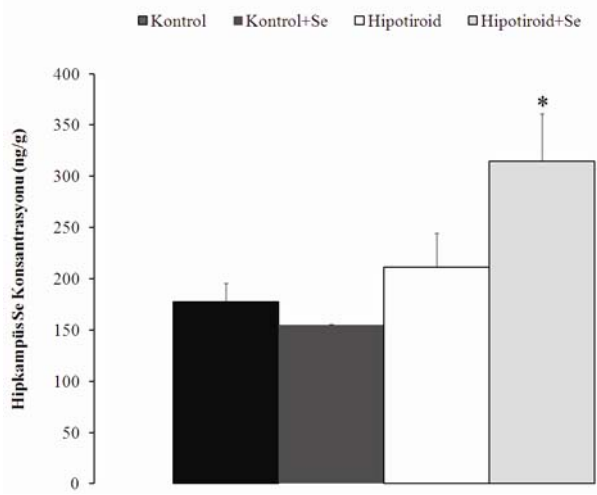
2. Plazma ve hipokampus Selenyum konsantrasyonları.

Se verilen ve verilmeyen kontrol grupları ve Se verilen ve verilmeyen hipotiroidi gruplarının serum Se konsantrasyonlarının ortalamaları ve standart hata değerleri Şekil 2’de görülmektedir. Bulguların istatistiksel analizi, Se konsantrasyonunun PTU uygulaması ile anlamlı düzeyde değişmediğini ve Se uygulaması ile kontrol değerlerine göre arttığını göstermektedir.



Şekil 2. Se verilen ve verilmeyen kontrol grupları ve Se verilen ve verilmeyen hipotiroidi gruplarının serum Selenyum konsantrasyonları. * Selenyum verilen ve verilmeyen kontrol gruplarına göre anlamlı farklılığı simgelemektedir ($p < 0.05$). Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

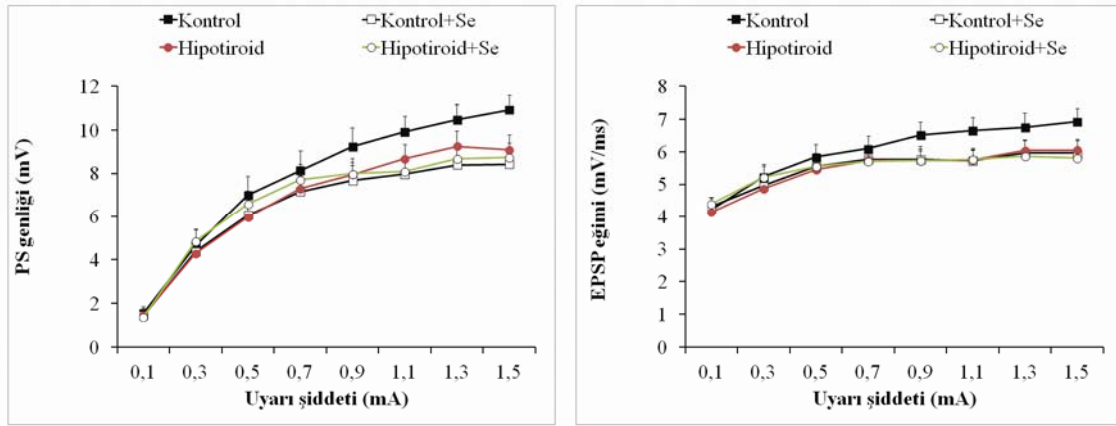
Se verilen ve verilmeyen kontrol grupları ve Se verilen ve verilmeyen hipotiroidi gruplarının hipokampus Se konsantrasyonlarının ortalamaları ve standart hata değerleri Şekil 3’de görülmektedir. Bulguların istatistiksel analizi, Se konsantrasyonunun PTU uygulaması ile diğer bütün gruplara göre anlamlı düzeyde arttığını göstermektedir.



Şekil 2. Se verilen ve verilmeyen kontrol grupları ve Se verilen ve verilmeyen hipotiroidi gruplarının hipokampus Selenyum konsantrasyonları. * Diğer gruplara göre anlamlı farklılığı simgelemektedir ($p < 0.002$). Değerler ortaklama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

3. I-O eğrileri.

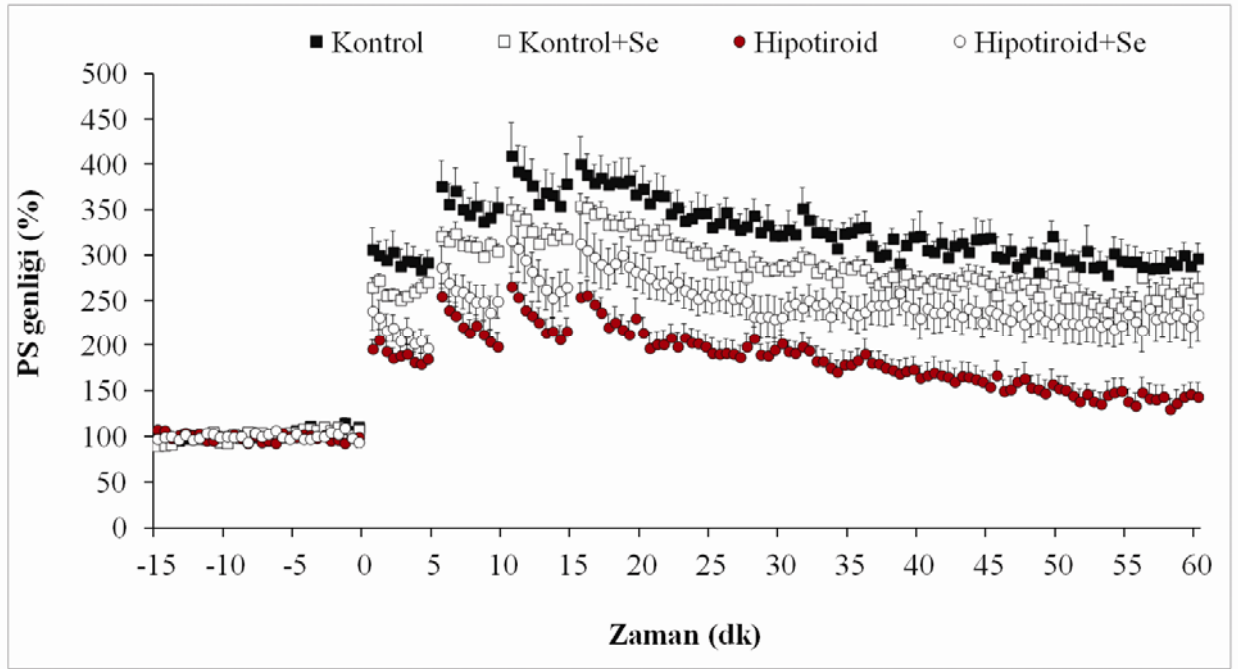
Se verilen ($n=24$) ve verilmeyen ($n= 8$) kontrol grupları ve Se verilen ($n=24$) ve verilmeyen ($n=8$) hipotiroidi gruplarının UDG yanıtları tetiklenmeden önceki input-output eğrileri Şekil 4’de görülmektedir. Bu eğriler 0.1 mA’dan başlayarak 1.5 mA’e kadar 0.2 mA adımlarla artırılan uyarı şiddetine karşı oluşan PS genlikleri ve EPSP eğimlerinin grafiklenmesi ile elde edilmiş ve gruplar arasındaki farklılık tekrarlayan ölçümler ile ANOVA testi kullanılarak belirlenmiştir. İstatistiksel analiz sonuçları anlamlı bir grup etkisi ve anlamlı bir Grup x Uyarı Şiddeti etkisi ortaya koymadığından, grupların input-output eğrilerinin farklı olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu bulgu, gruplar arasında belirlenen UDG farklılıklarının, grupların farklı bazal sinaptik iletkenliğinden kaynaklanmadığına işaret etmektedir.



Şekil 4. Se verilen (n=24) ve verilmeyen (n= 8) kontrol grupları ve Se verilen (n=24) ve verilmeyen (n=8) hipotiroidi gruplarının UDG yanıtları tetiklenmeden önceki input-output eğrileri.

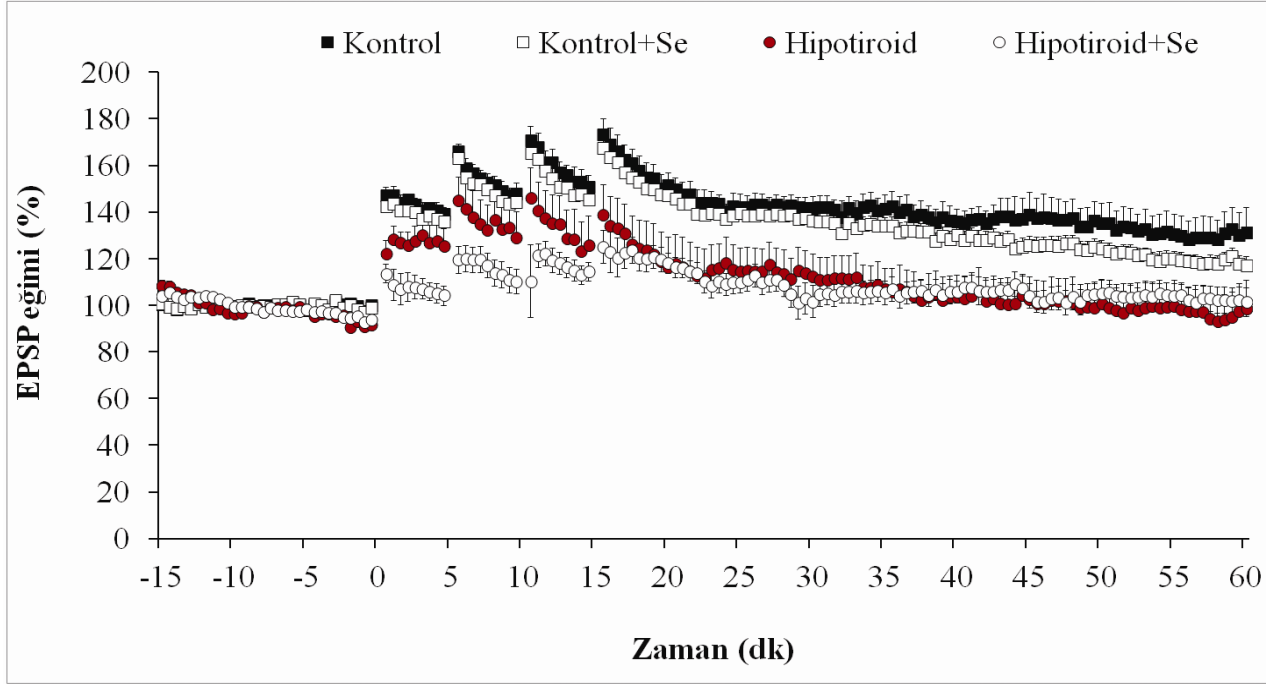
4. Uzun Dönemli Güçlenme

Beşer dakika ara ile 100 Hz frekansında 1 sn süreli elektriksel uyarımlarla tetiklenen PS genliği ve EPSP eğiminin güçlenmesi Şekil 5 ve 6’da görülmektedir. PS genliğindeki artışın gruplar arasında farklılık gösterip göstermediğini ortaya koymak için yapılan istatistik test sonuçları anlamlı Grup etkisi ($P < 0.01$) ve anlamlı Grup x Zaman etkileşimi ($P < 0.001$) olduğunu göstermiştir. Anlamlı çıkan etkiler için Post Hoc Tukey ile yapılan karşılaştırmalar, kontrol grupları arasında farklılığın olmadığını; Se verilmeyen hipotiroidililerde PS güçlenmesinin iki kontrol grubundan da anlamlı derecede az olduğunu (Hipotiroid – kontrol $P < 0.01$; Hipotiroid – Se verilen kontrol $P < 0.05$) gösterdi. Se verilen hipotiroidili grubun PS güçlenmesi ise diğer gruplardan farklı bulunmadı. Bu bulgular, hipotiroidili sıçanlarda azalan PS güçlenmesinin Se uygulaması ile önlenebileceğine işaret etmektedir.



Şekil 5. Se verilen (n=24) ve verilmeyen (n= 8) kontrol grupları ve Se verilen (n=24) ve verilmeyen (n=8) hipotiroidi gruplarının yüksek frekanslı uyarım modeli (0-15 dakikalar arası) ile oluşturulan populasyon spike (PS) genliğindeki güçlenme.

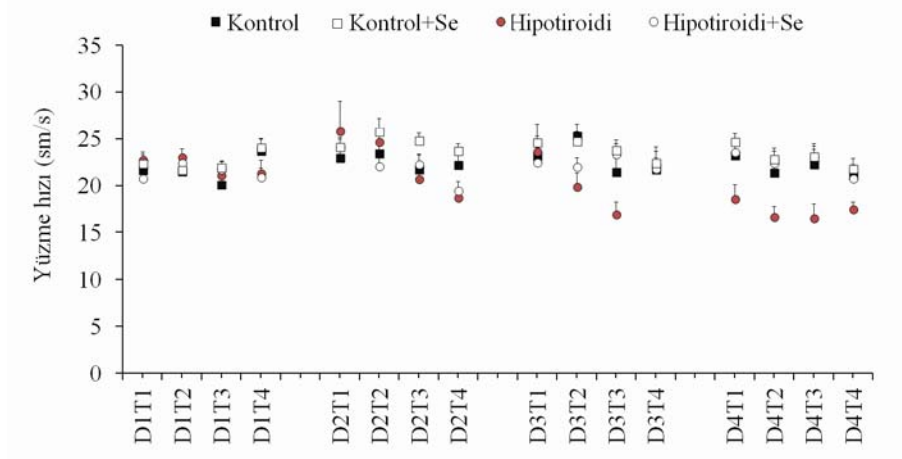
EPSP eğimindeki güçlenmeler analiz edildiği zaman da anlamlı Grup ve Grup x Zaman etkileşimi bulundu (P değerleri < 0.05). Anlamlı çıkan etkilerin hangi gruplar arasındaki farklılıklardan kaynaklandığının araştırılması için yapılan Post Hoc Tukey testi ise Se uygulaması olsun veya olmasın hipotiroidinin EPSP eğimindeki güçlenmeyi azalttığını ortaya koydu. Bu sonuçlar hipotiroidinin PS genliği ile paralel olarak EPSP eğimindeki güçlenmeyi de azalttığını; ancak Se tedavisi ile bu azalmanın önlenemediğini ortaya koymaktadır.



Şekil 6. Se verilen (n=24) ve verilmeyen (n= 8) kontrol grupları ve Se verilen (n=24) ve verilmeyen (n=8) hipotiroidi gruplarının yüksek frekanslı uyarım modeli (0-15 dakikalar arası) ile oluşturulan eksitator postsinaptik potansiyel (EPSP) eğimindeki güçlenme.

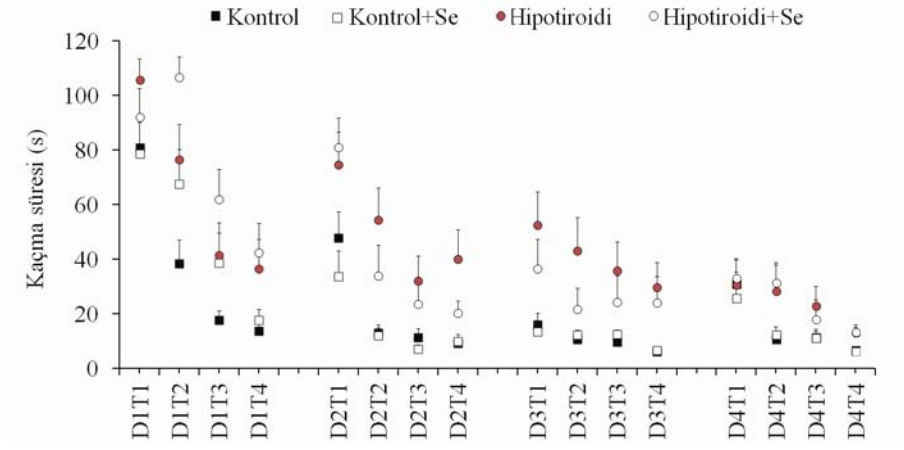
5. Davranış verileri

5.1. **Yüzme Hızı:** Se verilen (n=36) ve verilmeyen (n= 12) kontrol grupları ve Se verilen (n=36) ve verilmeyen (n=12) hipotiroidi gruplarının Morris Su Tankında gizli platformu bulma işi sırasında ölçülen ortalama yüzme hızı değerleri Şekil 7’de görülmektedir. Gün ve Gün-içi denemeler grup-içi faktör ve uygulamalar gruplar arası faktör olarak değerlendirildiğinde, tekrarlayan ölçümlü ANOVA testi anlamlı Grup x Deneme x Uygulama etkisini ortaya koymuştur ($F=3.18$; $P < 0.001$). Post hoc analizlerde 3ncü günün 3ncü ve 4ncü günün bütün denemelerinde Se verilmeyen hipotiroidi grubunun diğer gruplardan daha yavaş yüzdüğü belirlenmiştir.



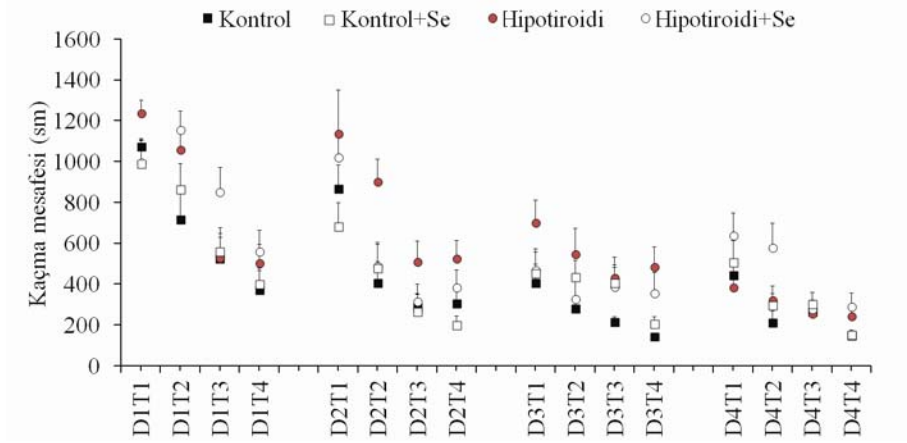
Şekil 7. Se verilen (n=36) ve verilmeyen (n= 12) kontrol grupları ve Se verilen (n=36) ve verilmeyen (n=12) hipotiroidi gruplarının Morris Su Tankında gizli platformu bulma işi sırasında ölçülen ortalama yüzme hızı değerleri. Denemeler 4 ardıl günde (D) ve her deneme günün 4 kez (T) olacak şekilde yapılmıştır.

5.2. Kaçma süresi: Se verilen (n=36) ve verilmeyen (n= 12) kontrol grupları ve Se verilen (n=36) ve verilmeyen (n=12) hipotiroidi gruplarının Morris Su Tankında gizli platformu bulma işi sırasında ölçülen kaçma süreleri Şekil 8’de görülmektedir. Gün ve Gün-içi denemeler grup-içi faktör ve uygulamalar gruplar arası faktör olarak değerlendirildiğinde, tekrarlayan ölçümlü ANOVA testi anlamlı Grup x Deneme x Uygulama etkisini ortaya koymuştur ($F=2.48$; $P < 0.001$). Post hoc analizlerde ilk 3 günün 3ncü ve 4ncü denemelerinde ve 4ncü günün 2nci denemesinde Se verilmeyen hipotiroidili sıçanların platforma daha uzun sürede ulaştıkları; Se verilen hipotiroidili grubun ise, 2 ve 3ncü günlerin belirtilen denemelerde kontrolden farklılık göstermediği bulunmuştur.



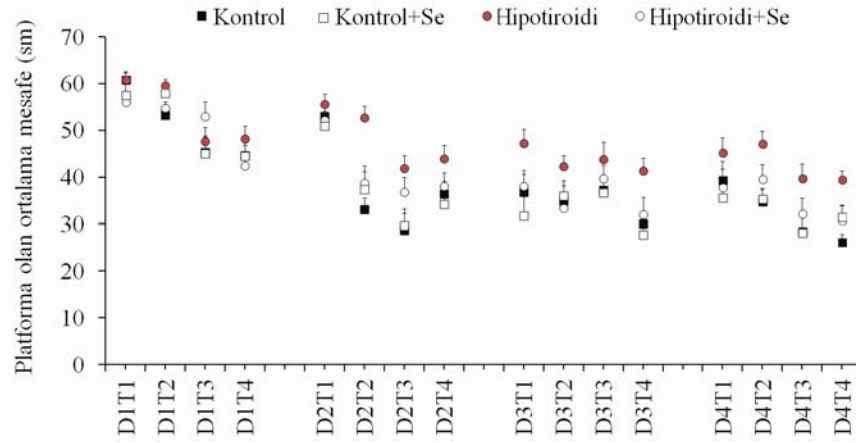
Şekil 8. Se verilen (n=36) ve verilmeyen (n= 12) kontrol grupları ve Se verilen (n=36) ve verilmeyen (n=12) hipotiroidi gruplarının Morris Su Tankında gizli platformu bulma işi sırasında ölçülen kaçma süresi değerleri. Denemeler 4 ardıl günde (D) ve her deneme günün 4 kez (T) olacak şekilde yapılmıştır.

5.3. Kaçma mesafesi: Se verilen (n=36) ve verilmeyen (n= 12) kontrol grupları ve Se verilen (n=36) ve verilmeyen (n=12) hipotiroidi gruplarının Morris Su Tankında gizli platformu bulma işi sırasında ölçülen kaçma mesafeleri Şekil 9’da görülmektedir. Gün ve Gün-içi denemeler grup-içi faktör ve uygulamalar gruplar arası faktör olarak değerlendirildiğinde, tekrarlayan ölçümlü ANOVA testi anlamlı Grup x Deneme x Uygulama etkisini ortaya koymuştur ($F=2.71$; $P < 0.001$). Post hoc analizlerde 2nci günün bütün denemelerinde ve 3ncü günün 3ncü ve 4ncü denemelerinde Se verilmeyen hipotiroidili sıçanların platforma daha uzun sürede ulaştıkları; Se verilen hipotiroidili grubun ise, 3ncü günün 4ncü denemesi hariç, belirtilen denemelerde kontrolden farklılık göstermediği bulunmuştur.



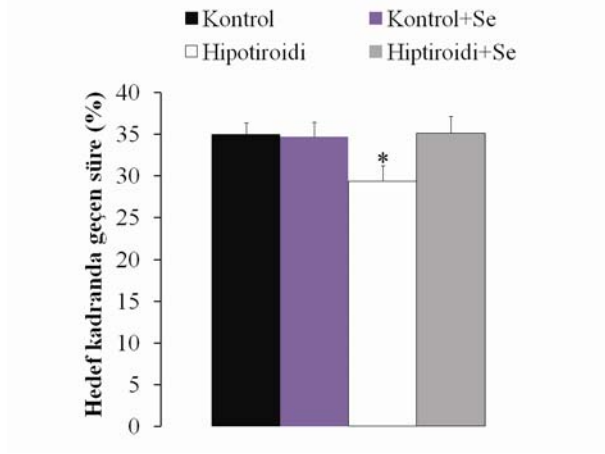
Şekil 9. Se verilen (n=36) ve verilmeyen (n= 12) kontrol grupları ve Se verilen (n=36) ve verilmeyen (n=12) hipotiroidi gruplarının Morris Su Tankında gizli platformu bulma işi sırasında ölçülen kaçma süresi değerleri. Denemeler 4 ardıl günde (D) ve her deneme günün 4 kez (T) olacak şekilde yapılmıştır.

5.4. Platforma olan ortalama uzaklık: Se verilen (n=36) ve verilmeyen (n= 12) kontrol grupları ve Se verilen (n=36) ve verilmeyen (n=12) hipotiroidi gruplarının Morris Su Tankında gizli platformu bulma işi sırasında platforma olan ortalama uzaklıkları Şekil 10'da görülmektedir. Gün ve Gün-içi denemeler grup-içi faktör ve uygulamalar gruplar arası faktör olarak değerlendirildiğinde, tekrarlayan ölçümlü ANOVA testi anlamlı Grup x Deneme x Uygulama etkisini ortaya koymuştur ($F=3.13$; $P < 0.001$). Post hoc analizlerde 2nci günün bütün denemelerinde ve 3ncü günün 3ncü ve 4ncü denemelerinde Se verilmeyen hipotiroidili sıçanların, 1nci günün bütün denemelei 2nci günün 1nci denemesi ve 3ncü günün 3ncü denemsi hariç bütün denemelerde platforma daha uzak mesafede kalarak yüüzdükleri; Se verilen hipotiroidili grubun ise, belirtilen denemelerde kontrolden farklılık göstermediği bulunmuştur.



Şekil 10. Se verilen (n=36) ve verilmeyen (n= 12) kontrol grupları ve Se verilen (n=36) ve verilmeyen (n=12) hipotiroidi gruplarının Morris Su Tankında gizli platformu bulma işi sırasında platforma olan ortalama uzaklık değerleri. Denemeler 4 ardıl günde (D) ve her deneme günün 4 kez (T) olacak şekilde yapılmıştır.

5.5. Probe denemsi: Se verilen (n=36) ve verilmeyen (n= 12) kontrol grupları ve Se verilen (n=36) ve verilmeyen (n=12) hipotiroidi gruplar 4 ardıl gün devam eden öğrenme sürecinden sonra, platformun kaldırıldığı probe denemisine tabii tutulmuşlardır. Bu denemelerde platformun bulunduğu kadranda geçirilen sürenin diğer kadranda geçirilen süreye oranı, bellek performansı ile ilişkilidir. Her grubun hedef kadranda geçirdikleri süre değerleri Şekil 11’de görülmektedir. İstatistiksel analiz sonuçları, Se verilmeyen hipotiroidli sıçanların hedef kadranda diğer gruplardan anlamlı oranda daha az süre geçirdiklerini göstermektedir. Selenyum verilen hipotiroidli grup ise kontrol gruplarından farklılık göstermemektedir.



Şekil 11. Se verilen (n=36) ve verilmeyen (n= 12) kontrol grupları ve Se verilen (n=36) ve verilmeyen (n=12) hipotiroidi gruplarının probe denemesinde platformun bulunduğu kadranda geçirilen süre değerleri.

6. **Moleküler çalışmalar.** Hipotiroid sıçanların bazı öğrenme denelerinde ve probe denemesinde kontrole göre gösterdikleri kötü performansı açıklayabilmek için, her gruba ait dörder örnekte DIO2 ve DIO3 proteinlerinin miktarı Western Blot yöntemi ile ölçüldü ve kontrole göre % değişim şeklinde Şekil 12 de bu sonuçlar verildi. Hipotiroid sıçanlarda kontrol gruplarına göre DIO2 proteinin miktarının değişmediği ama DIO3 miktarında anlamlı bir artış olduğu görüldü ($P < 0.05$). Buna karşılık her iki proteinin hipokampüsteki miktarı Se verilen hipotiroidili grupta kontrol gruplarından anlamlı düzeyde farklı idi (P değerleri < 0.001).

Şekil 12. Her gruba ait dörder örnekte DIO2 ve DIO3 proteinlerinin miktarları ve kontrol (K), hipotiroidili (H) ve selenyum verilen hipotiroidli (Se) sıçan örneklerine ait örnek görüntüler.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada uzamsal öğrenme ve bellek performansının deneysel hipotiroidizm oluşturulmasından etkilenip etkilenmeyeceği ve bir bozulma var ise bu bozulmanın Selenyum verilmesi ile düzeltilip düzeltilmeyeceği araştırıldı. Çalışma bulgularımız, öğrenme sürecindeki bazı denemelerde hipotiroidili sıçanların gizli platformun yerini bulmak için daha uzun süre harcadıklarını, daha uzun mesafe kat ederek platforma ulaştıklarını ve bu sırada platforma olan uzaklıklarının daha uzun olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, benzer hayvan modelleri ve insan çalışmalarında belirtilen hipotiroidizm ilişkili hipokampus fonksiyon bozukluğunu destekler nitelikte (Alzoubi et al., 2006b; Artis et al., 2012b; Ge et al., 2012; Gerges et al., 2004; Hosseini et al., 2010; Montero-Pedrazuela et al., 2006). Dahası hipotiroid sıçanlar, bellek performansının test edildiği probe denemesinde de kötü performans göstermektedir. Bu bulgumuz da literatürdeki benzer çalışmalar ile uyumludur. Bu proje ile ilk kez, bahse konu hipokampal fonksiyon bozukluklarının Se tedavisi ile düzeltilebileceğine dair deliller elde edilmiştir. Hipotiroidili sıçanların öğrenme sürecindeki bazı denemelerindeki ve probe denemesindeki kötü performansı; hipotiroidi oluşturulması sırasında Se uygulaması yapılan sıçanlarda görülmemiştir.

Morris su tankı testindeki performans, hipokampüsten kayıtlanan UDG'nin büyüklüğü ve sürdürülebilirliği ile yakından ilişkili görülmektedir (Eichenbaum and Otto, 1993; Morris et al., 1986; Moser et al., 1998; Richter-Levin et al., 1998; Tang et al., 1999). Gerçekten literatürde uzamsal bellek performansında hipotiroidili deney hayvanlarında gözlenen bozulmalarının azalmış UDG ile birlikte olduğu bildirilmektedir. (Alzoubi et al., 2006b; Alzoubi et al., 2009; Artis et al., 2012b; Gilbert and Sui, 2006b). Bu çalışmaların bulguları da bizim bulgularımızla uyumlu görünmektedir. Biz de bu çalışma ile 21 gün PTU uygulanan sıçanlarda dentat giristan kayıtlanan UDG yanıtlarının indüksiyonunda ve idame ettirilmesinde bozulma olduğunu bulduk. İnter-output eğrilerinin gruplar arasında farklılık göstermemsi nedeni ile bahse konu bozulmanın, UDG tetiklenmeden önceki sinaptik etkinlik farklılıklarından kaynaklanmadığı söylenebilir. Üstelik, davranış deney sonuçlarında olduğu gibi Se tedavisinin PS-UDG'sinde görülen azalmayı önleyebildiği de ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir. PS, uyarım sırasında bir eşik değere ulaşan hücrelerin aksiyon potansiyellerinin toplamını yansıtır. Buna karşılık Se uygulaması EPSP-UDG'sinde gözlenen azalmayı ortadan kaldırmamıştır. EPSP'ler ise dentritik komponenti yansıtmaktadır. Bu nedenle Se tedavisinin kayıtlanan alan potansiyellerinin somatik ve dentritik komponentlerini farklı etkileyebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

PTU, gerek tedavi gerekse deneysel amaçlarla yaygın olarak kullanılan antitiroid bir drogdur. PTU'nun tiroid hormonlarının sentez aşamasında iodidi iodine oksitleyen tioperoksidaz enzimini inhibe ettiği; böylece T4 ve T3 seviyelerini düşürdüğü bilinmektedir (LeGrow et al., 1999). 21 gün süreyle PTU uygulanan sıçanlarda da benzer bir azalma gözlenmiştir. Ayrıca PTU, T4'ün T3'e tiroid dokusu ve periferdeki çeviriminden sorumlu olan deiyodinaz enzimleri de inhibe eder. Literatürdeki çalışmalar deiodinaz enzim inhibisyonuna olan potensin farklılık gösterdiğini düşündürmektedir. Genel olarak, 3 deiodinaz (DIO1, DIO2 ve DIO3) T3 ve T4 hormonlarının dolaşım ve dokudaki seviyelerinin belirlenmesinde kritik rol oynarlar (Bernal, 2005; Bianco et al., 2002; Santisteban and Bernal, 2005). DIO1 beyin dışı periferik dokularda; DIO2 ise başlıca beyinde T4'ün T3'e dönüşümünden sorumlu görülmekte, DIO3 ise hem T4 hem de T3'ü inaktif hormon formlarına çevirmektedir. PTU ise bu enzimlerden DIO1'i güçlü bir şekilde inhibe ederken DIO2 üzerine ya hiç etki göstermez ya da bu etkisi sınırlı kalır (Ge et al., 2012). Se verilen hipotiroidili sıçanlarda T4 seviyesindeki azalmanın devam ettiğini ama T3 seviyesinin kontrol değerlerine yükseldiğini bu çalışmada gözlemledik. Dolayısıyla Se verilmesi halinde PTU-ya duyarız DIO2 etkinliğinin arttığını bu artışın ise T4'ün T3'e çevirimini aktive ederek söz konusu bulgunun elde edilmesine neden olduğunu düşünmekteyiz. Her ne kadar daha önceki bir çalışma hipotiroidizmde DIO2 up-regülasyonu olduğuna dair bulgular yayınlamışsa da (Gereben et al., 2008), bizim çalışmamızda up-regülasyondan beklenen DIO2 artışı hipotiroidili sıçanlarda gözlenmemiştir. Bu, mRNA düzeyindeki artışın, protein sentezine yansımadığını veya yıkım süreçlerinin etkili olduğunu göstermektedir.

Se'un hipotiroidili sıçanlardaki olumlu etkisini destekleyecek tarzda olmak üzere, çalışmamızda ilk defa Se uygulanan hipotiroidili sıçanlarda hipokampus dokusunda DIO2 ve DIO3 miktarını artırdığına işaret eden veriler elde edilmiştir. DIO2'nin artışından hipokampus hücreleri içinde T4-T3 dönüşümünün artması; DIO3 artışından ise bu hormonların inaktif formlarına dönüşümünün artması beklenebilir. Tiroid hormonlarının hücre içine transportu enerji bağımlı bir taşıma sürecidir ve hormonların kan düzeyi normal sınırlarda olsa bile, bu taşımanın azalması "hücrel hipotiroidizme" neden olur. T4 transporterlerinin T3 transporterlerine göre çok daha fazla enerji bağımlı oldukları da bildirilmiştir. Bu nedenlerle enerji metabolizması üzerine etkisi iyi bilinen tiroid hormonlarının kan seviyelerindeki düşmelerin, hücre içi hipotiroidizme yol açmaları beklenebilir. Bu nedenle, her ne kadar çalışmamızda hipokampus dokusunda tiroid

hormonlarının düzeyleri ölçülmemiş olsa da biz kandaki düşük hormon seviyelerinin hipokampus doku seviyesinde de oluştuğunu öngörmekteyiz. Eğer hücre içinde azalan T4/T3 konsantrasyonları, bu çalışmada elde edilen davranışsal ve elektrofizyolojik bulguların nedeni ise; hücre içinde azalan T3 konsantrasyonunu artırmak üzere DIO2 enziminin miktarve/ veya etkinliğinin artması T3' seviyesinin bir miktar yükselmesine yardımcı olabileceği düşünülebilir. Ancak çalışma bulgularımız hipotiroidili sıçanlarda böyle bir artışı desteklemezken; Se verilmesi halinde bu artışın meydana geldiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, tiriot hormonlarının, beyin gelişim dönemindeki kadar kritik olmasa da olgunlaşmasını tamamlamış beyin üzerinde de etkilerinin olduğunu düşünmekteyiz. Hipokampus üzerine olan etkilerin oluşmasında değilse de azaltılmasında Se tedavinin yararlı olabileceğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

Akbaraly, T.N., et al., 2007. Plasma selenium over time and cognitive decline in the elderly. Epidemiology. 18, 52-8.

- Alger, B.E., Teyler, T.J., 1976. Long-term and short-term plasticity in the CA1, CA3, and dentate regions of the rat hippocampal slice. *Brain Res.* 110, 463-80.
- Alzoubi, K.H., et al., 2006a. Nicotine reverses adult-onset hypothyroidism-induced impairment of learning and memory: Behavioral and electrophysiological studies. *J Neurosci Res.* 84, 944-53.
- Alzoubi, K.H., et al., 2006b. Nicotine reverses adult-onset hypothyroidism-induced impairment of learning and memory: Behavioral and electrophysiological studies. *Journal of Neuroscience Research.* 84, 944-953.
- Alzoubi, K.H., et al., 2009. Adverse effect of combination of chronic psychosocial stress and high fat diet on hippocampus-dependent memory in rats. *Behav Brain Res.* 204, 117-23.
- Ambrogini, P., et al., 2005. Thyroid hormones affect neurogenesis in the dentate gyrus of adult rat. *Neuroendocrinology.* 81, 244-53.
- Andersen, P., 1977. Long-lasting facilitation of synaptic transmission. *Ciba Found Symp.* 87-108.
- Arthur, J.R., et al., 1990. The effects of selenium depletion and repletion on the metabolism of thyroid hormones in the rat. *J Inorg Biochem.* 39, 101-8.
- Arthur, J.R., et al., 1997. Selenium and iodine deficiencies and selenoprotein function. *Biomed Environ Sci.* 10, 129-35.
- Artis, A.S., et al., 2012a. Experimental hypothyroidism delays field excitatory post-synaptic potentials and disrupts hippocampal long-term potentiation in the dentate gyrus of hippocampal formation and Y-maze performance in adult rats. *J Neuroendocrinol.* 24, 422-33.
- Artis, A.S., et al., 2012b. Experimental Hypothyroidism Delays Field Excitatory Post-Synaptic Potentials and Disrupts Hippocampal Long-term Potentiation in the Dentate Gyrus of Hippocampal Formation and Y-Maze Performance in Adult Rats. *Journal of Neuroendocrinology.* 24, 422-433.
- Beckett, G.J., et al., 1989. Inhibition of type I and type II iodothyronine deiodinase activity in rat liver, kidney and brain produced by selenium deficiency. *Biochem J.* 259, 887-92.
- Bernal, J., 2005. Thyroid hormones and brain development. *Vitamins and Hormones - Advances in Research and Applications*, Vol 71. 71, 95-+.
- Bianco, A.C., et al., 2002. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews.* 23, 38-89.

- Bianco, A.C., Kim, B.W., 2006. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest.* 116, 2571-9.
- Bliss, T.V., Lomo, T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 232, 331-56.
- Bradley, D.J., Towle, H.C., Young, W.S., 3rd, 1992. Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci.* 12, 2288-302.
- Broedel, O., et al., 2003. Effects of hyper- and hypothyroidism on thyroid hormone concentrations in regions of the rat brain. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285, E470-80.
- Buckman, T.D., Sutphin, M.S., Eckhert, C.D., 1993. A comparison of the effects of dietary selenium on selenoprotein expression in rat brain and liver. *Biochim Biophys Acta.* 1163, 176-84.
- Burk, R.F., Hill, K.E., 2009. Selenoprotein P-expression, functions, and roles in mammals. *Biochim Biophys Acta.* 1790, 1441-7.
- Caito, S.W., et al., 2011. Progression of neurodegeneration and morphologic changes in the brains of juvenile mice with selenoprotein P deleted. *Brain Res.* 1398, 1-12.
- Calloni, G.W., et al., 2005. Congenital hypothyroidism alters the phosphorylation of ERK1/2 and p38MAPK in the hippocampus of neonatal rats. *Brain Res Dev Brain Res.* 154, 141-5.
- Carageorgiou, H., et al., 2007. Changes in acetylcholinesterase, Na⁺,K⁺-ATPase, and Mg²⁺-ATPase activities in the frontal cortex and the hippocampus of hyper- and hypothyroid adult rats. *Metabolism.* 56, 1104-10.
- Chanoine, J.P., et al., 1992a. Effects of selenium deficiency on thyroid hormone economy in rats. *Endocrinology.* 131, 1787-92.
- Chanoine, J.P., et al., 1992b. Selenium deficiency and type II 5'-deiodinase regulation in the euthyroid and hypothyroid rat: evidence of a direct effect of thyroxine. *Endocrinology.* 131, 479-84.
- Chen, J., Berry, M.J., 2003. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J Neurochem.* 86, 1-12.
- Cheng, S.Y., Leonard, J.L., Davis, P.J., 2010. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev.* 31, 139-70.

- Constantinou, C., Margarity, M., Valcana, T., 2005. Region-specific effects of hypothyroidism on the relative expression of thyroid hormone receptors in adult rat brain. *Mol Cell Biochem.* 278, 93-100.
- Coulter, D.A., Eid, T., 2012. Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. *Glia.* 60, 1215-26.
- Coultrap, S.J., Bayer, K.U., 2012. CaMKII regulation in information processing and storage. *Trends Neurosci.* 35, 607-18.
- Courtin, F., et al., 2005. Thyroid hormone deiodinases in the central and peripheral nervous system. *Thyroid.* 15, 931-42.
- Croteau, W., et al., 1996. Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues. *J Clin Invest.* 98, 405-17.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 65, 1-105.
- Davenport, J.W., et al., 1976. Environmental stimulation reduces learning deficits in experimental cretinism. *Science.* 191, 578-9.
- Davis, P.J., et al., 2011. Membrane receptor for thyroid hormone: physiologic and pharmacologic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 51, 99-115.
- Desouza, L.A., et al., 2005. Thyroid hormone regulates hippocampal neurogenesis in the adult rat brain. *Mol Cell Neurosci.* 29, 414-26.
- Dringen, R., Hirrlinger, J., 2003. Glutathione pathways in the brain. *Biol Chem.* 384, 505-16.
- Eichenbaum, H., Otto, T., 1993. Ltp and Memory - Can We Enhance the Connection. *Trends in Neurosciences.* 16, 163-164.
- Esfandiari, A., et al., 1992. Induction of type III deiodinase activity in astroglial cells by thyroid hormones. *Endocrinology.* 131, 1682-8.
- Esfandiari, A., et al., 1994. Induction of type III-deiodinase activity in astroglial cells by retinoids. *Glia.* 11, 255-61.
- Farwell, A.P., Tranter, M.P., Leonard, J.L., 1995. Thyroxine-dependent regulation of integrin-laminin interactions in astrocytes. *Endocrinology.* 136, 3909-15.
- Ge, J.F., et al., 2012. Impaired Learning and Memory Performance in a Subclinical Hypothyroidism Rat Model Induced by Hemi-Thyroid Electrocauterisation. *Journal of Neuroendocrinology.* 24, 953-961.
- Gereben, B., et al., 2008. Cellular and Molecular Basis of Deiodinase-Regulated Thyroid Hormone Signaling. *Endocrine Reviews.* 29, 898-938.

- Gerges, N.Z., Alkadhi, K.A., 2004. Hypothyroidism impairs late LTP in CA1 region but not in dentate gyrus of the intact rat hippocampus: MAPK involvement. *Hippocampus*. 14, 40-5.
- Gerges, N.Z., et al., 2004. Adverse effect of the combination of hypothyroidism and chronic psychosocial stress on hippocampus-dependent memory in rats. *Behavioural brain research*. 155, 77-84.
- Gilbert, M.E., Sui, L., 2006a. Dose-dependent reductions in spatial learning and synaptic function in the dentate gyrus of adult rats following developmental thyroid hormone insufficiency. *Brain Res*. 1069, 10-22.
- Gilbert, M.E., Sui, L., 2006b. Dose-dependent reductions in spatial learning and synaptic function in the dentate gyrus of adult rats following developmental thyroid hormone insufficiency. *Brain Research*. 1069, 10-22.
- Guadano-Ferraz, A., et al., 2003. Lack of thyroid hormone receptor $\alpha 1$ is associated with selective alterations in behavior and hippocampal circuits. *Mol Psychiatry*. 8, 30-8.
- Haggerty, J.J., Jr., et al., 1993. Subclinical hypothyroidism: a modifiable risk factor for depression? *Am J Psychiatry*. 150, 508-10.
- Henley, J.M., Wilkinson, K.A., 2013. AMPA receptor trafficking and the mechanisms underlying synaptic plasticity and cognitive aging. *Dialogues Clin Neurosci*. 15, 11-27.
- Hill, K.E., et al., 2004. Neurological dysfunction occurs in mice with targeted deletion of the selenoprotein P gene. *J Nutr*. 134, 157-61.
- Hill, K.E., et al., 2007. The selenium-rich C-terminal domain of mouse selenoprotein P is necessary for the supply of selenium to brain and testis but not for the maintenance of whole body selenium. *J Biol Chem*. 282, 10972-80.
- Hosseini, M., et al., 2010. The Beneficial Effects of Olibanum on Memory Deficit Induced by Hypothyroidism in Adult Rats Tested in Morris Water Maze. *Archives of Pharmacal Research*. 33, 463-468.
- Huang, X., et al., 2004. Redox-active metals, oxidative stress, and Alzheimer's disease pathology. *Ann N Y Acad Sci*. 1012, 153-63.
- Khan, A., et al., 2012. Sex-dependent changes in cerebellar thyroid hormone-dependent gene expression following perinatal exposure to thimerosal in rats. *J Physiol Pharmacol*. 63, 277-83.
- Kilby, M.D., 2003. Thyroid hormones and fetal brain development. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 59, 280-1.

- Lebaron, R.G., et al., 2004. A focal adhesion-like process underlies induction of long-term potentiation in the Schaffer collateral-CA1 region of the hippocampus. *Neuron Glia Biol.* 1, 385-93.
- Lechan, R.M., et al., 1993. Immunocytochemical delineation of thyroid hormone receptor beta 2-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Endocrinology.* 132, 2461-9.
- Lee, P.R., Brady, D., Koenig, J.I., 2003. Thyroid hormone regulation of N-methyl-D-aspartic acid receptor subunit mRNA expression in adult brain. *J Neuroendocrinol.* 15, 87-92.
- LeGrow, A.B., Fielding, D.C., Pressley, T.A., 1999. Stimulation of Na,K-ATPase by hypothyroidism in the thyroid gland. *Journal of Endocrinology.* 160, 453-460.
- Lemkine, G.F., et al., 2005. Adult neural stem cell cycling in vivo requires thyroid hormone and its alpha receptor. *Faseb J.* 19, 863-5.
- Leonard, J.L., et al., 1981. Cerebral cortex responds rapidly to thyroid hormones. *Science.* 214, 571-3.
- Leonard, J.L., et al., 1984. Acute posttranscriptional regulation of cerebrocortical and pituitary iodothyronine 5'-deiodinases by thyroid hormone. *Endocrinology.* 114, 998-1004.
- Leonard, J.L., Larsen, P.R., 1985. Thyroid hormone metabolism in primary cultures of fetal rat brain cells. *Brain Res.* 327, 1-13.
- Leonard, J.L., Siegrist-Kaiser, C.A., Zuckerman, C.J., 1990. Regulation of type II iodothyronine 5'-deiodinase by thyroid hormone. Inhibition of actin polymerization blocks enzyme inactivation in cAMP-stimulated glial cells. *J Biol Chem.* 265, 940-6.
- Lin, J.H., et al., 1998. Functionally related motor neuron pool and muscle sensory afferent subtypes defined by coordinate ETS gene expression. *Cell.* 95, 393-407.
- Losi, G., Garzon, G., Puia, G., 2008. Nongenomic regulation of glutamatergic neurotransmission in hippocampus by thyroid hormones. *Neuroscience.* 151, 155-63.
- Manna, D., Roy, G., Mugesh, G., 2013. Antithyroid drugs and their analogues: synthesis, structure, and mechanism of action. *Acc Chem Res.* 46, 2706-15.
- Meinhold, H., et al., 1993. Effects of selenium and iodine deficiency on type I, type II and type III iodothyronine deiodinases and circulating thyroid hormones in the rat. *Exp Clin Endocrinol.* 101, 87-93.
- Mittag, J., et al., 2010. Thyroid hormones regulate selenoprotein expression and selenium status in mice. *PLoS One.* 5, e12931.

- Montero-Pedrazuela, A., et al., 2006. Modulation of adult hippocampal neurogenesis by thyroid hormones: implications in depressive-like behavior. *Mol Psychiatry*. 11, 361-71.
- Morgado, I., 2005. [The psychobiology of learning and memory: fundamentals and recent advances]. *Rev Neurol*. 40, 289-97.
- Morris, R.G.M., et al., 1986. Selective Impairment of Learning and Blockade of Long-Term Potentiation by an N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonist, Ap5. *Nature*. 319, 774-776.
- Morte, B., et al., 2010. Thyroid hormone-regulated mouse cerebral cortex genes are differentially dependent on the source of the hormone: a study in monocarboxylate transporter-8- and deiodinase-2-deficient mice. *Endocrinology*. 151, 2381-7.
- Moser, E.I., et al., 1998. Impaired spatial learning after saturation of long-term potentiation. *Science*. 281, 2038-2042.
- Osterweil, D., et al., 1992. Cognitive function in non-demented older adults with hypothyroidism. *J Am Geriatr Soc*. 40, 325-35.
- Pallud, S., et al., 1999. Regulation of type 3 iodothyronine deiodinase expression in cultured rat astrocytes: role of the Erk cascade. *Endocrinology*. 140, 2917-23.
- Peeters, R., et al., 2001. Regional physiological adaptation of the central nervous system deiodinases to iodine deficiency. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 281, E54-61.
- Porterfield, S.P., Hendrich, C.E., 1993. The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development--current perspectives. *Endocr Rev*. 14, 94-106.
- Puymirat, J., l'Hereault, S., Dussault, J.H., 1992. Expression of thyroid hormone receptors mRNAs in rat cerebral hemisphere neuronal cultures. *Brain Res Dev Brain Res*. 69, 173-7.
- Qin, F., Ye, Y., Yao, X., 2008. [Effects of nano-selenium on the capability of learning memory and the activity of Se-protein of mice]. *Wei Sheng Yan Jiu*. 37, 502-4.
- Ramaekers, V.T., et al., 1994. Selenium deficiency triggering intractable seizures. *Neuropediatrics*. 25, 217-23.
- Reis, H.J., et al., 2009. Neuro-transmitters in the central nervous system & their implication in learning and memory processes. *Curr Med Chem*. 16, 796-840.
- Richter-Levin, G., et al., 1998. Dissociation between genes activated in long-term potentiation and in spatial learning in the rat. *Neuroscience Letters*. 251, 41-44.
- Rivas, M., Naranjo, J.R., 2007. Thyroid hormones, learning and memory. *Genes Brain Behav*. 6 Suppl 1, 40-4.

- Rudy, J.W., 2009. Context representations, context functions, and the parahippocampal-hippocampal system. *Learn Mem.* 16, 573-85.
- Sala-Roca, J., et al., 2008. Effects of adult dysthyroidism on the morphology of hippocampal neurons. *Behav Brain Res.* 188, 348-54.
- Sanders, J.P., et al., 1997. Characterization of a propylthiouracil-insensitive type I iodothyronine deiodinase. *Endocrinology.* 138, 5153-60.
- Sanhueza, M., Lisman, J., 2013. The CaMKII/NMDAR complex as a molecular memory. *Mol Brain.* 6, 10.
- Santisteban, P., Bernal, J., 2005. Thyroid development and effect on the nervous system. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders.* 6, 217-228.
- Savaskan, N.E., et al., 2003. Selenium deficiency increases susceptibility to glutamate-induced excitotoxicity. *Faseb J.* 17, 112-4.
- Schweizer, U., et al., 2004a. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Res Brain Res Rev.* 45, 164-78.
- Schweizer, U., et al., 2004b. Efficient selenium transfer from mother to offspring in selenoprotein-P-deficient mice enables dose-dependent rescue of phenotypes associated with selenium deficiency. *Biochem J.* 378, 21-6.
- Shukla, P.K., et al., 2010. Prenatal thyroxine treatment disparately affects peripheral and amygdala thyroid hormone levels. *Psychoneuroendocrinology.* 35, 791-7.
- Siegrist-Kaiser, C.A., et al., 1990. Thyroxine-dependent modulation of actin polymerization in cultured astrocytes. A novel, extranuclear action of thyroid hormone. *J Biol Chem.* 265, 5296-302.
- Silva, J.E., et al., 1984. Qualitative and quantitative differences in the pathways of extrathyroidal triiodothyronine generation between euthyroid and hypothyroid rats. *J Clin Invest.* 73, 898-907.
- Smith, J.W., et al., 2002. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. *Neurosci Biobehav Rev.* 26, 45-60.
- Spector, R., 1989. Micronutrient homeostasis in mammalian brain and cerebrospinal fluid. *J Neurochem.* 53, 1667-74.
- Takeda, A., 2004. [Essential trace metals and brain function]. *Yakugaku Zasshi.* 124, 577-85.
- Tang, Y.P., et al., 1999. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature.* 401, 63-69.
- Thompson, C.C., 1996. Thyroid hormone-responsive genes in developing cerebellum include a novel synaptotagmin and a hairless homolog. *J Neurosci.* 16, 7832-40.

- Tong, H., et al., 2007. Age-related learning and memory impairments in adult-onset hypothyroidism in Kunming mice. *Physiol Behav.* 91, 290-8.
- Vadhanavikit, S., Ganther, H.E., 1993. Selenium requirements of rats for normal hepatic and thyroidal 5'-deiodinase (type I) activities. *J Nutr.* 123, 1124-8.
- Valentine, W.M., et al., 2005. Brainstem axonal degeneration in mice with deletion of selenoprotein p. *Toxicol Pathol.* 33, 570-6.
- Valentine, W.M., et al., 2008. Neurodegeneration in mice resulting from loss of functional selenoprotein P or its receptor apolipoprotein E receptor 2. *J Neuropathol Exp Neurol.* 67, 68-77.
- Vallortigara, J., et al., 2009. Thyroid hormone receptor alpha plays an essential role in the normalisation of adult-onset hypothyroidism-related hypoexpression of synaptic plasticity target genes in striatum. *J Neuroendocrinol.* 21, 49-56.
- Venero, C., et al., 2005. Anxiety, memory impairment, and locomotor dysfunction caused by a mutant thyroid hormone receptor alpha1 can be ameliorated by T3 treatment. *Genes Dev.* 19, 2152-63.
- Viguerie, N., Langin, D., 2003. Effect of thyroid hormone on gene expression. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 6, 377-81.
- Wilcoxon, J.S., et al., 2007. Behavioral inhibition and impaired spatial learning and memory in hypothyroid mice lacking thyroid hormone receptor alpha. *Behav Brain Res.* 177, 109-16.
- Yen, P.M., 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* 81, 1097-142.
- Zoeller, R.T., Rovet, J., 2004. Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings. *J Neuroendocrinol.* 16, 809-18.

EKLER