

T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ  
KOORDİNASYON BİRİMİ



**PROJE BAŞLIĞI**

**Tiroid hormonunun, sinaptik plastisitenin davranışsal, moleküler ve elektrofizyolojik göstergeleri üzerine olan non-genomik etkilerinin kanül implante edilmiş yetişkin sıçanlarda incelenmesi**

**Proje No:**  
TOA-2013-4555

Proje Türü  
Öncelikli Alan Projesi

**SONUÇ RAPORU**

**Proje Yürütücüsü:**  
Prof. Dr. Nurcan Dursun  
Tıp Fakültesi Fizyoloji AD

Araştırmacının Adı Soyadı

PROF.DR. HAMİYET ALTUNTAŞ  
YRD.DOÇ.DR. ZUHAL HAMURCU  
Öğr.Gör. EMEL ALAN  
PROF.DR. NARİN LİMAN  
PROF.DR. CEM SÜER  
DOÇ.DR. BÜLENT TUCER

Ocak 2015

KAYSERİ

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

|                                                |     |
|------------------------------------------------|-----|
| İÇİNDEKİLER.....                               | I   |
| ÖZET.....                                      | II  |
| ABSTRACT.....                                  | III |
| TEŞEKKÜR.....                                  | IV  |
| <br>                                           |     |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ.....                          | 1   |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                         | 2   |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                        | 6   |
| 3.1. Uyarı, kayıt ve infüzyon ekipmanları..... | 6   |
| 3.2. Cerrahi işlemler:.....                    | 7   |
| 3.3. Davranış çalışmalarının yapılması.....    | 8   |
| 3.4. Elektrofizyoloji Çalışmaları:.....        | 10  |
| 3.5. Moleküler çalışmalar:.....                | 11  |
| 3.6. Veri analizi ve istatistik:.....          | 12  |
| <br>                                           |     |
| 4. BULGULAR .....                              | 12  |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....                      | 18  |
| 6. KAYNAKLAR .....                             | 20  |

## ÖZET

Yapılan çalışmalar, yetişkin dönemde ortaya çıkan hormon seviyelerindeki azalmaların geçici demansın en önemli nedenlerinden biri olduğunu ve tiroid hastalıklarının öğrenme ve bellek bozuklukları ile olan bağlantısını göstermektedir. Bu çalışmada, L-tiroksinin hipokampüsteki non genomik etki mekanizmasının araştırılması amaçlandı. Projede davranış testleri ve moleküler çalışmalar için 40; elektrofizyolojik çalışmalar için 40 olmak üzere toplam 80 sıçan kullanıldı. Davranış testleri (Y labirent ve Morris su tankı), hipokampüse yerleştirilen kanüllerden infüzyon pompası ile yapay BOS (kontrol), T4 (100pM), T4+TETRAC (3,3',5,5'-Tetraiodothyroacetic acid, 100pM) veya T4+IOP (iopanoic acid, 100pM) 10 µL hacimde 15 dk süreyle verildikten yarım saat sonra yapıldı. Elektrofizyoloji çalışmalar için kullanılan sıçanlarda, anestezi altında, stereotaksik çatı kullanılarak yerleştirilen elektrotlar vasıtasıyla alan potansiyelleri kaydedildi. Uzun dönemli güçlenmenin (UDG) tetiklenmesi sırasında 2R-amino-5- phosphonovaleric acid (APV, 10pM, AMPA reseptör antagonist), Nifedipin (50pM, voltaj bağımlı Ca kanal blokör) T4 (100pM ve 500pM olmak üzere 2 ayrı dozda), T4+TETRAC (100pM) ve T4+IOP infüzyonları yapıldı. Ayrıca infüzyondan sonra hipokampus dokuları çıkartılacak ve MAPK yolağının aktivitesi ile NMDA reseptör alt birimlerinin anlatım düzeyi moleküler çalışmalar ile belirlendi. Çalışma bulguları, intradental T4 infüzyonunun hem davranışın hipokampal bileşenlerini hem de sinaptik plastisitenin göstergelerini (UDG ve MAPK/ERK yolağı) bozduğunu gösterdi. Tiroid hormonunun neden olduğu bozulmaların TETRAC infüze edilen grupta daha az, IOP infüze edilen grupta ise daha bariz görülmesi bu etkilerin tiroid hormonunun genomik olmayan etkilerine bağlı olduğunu gösterdi. Bu bulgular, hipokampusta Tiroid hormonunun aracılık ettiği ve belleğin oluşumunda rol oynayan yeni bir mekanizmanın varlığına işaret etmektedir. Bu yolun, Alzheimer hastalığı başta olma üzere demans ile karakterli olan hastalıkların patogenezindeki katkısının araştırılması için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

## ABSTRACT

Studies showed that the decrease in the thyroid hormone levels in adulthood is the main reason for the temporary dementia and thyroid diseases connection with learning and memory disorders.

In this study was aimed the investigation of the non-genomic action mechanism of L-thyroxine in the hippocampus. We used total 80 animals including 40 rats for cognitive tests and molecular studies, 40 rats for electrophysiological tests. Behavioral tests (Y maze and Morris water tank) were performed that infusion of artificial CSF (control), T4 (pM), T4 + TETRAC (3,3', 5,5' Tetraiodothyroacetic acid, 100 .pM) or T4 + IOP (iopanoic acid, 100 .pM) in 10 µl volume were done by infusion pump which placed in the hippocampus half an hour after being given for 15 minutes .

Rats were anesthetized with urethane, after anesthesia they were placed in a stereotaxic frame. Field potential were recorded from the dentate gyrus granule cells. After electrophysiological studies, hippocampus tissues of rats were removed to examine the expression of several genes such as MAPK, NMDA which known to be associated with learning and memory at the molecular level and RT-PCR analysis was performed.

Study findings showed that intracranial T4 infusion affect negatively hippocampal components of the behavior and also synaptic plasticity indicators such as LTP , MAPK / ERK pathway. The deterioration of thyroid hormone on hippocampus was less developed in TETRAC infused group, but IOP infused group was affected more than TETRAC group. When these results were evaluated, they clearly showed that the deterioration of thyroid hormone on hippocampus is due to the fact that non-genomic effects of thyroid hormone. These results mediated by thyroid hormone in the hippocampus involved in the formation of memory a new indicates the presence of the mechanism. These results were brings to mind a new mechanism in the hippocampus which mediated by thyroid hormone in the hippocampus and involved in the formation of memory . This pathway, especially for Alzheimer's disease

and contribution in the pathogenesis of diseases characterized by dementia should investigate with new studies.

## **TEŞEKKÜR**

Bu proje çalışması Erciyes Üniversitesi BAP Birimi tarafından desteklenmiştir.

## **1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM**

Daha önceki Fizyoloji ABD’da yapılan çalışmalardaki yetişkin tip hipertiroidi sıçan modelinde, hipokampal öğrenme/belek performansının bozulduğu gösterilmiştir. Üstelik bu bozulmaya, öğrenme/belleğin hücrel eş-değeri olan Uzun Dönemli Güçlenme (UDG) yanıtlarında ve bu yanıtların oluşmasından sorumlu olan NMDA reseptör ifadenmesinde azalma eşlik etmiştir. Tiroid hormonunun öğrenme/bellek üzerine olan bu olumsuz etkilerinin moleküler mekanizması ise bilinmemektedir. Tiroid hormonları, hipokampus üzerinde genomik ve non-genomik etkiler gösterirler. Bu projede, tiroid hormonun non-genomik (kısa süreli) etkilerinin hipokampal bozulmadan sorumlu olup olmadığı araştırılmıştır.

Tiroid hormonu dahil pek çok hormonun salgılanmasındaki düzensizlikler, insanlarda yaşam kalitesini etkileyen, geri dönüşümlü olabilen öğrenme/bellek bozukluklarına neden olurlar. Hormon düzensizliklerinin deney hayvanı modellerinde ise öğrenme/bellek bozuklukları daha dramatiktir. Projenin bir gerekçesi, tiroid hormonu üzerinde odaklaşarak, hormonlar ile bellek oluşumu arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktır. Ayrıca yaşlanma sürecinde öğrenme/bellek performansının azalması, pek çok hormonun düzeyindeki azalma ile irtibatlı olabilir. Bu nedenle çalışmamızın ikinci bir gerekçesi, başta Alzheimer hastalığı olmak üzere hipokampüsteki bozulmalara bağlı gelişen demans ile karakterli hastalıkların patogenezinin açıklanması ihtiyacıdır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Tiroid hormonları sinir sisteminin gelişiminde önemli bir rol oynar; hem nöronal hem de glial prekürsör hücrelerin proliferasyon, survival ve farklılaşmasını düzenler (BILLON, 2001; JONES, 2003; PORTERFIELD, 1993). Beyin gelişiminin gerçekleştiği kritik dönemde tiroid hormon eksikliği şiddetli bilişsel ve nörolojik defektlerle karakterli geridönüşümsüz klinik tabloların oluşmasına neden olur (PORTERFIELD, 1993). Hormonun gelişimsel etkileri günümüzde iyi bilinse de, yetişkin beyni üzerine olan etkisi hakkında bilinenler kısıtlıdır. Yetişkin beyni, tiroid hormonunun az ya da çok salgılandığı durumlarda önemli morfolojik defektler göstermese de, bu durumlarda uzamsal öğrenme ve bellek bozukluğuna (BALDINI, 1997; OSTERWEIL, 1992), depresyona (HAGGERTY, 1993) ve Alzheimer hastalığına (TAN, 2008; TAN, 2009) yatkınlığın arttığı bildirilmektedir. Sinir sistemi olgunlaştıktan sonra gelişen tiroid hormon eksikliğinin olumsuz etkileri yeni nöron yapma yeteneğini sürdüren birkaç beyin bölgesinden biri olan hipokampüste ortaya çıkar ve öğrenme ve bellek bozuklukları ile karakterli bu olumsuz etkiler hipokampal nöroenezin bozulması ile ilişkilendirilir (GOULD, 1991; LEZOUALC'H, 1995; MULLER, 1995; SANS, 2000; TOKUMOTO, 2002). Ancak bu bozuklukların tiroksin tedavisi ile geri dönüşümlü olup olmadığı konusunda tartışmalı bulgular vardır (CAPET, 2000; JENSOVSKY, 2002). Yetişkin dönem başlangıçlı hipertiroidizmde ise, bellek bozuklukları ve mekanizmalarını araştıran çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bölümümüz nörofizyoloji çalışma laboratuvarında yetişkin hipotiroidi (ARTIS) ve hipertiroidili (TASKIN) sıçanlarda hipokampus bağımlı öğrenmede ve hipokampal uzun dönemli etkileşimde, dişi sıçanlarda daha belirgin olmak üzere, bozulmalar olduğu gösterilmiştir.

Bellek bilgiyi kazanma (öğrenme), depolama (konsolide etme) ve geri çağırma yeteneği olarak tanımlanabilir. Yaygın kabul gören teorilerden biri, belleğin, bir sinaptik modifikasyon

sürecinin sonucunda beyinde oluştuğudur. Beyindeki sinaptik bağlantılar durağan olmak yerine “ayarlanabilir” ya da “plastik” özellikler gösterir. Sinaptik plastisite sayesinde, belirli nöronal aktivite kalıpları, sinapslarda uzun süre devam eden güçlenmeye neden olur ve bu şekilde değişmiş bağlantıların yeniden aktivasyonu bellek deneyimini oluşturur (BEAR, 1994). Yaygın kabul gören bu teori ancak 1973 yılında, yüksek frekans uyarıma maruz bırakılmış sinapslarda, Uzun-Dönemli Güçlenmenin keşfi ile deneysel olarak gösterilebilmiştir (BLISS, 1973). UDG, glutamerjik hipokampal sinapsların en önemli elektrofizyolojik özelliğidir. Hipokampus, tüm yaşam boyunca hem morfolojik hem de fizyolojik plastisite gösteren yapıların başında gelir (MARTI-CARBONELL, ; SALA-ROCA, 2008). Kemirgenlerde yoğun bir şekilde çalışılan bu limbik sistem yapısı, entorinal korteks ve ilişkili diğer bazı yapılar ile beraber uzamsal bellek ve navigasyondan sorumlu sistemin önemli bir parçası olarak çalışır (TARTAR, 2006).

UDG, protein sentezine bağımlı olmayan bir erken ve protein sentezine bağımlı olan, daha güçlü uyarımlar gerektiren ve daha uzun süre devam eden bir geç dönemden oluşur (KANG, 1996). Erken faz hem presinaptik hem postsinaptik bileşenlerin etkinliğini gerektirir. Çoğu zaman N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör aktivasyonu sonucu postsinaptik hücrede hücre içi kalsiyum (Ca) düzeyinde görülen artış UDG indüklenmesi için kritiktir. Hücre içi Ca seviyesindeki artışı, postsinaptik hücrede başta PKC, PKA, tirozin kinaz ve kalsiyum-kalmodulin kinaz (CamK) olmak üzere bazı kinazların aktivasyonu ile gerçekleşen protein sentezi izler (ARNSTEN, 2005; GOLSKI, 1995; PERKINTON, 2002; SODERLING, 2000). Sayılan moleküler yollar arasında çok sayıda cross-talk olması yanında, her bir sinyal sisteminin aktivitesine ek olarak, fosforillenmiş kinazların ekstrasellüler sinyal ile düzenlenen kinaz (ERK) / mitojen-aktif protein kinaz (MAPK) (OLIVEIRA, 2008) yolağı üzerinde konverje olması, UDG’nin geç döneminin oluşması (konsolidasyonu) için gerekli görülür

(RIBEIRO, 2005). Böylece postsinaptik hücreye Ca iyon girişı ile başlayan moleküler kaskat, MAPK fosforilasyonuna (pMAPK) neden olur. MAPK'ın hipokampal sinapslarda UDG indükleyen uyarılarla aktive olduğu ve MAPK yolu blokerlerinin hem UDG hem de davranışsal belleği bozduğu gösterilmiştir (ATKINS, 1998; DAVIS, 2000; ENGLISH, 1997; WINDER, 1999). UDG indükleyen uyarımlardan bir kaç dk sonra MAPK sitozolden, transkripsiyonel kontrolle gen ekspresyonunu değiştireceği (IMPEY, 1998; XIA, 1996) nukleus içine transloke olur (DAVIS, 2000). Bununla birlikte dentritlerde kalan MAPK'da güçlü bir şekilde fosforillenir (IMPEY, 1998; WINDER, 1999) ve estranükleer substratlarını fosforiller (CHEN, 1998; KIM, 1998; MUTHALIF, 1996). Ayrıca MAPK'ın Morris Su tankında yapılan bir uzamsal işin öğrenilmesinden sonra dorsal hipokampüste aktive olduğu gösterilmiştir (MILLER, 2005). Tüm bu çalışmalar, MAP/ERK yolağının hipokampal sinaptik plastisiteyle gerçekeşen öğrenme/bellek işlevleri için önemli olduğunu göstermektedir.

MAPK/ERK, bir hücre membran reseptörünü hücrenin nükleusundaki DNA ile ilişkilendiren bir hücre-içi proteindir. Bu rolü nedeni ile MAPK/ERK yolağı, yaşlanma ve kanser gelişimi gibi süreçler yanında sinaptik plastisite ile de ilişkilendirilir. En az üç farklı ailesi bulunan MAPKlar, aktive edildikleri zaman, transkripsiyon faktörleri dahil olmak üzere pek çok substrat proteini fosforilleyen serin/treonin kinazlardır (CARGNELLO, 2011). Sinaptik plastisitenin oluşumunda rolü olan önemli hedef transkripsiyon faktörleri ise CREB ve Elk-1(ETS domain protein-1) dir. Transkripsiyon faktörü ya da diziye-özel DNA bağlanma faktörü, DNA'nın belirli bir dizisine (yanıt elementine “response elements”) bağlanarak genetik bilginin DNA'dan mRNA'ya akışını (transkripsiyon, okuma) kontrol eden proteinlerdir. Yanıt elementleri bir genin promotor bölgesi içindeki kısa DNA dizileridir ve

spesifik transkripsiyon faktörlerini bağlayıp gen transkripsiyonunu düzenlerler. Böylece CREB ve Elk-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonu (pCREB ve pElk-1), c-fos ve egr-1 dahil olmak üzere ayrı gen promoterlerindeki yanıt elementlerine bağlanarak hedef proteinlerin ifadenmesine neden olur (DAVIS, 2000). Gen transkripsiyonu sonucu sentezlenen yeni proteinlerin postsinaptik membrandaki sinaps sayısı, yüzeyi ve etkinliğini artırdığı ve sinapslarda uzun süre devam eden etkinlik artışından sorumlu oldukları düşünülür (14).

Yukarıda açıklandığı gibi hem UDG oluşumunda hem de hipokampal testlerdeki performansta önemli rol oynayan MAPK/ERK yolağı tiroid hormonlarının non-genomik etkilerinin de hedefidir. MAPK'lar ekstrasellüler sinyallere yanıt veren ve gen ekspresyonu, mitoz, farklılaşma, proliferasyon ve apoptoz gibi hücresel aktiviteleri düzenleyen serintreonin protein kinazlardır. Tiroid hormonu için plazma membran reseptör bölgesi olarak bilinen integrin  $\alpha V\beta 3$ 'ün kültür ve kanser hücrelerinde MAPK'ın fosforilasyonunu ve nükleer translokasyonunu indüklediği bildirilmektedir (CHENG, 2010; COHEN, 2011; LIN, 1999). Tiroid hormon uygulamasının hipokampüse olan doğrudan etkisi ise çalışılmamıştır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

*Deney hayvanları:* Çalışmada seksen adet yetişkin (2 aylık) Wistar Albino türü erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinden sağlandı ve bakımları bu merkezde yapıldı.

#### 3.1. Uyarı, kayıt ve infüzyon ekipmanları

a. Uyarım ekipmanı: Perforan yolun elektrik akımlar ile uyarılması amacıyla kullanıldı. A/D çeviricisi bulunan bir bilgisayar, uygun yazılımı (SCOPE) vasıtasıyla digital tetik sinyaller çıkartmak üzere programlandı. Bu tetik sinyaller bir stimulus izolatörüne (World Precision Instruments, USA, A385) uygun kablosu vasıtasıyla iletilti. Bu izolatör 0.01–10 mA arasında kare puls şeklinde akım oluşturabilme özelliğindedir. Tetikleme sinyali vasıtasıyla uygulanan tek kare puls akımının süresi 0.175 milisaniye idi. Yüksek frekansı uyarım modeli uygulanırken frekansı 100 Hz ve 1 ms süreli kare puls akımlar tetiklendi. İzolatörün + ve – kutup çıktıları Tungusten elektrota düşük dirençli kablolar vasıtasıyla iletilti.

b. Kayıt ekipmanı: Tungsten kayıt elektrodu ve bir referans elektrot, 0,1–10 kHz band genişliği olan bir headstage vasıtasıyla bir voltaj/akım kısaç yükselteci (Physiologic Instrument VCC600) bağlandı. Yükseltecin çıktısı, A/D çevirece (Powerlab/8SP, ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA) aktarıldı. Biyolojik sinyaller 1000 kez yükseltildi ve 20 ms süreyle 40 kHz hızında örneklendi. Örnekleme tetik sinyalin üretilmesinden 2 ms önce başlayacak şekilde ayarlandı. Her örnekleme süpürümü bilgisayara kayıt edildi ve çevirim-dışı analiz edildi.

c. İnfüzyon ekipmanı: Bu amaçla, proje desteği ile alınan, deri altına yerleştirilebilen, miniozmotik infüzyon pompası kullanıldı. Bu pompa, doldurulabilir bir rezervuara sahip idi. İnfüzyon hızı, bir yazılım vasıtasıyla 15.0 µL/saat olarak ayarlandı

### **3.2. Cerrahi işlemler:**

T4'ün hipokampüs dokusu içerisine belirli doz ve sürede infüzyonunu sağlamak üzere çalışılacak her sıçana (n=40) bir ozmotik mikropompa ve rehber kanül apereyi anestezi altında gerçekleştirilecek bir operasyon ile yerleştirildi. Bu işlem, stereotaksik çatı (David Kopf Instruments, Tujunga, CA) üzerinde yapıldı. Kulak ve ağız çubukları vasıtasıyla, kafatası sabitlendikten sonra saçlı deri tıraşlanacak ve uygun antiseptik solüsyonlar ile temizlendi. Sıçanın kıllı deri ve altı dokuları cerrahi prensiplere uygun olarak orta hat kesisi ile açıldı. Kıllı deri retrakte edilecek, sol ve sağ hemisferler üzerindeki kemik yapı temizlendi ve kanamadan arındırıldı. Daha sonra lambda ve bregmanın aynı düzlemde olmaları “düzlem ayarlama çubuğu” vasıtasıyla sağlandı. Paxinos and Watson (1998) sıçan beyin atlası kullanılarak bulunan koordinatlara, mediyal perforan yol (MPP; bregmaya göre AP: 6.5 mm ve M-L:±3.8 mm) ve dentat girus için (DG; bregmaya göre: A-P 3.0 mm M-L:±2.3 mm), kafatası üzerine 1,5 mm çaplı matkap ucu ve matkap yardımı ile dört delik açıldı. Elektrot lokalizasyonlarının doğrulanması amacıyla, MPP'lar 0,5 mA akım şiddetiyle uyarılacak ve DG'dan tipik elektrofizyolojik kayıt elde edildi. Tipik yanıt elde edilen sıçanlarda açılan deliklerin üstüne gelecek şekilde, 1,0 cm x 0,8 cm x 0,8 cm boyutlarında olan ve yukarıdaki koodinatlara uygun 4 adet 1,5 mm çapında kanalı bulunan bir çatı (B.T. tarafından geliştirilmiştir) kafatası üzerine yerleştirilip etrafı kraniyoplastik semet (DuraLay) ile kapatıldı. Sementin sertleşmesi beklendikten sonra, sıçanın sırt derisinden açılan cerrahi bir kesiden bir mikroinfüzyon pompası deri altına yerleştirildi. Pompa rezervuarı infüze edilecek solüsyon ile dolduruldu ve pompa çıkışı uygun çaptaki bir tubing ile hipokampüs

koordinatlarındaki rehber kanüllerle bağlantılandı. Daha sonra, tubing deri altına gömülerek sırt ve saçlı deri cerrahi olarak dikildi. Tüm cerrahi süreç boyunca, heating pad vasıtasıyla, sıçanların

rektal sıcaklıkları takip edildi ve 37°C'de kalması sağlandı. Cerrahi süreçte oluşan tüm kanamalar diatermi yöntemi ile durduruldu. Kronik kanüllü sıçanların 7 gün boyunca günlük Penisilin-G enjeksiyonları (200,000 IU/ml; 0,2–0,3 ml/rat, im) yapılarak cerrahi iyileşmesi beklendi. Tüm bu işlemlerin yapıldığı 40 sıçan davranış çalışmalarında kullanıldı (kontrol, T4, T4+TETRAC, T4+IOP olmak üzere 4 grup, her grupta 10 hayvan), diğer 40 sıçan ise elektrofizyolojik çalışmalarda kullanıldı (1. grup APV (n=7), 2.grup 100pM T4 (n=6), 3. grup 500pM T4 (n=6), 4.grup Nifedipin (n=7), 5.grupT4+TETRAC, 6.grup T4+IOP verilen)

### **3.3. Davranış çalışmalarının yapılması**

Bu deneylerde 40 sıçan kullanıldı ve intrahipokampal T4 infüzyonunun hipokampal işlevlerle ilgili öğrenme/bellek iş performansına etkisi Y-labirent ve Morris su tankı kullanılarak test edildi. Cerrahi iyileşmeyi takiben 1-2nci günler Y-labirent testi 3-7nci günler Morris su tankı testi, aşağıda açıklandığı gibi yapıldı. Her sıçan davranış denemelerine birer gün ara ile alınacak, grubuna uygun madde (yapay BOS, kontrol, 100 pM T4, 100 pMT4+TETRAC veya 100 pM T4+IOP) 15 µL/saat hızda 1 saat süre ile infüze edildikten yarım saat sonra deneyler yapıldı. TETRAC, T4'ün membran reseptörüne bağlanmasını engellemek; IOP ise T4'ün T3'e hücre içi dönüşümünü engellemek amacı ile verildi. Böylece T4 uygulanan sıçanlarda görülen etkilerin, TETRAC uygulanan grupta oluşmaması ve IOP uygulanan grupta artması beklendi.

Y-Labirent testi: Intrahipokampal infüzyondan 30 dakika sıçanlar, “Y labirente” yerleştirildi. Bu test kemirgenlerin yeni alanları araştırmaya olan doğuştan meraklarına dayanmaktadır.

Test, 30 dakika ara ile yapılan iki denemeden oluştu. İlk denemede rastgele seçilen bir Y kolu kapalı halde iken, sıçan ‘Y’ ubuğuna bırakıldı ve 5 dakika süre labirentte serbestçe bulunmasına izin verildi. İkinci denemede ise kapalı kol, açık durumdayken deneme tekrarlandı. Denemeler arasında sıçan kendi kafesinde bulunduruldu ve labirent %70’lik etanol ile temizlendi. Her iki deneme de tavana yerleştirilmiş bir kamera vasıtasıyla kayda alındı ve Noldus Video İzleme Sistemi vasıtasıyla değerlendirildi. Bu değerlendirmede her kola giriş sayıları ve kollarda geçirilen süre dikkate alındı ve her üç kola da sırasıyla giriş sayısı (alternasyon sayısı) hesaplandı. Alternasyon, sıçanın daha önce hangi kolu ziyaret ettiğini hatırlamasını gerektirdiğinden uzamsal işleyen belleğin bir göstergesi olarak değerlendirildi.

Morris Su Tankı testi: Intrahipokampal infüzyondan 30 dakika sonra sıçanlar, Erciyes Üniversitesi-DEKAM davranış fizyoloji laboratuvarında bulunan Morris Su tankı (130 cm çapında 45 cm yüksekliğinde) yerleştirildi. Su tankı alanının dört çeyreğinden birine sıçanların üzerinde durabilecekleri bir kaçma platformu (apı:10 cm; yüksekliği 22 cm) yerleştirildi ve tank, bu platformun 1 cm üstünde olacak seviyeye kadar su ile dolduruldu. Su mavi ve toksik olmayan bir boya ile boyanacaktır. Platformun yeri, tüm öğrenme denemeleri sırasında sabit tutuldu ve su sıcaklığının 20–22 oC arasında kalmasına dikkat edildi. Her ğrenme denemesi sırasında sıçan, platformun bulunduğu çeyrek alan dışında diğer bir çeyrek alandan etraftaki büyük ipuçlarını görecek şekilde suya bırakıldı. Bu denemelerde öğrenilmesi istenen iş, 2 dakikalık yüzme süre içinde sıçanın platformu bulması ve üzerine çıkarak sudan kurtulmasıdır. Bu süre içerisinde platformu bulamayan sıçanlara el ile yardım edildi ve platformun yerini bulmaları sağlandı. Her sıçana 4 gün boyunca, her gün dört kez (yarım saat ara ile) olmak üzere öğrenme denemeleri yapıldı. Son ğrenme denemesinden (16ncı deneme) 24 saat sonra tanktaki platform yerinden alındı ve aynı test platformsuz halde

iken yapıldı (probe denemesi). Her denemede sıçanların davranışı video-izleme ve analiz sistemi tarafından kayıt edildi, sıçanın platformu bulma süresi, yüzme mesafesi, platformlu alanda geçirdiği süre, yüzme hızı ve her bir çeyrek alanda bulunma süreleri değerlendirildi.

#### **3.4. Elektrofizyoloji Çalışmaları:**

Çalışma grubumuz, yüksek frekanslı uyarım sırasında yapılan T4 infüzyonunun, uzun dönemli güçlenme üzerine olan inhibitör etkisini daha önceki çalışmalarında göstermiştir. Bu çalışmada T4 infüzyonunun dentat girus alan potansiyelleri üzerine olan etkisinin mekanizması araştırıldı. Bu amaçla 40 erkek sıçan (6 grup= 2 grup 6 şar hayvan, 4 grup 7şer) kullanıldı. Dentat girusun tipik alan potansiyeli, “cerrahi işlemler” bölümünde belirtildiği gibi çift kanallı mikroelettrot kullanılarak kayıtlandıktan sonra, perforan yol- dentat girus sinapslarının bazal gücü hakkında bilgi edinebilmek için input/output (IO) ilişkisi belirlendi. Bunun için, perforan yol şiddeti 0,1 mA ile 1,5 mA arasında değişen kare pulslar ile uyarıldı ve kaydedilen alan potansiyellerinin eğim ve genlik değişimi ölçüldü. IO deneyleri sırasında maksimum cevabın yarısını oluşturan uyaran şiddeti (test uyaran) belirlendi. Daha sonra 10 dakika süre ile, her 30 sn’de bir test uyaran şiddeti ile uyarılan dentat girusun bazal alan potansiyelleri kayıt edildi. Bazal kayıttan hemen sonra, 5’er dakika ara ile 100Hz frekansında elektrik uyaran 4 kez verildi. Yüksek frekanslı uyarım sırasında (a) tetiklenen UDG’nin NMDA reseptör bağımlı olup olmadığını belirlemek için bir gruba R-2 amino-5-phosphonopentanoate (APV,10 pM); (b) voltaj bağımlı Ca kanal bağımlı olup olmadığını belirlemek amacıyla Nifedipin (50 pM); (c) T4 bağımlı olup olmadığını belirlemek için T4 (100 pM ve 500 pM olmak üzere 2 ayrı dozda); (d) T4 bağımlı etkinin, membran reseptörü üzerinden olup olmadığının belirlenmesi için T4+TETRAC (100 pM) ve (e) T4’ü T3’e çeviren deiodinaz enzim sistemini inhibe ederek T4 etkisini potansiyalize etmek amacı ile

iopanoic acid (IOP) ile T4 infüzyonları yapıldı. İnfüzyonların bitiminden sonra 60 dakika daha kayıt alınacak ve elektrofizyolojik deneyler sonlandırıldı.

### **3.5. Moleküler çalışmalar:**

Davranış çalışmalarında kullanılan 40 sıçan (kontrol, T4, T4+TETRAC ve T4+IOP grupları, her biri için n=10) stereotaksik cihaza yerleştirildi, kanül ve mikropompa yerlerinden çıkartıldı. Dentat girusun tipik yanıtı bulunduktan sonra, Yüksek frekans ile uyarım sırasında gruba uygun infüzyon yapıldı ve 15 dakika sonra, elektrofizyolojik yanıtı eşlik eden moleküler değişikliklerin belirlenmesi amacıyla bu sıçanlar stereotaksik çatıdan alınarak dekapite edildi. İki taraftaki hipokampus dokusu, bir kaşık yardımı ile beyin dokusundan ayrıldıktan sonra, hipokampus doku örnekleri bir camın üzerinde bistüri yardımıyla mekanik olarak parçalandı. Bu örnek dokular Gen ekspresyonunu belirlemek amacıyla, RNAlater solüsyonu içeren tüplere alınıp -80oC’de bekletildi.

Çalışma gününde, her bir deney grubundaki rat hipokampus dokularından RNA izolasyon kiti kullanılarak total RNA izolasyonu yapıldı. Nükleik asit kaliteleri kontrol edildikten sonra, Real Time PCR Cihazında 1 step qRT-PCR Premiksleri (ve çalışacağımız gen hedeflerine uygun primer çiftleri) ile birlikte örnek RNA’ları kullanılarak amplifikasyon eğrileri elde edildi. Referans kullanılarak elde edilen ‘standart doğru’lara göre örneklerin kopya sayıları (kantitasyonu) belirlendi ve ekspresyon seviyeleri değerlendirildi.

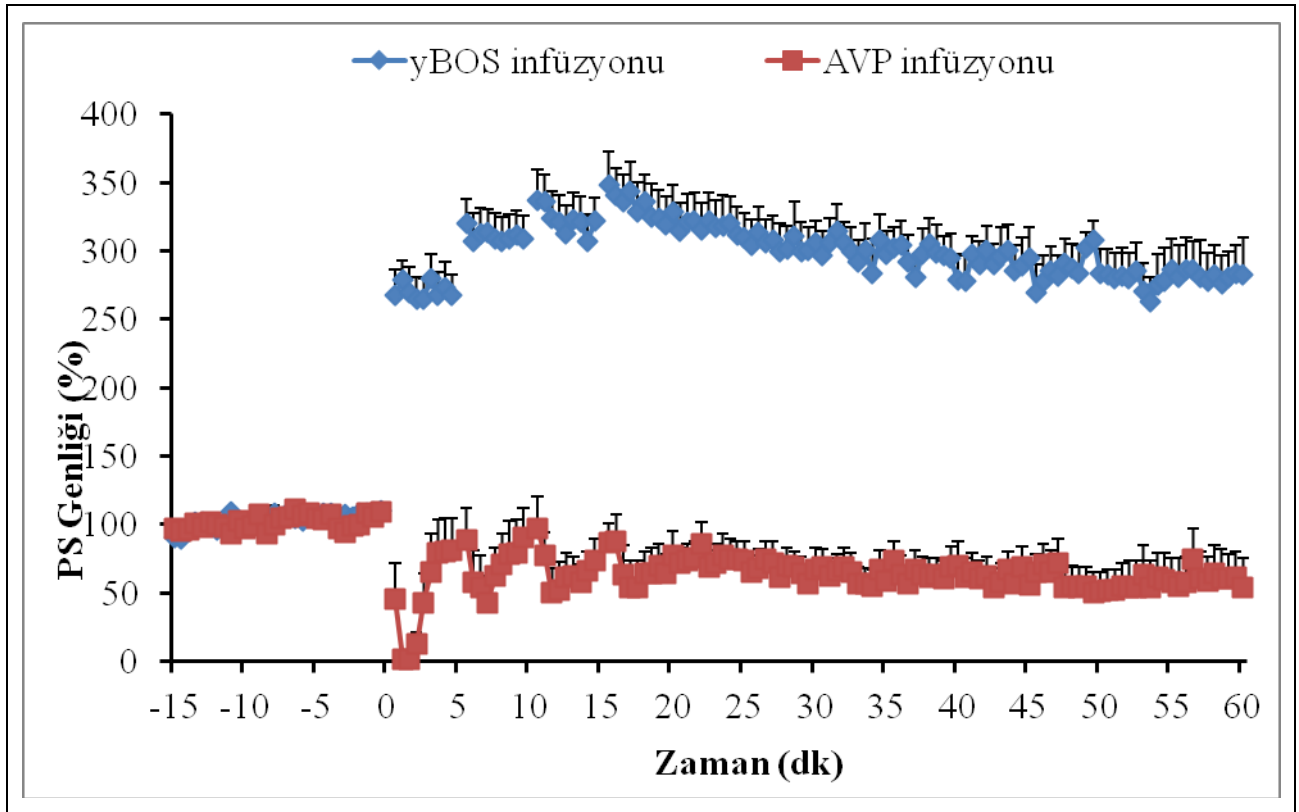
### **3.6. Veri analizi ve istatistik:**

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 kullanıldı. 0.05'den küçük istatistiksel sonuçlar, anlamlı kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

##### 1. Dentat girustan kayıtlanan UDG yanıtları NMDA reseptör bağımlıdır:

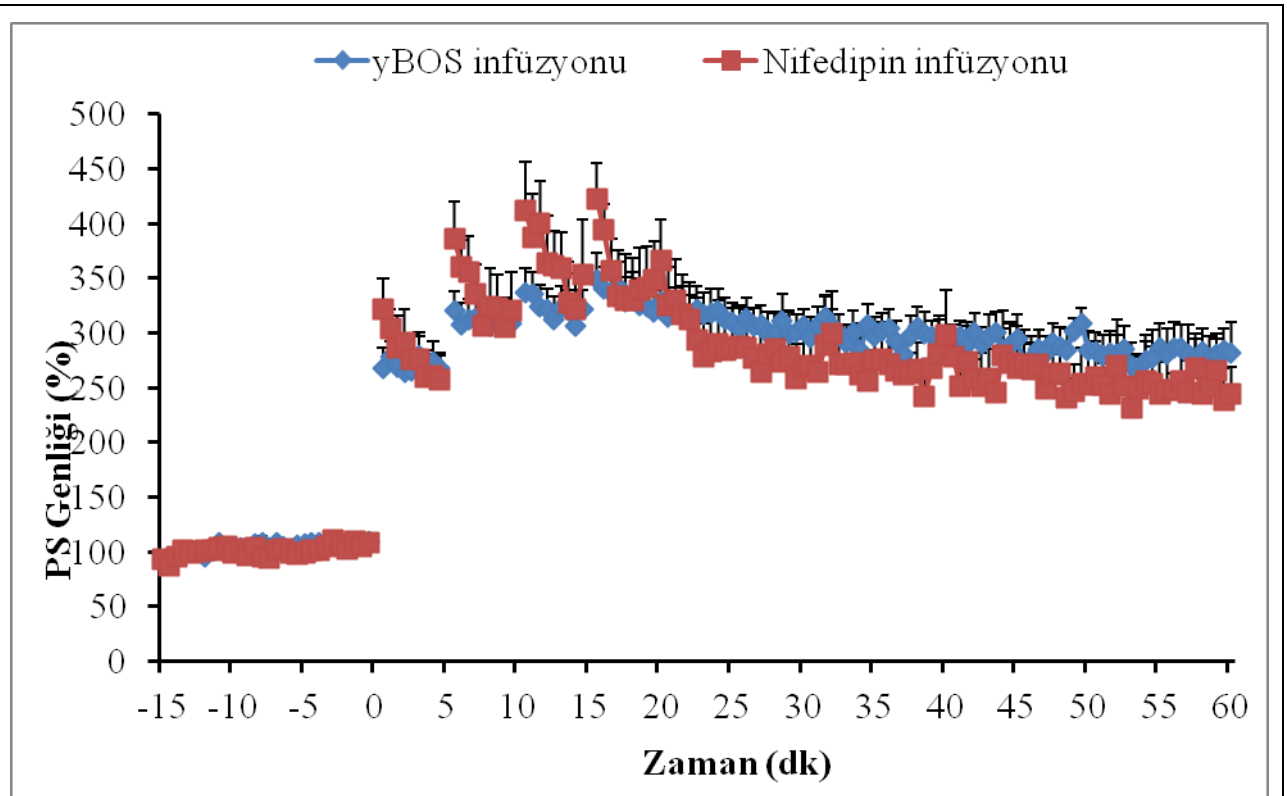
Dentat girustan kayıt edilen UDG yanıtlarının NMDA reseptör bağımlı yanıtlar olup olmadığının gösterilmesi maksadı ile, YFU'ın uygulandığı 15 dakikalık süre içerisinde, çift kanallı bir mikropipet yardımı ile, 100 nM AVP intrahipokampal olarak uygulandı. Bu deneylerin sonucunda, AVP uygulamasının dentat girustan kayıtlanan UDG yanıtlarının indüksiyonunu tam olarak baskıladığı görüldü (Şekil 1).



Şekil 1. Dentat girus UDG kayıtlarının NMDA reseptör antagonisti AVP'ye bağımlılığı.

2. Dentat girustan kayıtlanan UDG yanıtları Voltaj-kapılı kalsiyum kanallarına bağımlı değildir:

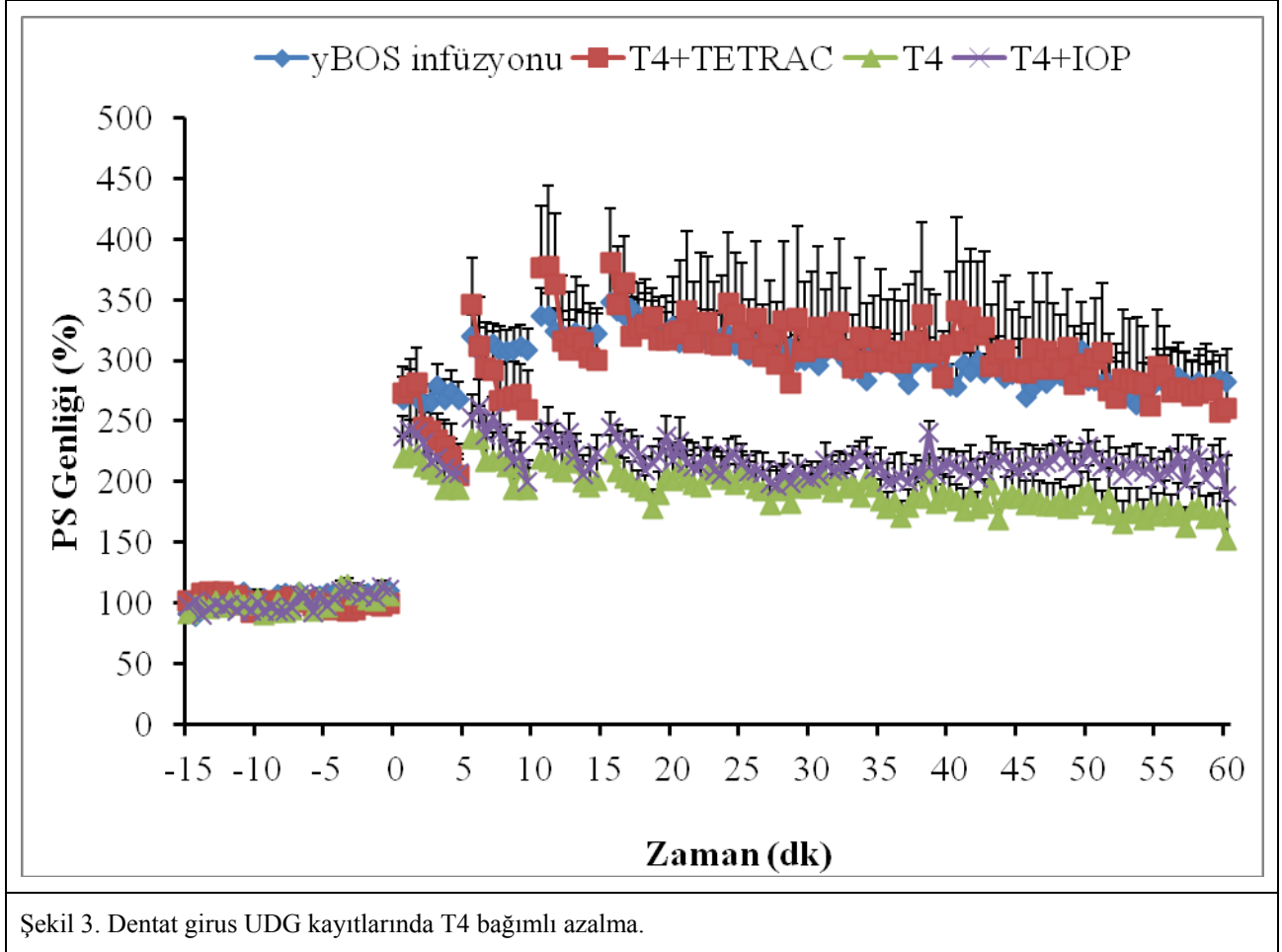
Dentat girustan kayıt edilen UDG yanıtlarının voltaj bağımlı kalsiyum kanallarına bağımlı yanıtlar olup olmadığının gösterilmesi maksadı ile, YFU'ın uygulandığı 15 dakikalık süre içerisinde, çift kanallı bir mikropipet yardımı ile, Nifedipin intrahipokampal olarak uygulandı. Bu deneylerin sonucunda, Nifedipin uygulamasının dentat girustan kayıtlanan UDG yanıtlarının indüksiyonunu değiştirmedeği görüldü (Şekil 2).



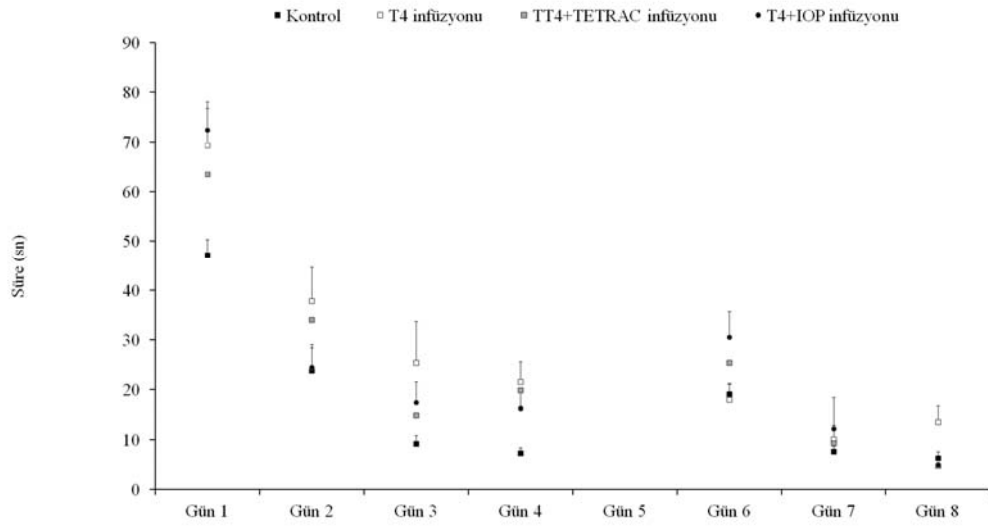
Şekil 2. Dentat girus UDG kayıtlarının voltaj-kapılı Ca kanal inhibitörü nifedipin'e bağımlılığı.

3. T4 infüzyonunun neden olduğu UDG azalması, T4ün membran reseptörüne bağlanmasını engelleyen TETRAC ile birlikte verilmesi halinde engellenirken; T4'ün T3'e çevrilmesini engelleyen IOP verilmesi halinde benzer etki görüldü. YFU uygulaması sırasında T4 infüze edilmesi UDG yanıtlarında belirgin bir azalmaya

neden oldu ( $P < 0.05$ ). Bu azalmanın T4'ün IOP ile beraber infüze edilmesi sırasında da görüldüğü ( $P < 0.05$ ) ama T4'ün TETRAC ile birlikte verilmesi halinde ortadan kalktığı ( $P > 0.05$ ) tespit edildi.

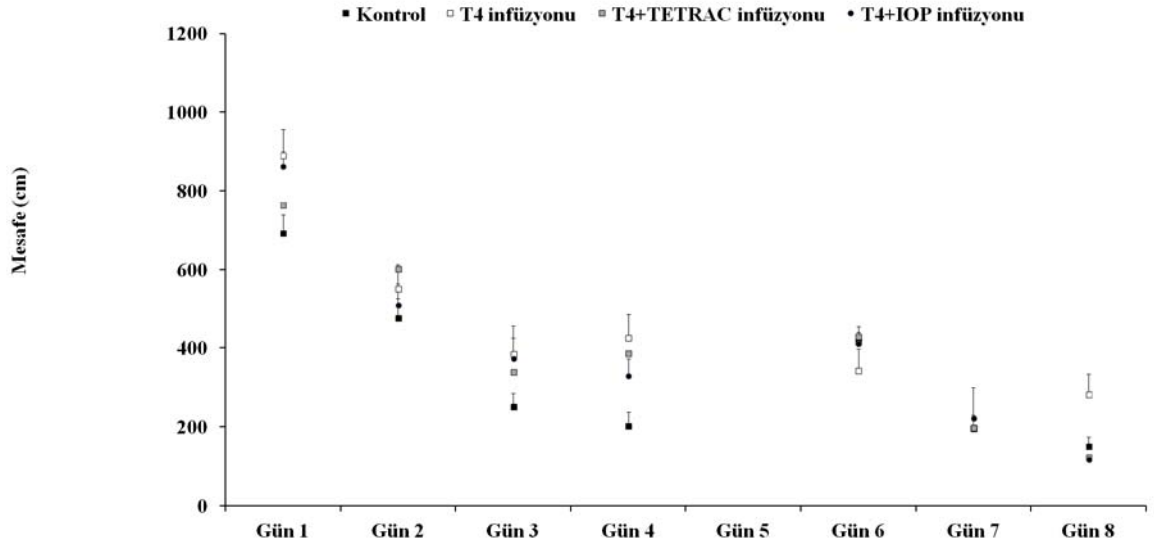


4. T4 infüze edilen sıçanlar, morris su tankında gizlenen platformun yerini, kontrol grubuna göre daha uzun sürede buldular ( $P > 0.05$ ). Platforma kaçış süresinin uzaması, T4 infüzyonunun uzamsal öğrenme performansını bozduğunu gösterdi. Ne TETRAC ne de IOP'un T4 ile birlikte verilmesi, kaçış süresi üzerine genel bir anlamlı etki göstermediyse de; 3ncü ve 8nci günde, kaçış süresinde anlamlı bir azalma saptandı. Tüm sıçanların morris su tankındaki kaçış süresi performanslarının ortalama değerleri Şekil 4'de sunuldu.



Şekil 4. Deney gruplarının morris su tankı öğrenme performanslarının kaçış süresi parametresi açısından deney günlerine göre değişimi.

5. T4 infüze edilen sıçanlar, morris su tankında gizlenen platformun yerini, kontrol grubuna göre daha uzun mesafe yüzerek buldular ( $P > 0.05$ ). Platforma kaçış mesafesinin uzaması, T4 infüzyonunun uzamsal öğrenme performansını bozduğunu gösterdi. Ne TETRAC ne de IOP'un T4 ile birlikte verilmesi, kaçış mesafesi üzerine genel bir anlamlı etki göstermediyse de; 8nci günde, kaçış süresinde anlamlı bir azalma saptandı. Tüm sıçanların morris su tankındaki kaçış mesafesi performanslarının ortalama değerleri Şekil 4'de sunuldu.



Şekil 5. Deney gruplarının morris su tankı öğrenme performanslarının kaçış mesafesi parametresi açısından deney günlerine göre değişimi.

6. Sıçanlara uzamsal öğrenme ve bellek performanslarının diğer bir göstergesi olarak

**Y-Labirent testi**, test ara süreleri 10 dakika (kısa süreli bellek) ve 24 saat (uzun süreli bellek) olacak şekilde uygulanmıştır. Kısa süreli bellek, rastgele seçilen bir Y kolu kapalı halde iken, 5 dakika süre ile labirentte serbestçe bulunmasına izin verilen sıçanın, 10 dakika sonra tüm kollar açık halde iken ikinci kez aynı labirente konması ile test edildi. Uzun süreli belleğin ölçümü için ise, rastgele seçilen bir Y kolu kapalı halde iken, 5 dakika süre ile labirentte serbestçe bulunmasına izin verilen sıçanın, 24 saat sonra tüm kollar açık halde iken ikinci kez aynı labirente konması ile ölçüldü. Her denemede, her kola giriş sayıları ve kollarda geçirilen süre ve her üç kola da sırasıyla giriş sayısı (alternasyon sayısı) hesaplandı; süre ve sayı değerleri toplamın yüzdesi olarak ifade edildi ve alternasyon, uzamsal işleyen belleğin bir göstergesi olarak değerlendirildi. Sonuçlar aşağıdaki tablo 1’de sunuldu. Bu bulgulara göre, intrahipokampal T4 infüzyonu yapılan sıçanların Y labirent testinde uzun dönemli

bellek göstergesi olan alternasyon oranının kontrole göre anlamlı derecede azaldığını ( $P<0.05$ ), T4'ün TETRAC ile verilmesi durumunda kontrol değerlerine ulaştığını ( $P>0.05$ ); IOP ile birlikte verilmesi halinde ise azalmanın devam ettiğini ( $P<0.05$ ) göstermektedir. Bu bulgu çalışma hipotezimizi destekler niteliktedir.

Tablo 1. Deney gruplarının Y-labirent performansları.

|                     | Yeni kolda bulunma süresi (%) (kısa) | Yeni kolda bulunma süresi (%) (uzun) | Yeni kolda bulunma sayısı (%) (kısa) | Yeni kolda bulunma sayısı (%) (uzun) | Alternasyon |
|---------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------|
| Kontrol             | 27,3 ±8,6                            | 24,9 ±10,0                           | 34,4 ±3,1                            | 36,6±4,6                             | 3,0±1,3     |
| T4+IOP infüzyonu    | 25,5±7,9                             | 23±6±8,7                             | 36,9±4,2                             | 36,2±5,6                             | 1,2±1,2     |
| T4 infüzyonu        | 26,3±5,2                             | 27,1±9,4                             | 16,6±3,8                             | 19,4±4,8                             | 0,8±0,4     |
| T4+tetrac infüzyonu | 22,5±8,3                             | 20,2±6,9                             | 30,6±4,4                             | 27,5±5,2                             | 2,8±1,2     |

#### 7. Moleküler çalışma sonuçları:

T4'ün tek başına ve TETRAC veya IOP ile birlikte infüze edildiği sıçanların hipokampuslerinde YFU sonrasında çalışılan genlerin ekspresyon düzeyleri, aynı şartlar altında kontrol grubundan elde edilen hipokampuslerdeki ekspresyona oranlanarak, logaritmik skalada, aşağıdaki tabloda verilmiştir. Bu sonuçlara göre YFU sırasında yapılan T4 infüzyonu P38-MAPK, CREB ve Elk-1 ekspresyonlarında kontrol grubuna göre anlamlı azalmalar gösterirken ( $P <0.05$ ), bu azalma T4'ün IOP ile birlikte verilmesi halinde de görülmüş; fakat T4'ün TETRAV ile verilmesi durumunda ortadan kalkmıştır. Sonuçlar Tablo 2'de sunulmuştur.

Tablo 2. T4'ün tek başına ve TETRAC veya IOP ile birlikte infüze edildiği sıçanların hipokampuslerinde YFU sonrasında çalışılan genlerin ekspresyon düzeyleri, aynı şartlar altında kontrol grubundan elde edilen hipokampuslerdeki ekspresyona göre değişim kat sayıları. Değişim katsayıları, artma ve azalmaları gösterebilmek için Log2 tabanında verilmiştir.

|                     | NR1  | NR2a | NR2b | P38-MAPK | CREB  | Elk-1 | PP1  | c-FOS |
|---------------------|------|------|------|----------|-------|-------|------|-------|
| T4 infüzyonu        | 1,02 | 1.14 | 0.88 | -4.25    | -6.45 | -5.42 | 1.04 | 0.96  |
| T4+IOP infüzyonu    | 1.13 | 1.07 | 0.95 | -3.88    | -5.37 | -3.77 | 1.15 | 1.13  |
| T4+tetrac infüzyonu | 1.08 | 0.95 | 1.04 | 1.03     | 0.95  | 1.11  | 0.98 | 1.21  |

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu projede, tiroid hormonu T4'ün öğrenme ve bellek üzerine olan etkisi, davranışsal, elektrofizyolojik ve moleküler düzeyde çalışılmış ve bu çalışma Erciyes Üniversitesi BAP birimi tarafından “Öncelikli Alan Projesi” kapsamında 119.929,36 TL bütçe ile desteklenmiştir. Proje kapsamında, onaylanan proje önerisinde istenen tüm demirbaş ve sarfların alımı gerçekleştirilmiş, alınan malzemeler deneylerde kullanılmış ve bu harcamalar için toplamda 117.202,76 TL harcanmıştır. Proje çalışmaları, başlama tarihi olan 25.09.2013 tarihinde başlamış, istenen gelişme raporları sunulmuş ve muhtemel bitiş tarihi olan 25.03.2015 tarihinden önce sonuçlandırılmıştır. Proje çalışmalarında Tıbbi Biyoloji, Fizyoloji ve Histoloji Embriyoloji ve Beyin cerrahi anabilim dallarından araştırmacılar yer almış ve çalışmalar çok-disiplinli yapıda gerçekleştirilmiştir.

Proje çalışmalarından elde edilen ve yukarıda verilen bulgular, Tiroksin infüzyonunun hipokampus bağımlı öğrenme sürecini bozduğunu ve bu bozulmanın, öğrenmenin hücresel eş değeri olan UDG yanıtlarındaki bozulma ile desteklendiğini göstermektedir. Bu bulgunun

orijinal nitelikte olduğu, literatür taraması yapıldığında görülebilir. Ayrıca çalışma ekibimiz, UDG'deki bozulmanın, IOP ile değil ama TETRAC ile engellenebileceğini de göstermiştir. Bu bulgu, hormonun hipokampal sinaptik bozulmaya neden olan etkisinin, hormonun nükleer değil ama membran reseptörüne bağlanarak ortaya koyduğunu düşündürmektedir. Öğrenme performansında ne TETRAC'ın ne de IOP'un düzeltici bir etki göstermemesi ise, hipokampal bağımlı işteki bozulmanın beynin diğer bölümleri tarafından kompanze edilebileceğini göstermektedir. Ayrıca çalışmamız, T4'ün etki mekanizmasını açıklayıcı bulgular da ortaya koymaktadır. Bu bulgulara göre T4'ün membran reseptörüne bağlanması MAP kinaz yolunun aktivitesini deprese etmekte bu da UDG'nin gerçekleşmesi için gerekli olan kinaz enzimlerin aktivitesinde azalmaya neden olmaktadır. Sonuç olarak çalışma bulgularımız, öğrenme ve belleğin oluşumunda tiroid hormonu bağımlı non-genomik bir yolağın işlevsel olduğunu göstermektedir.

Araştırma grubumuz, tiroid hormonun etkilerini TUBITAK tarafından desteklenen projeler ile de araştırmaktadır. Bu nedenle, projenin yürütülmesi sırasında elde edilen bulgulardan, hem TUBITAK hem de Üniversitemiz BAP birimi tarafından desteklendiği belirtilerek, "Possible involvement of shifting NR2B subunit to NR2A subunit in impaired hippocampal function induced by 21-day thyroxine treatment" ve "Possible involvement of p38MAPK and PP1 in impaired hippocampal function induced by 21-day propylthiouracil treatment" başlıklı iki çalışma hazırlanmış; bu çalışmalar, 2014 Ekim ayında yılında Berlin'de yapılan European Coll Neuropsychopharmacol (ECNP) kongresinde poster olarak sunulmuştur. Ayrıca bu çalışmalar "geniş özet" olarak European Neuropsychopharmacology dergisinin (beş yıllık etki faktörü: 4.736) ek sayısında yayınlanmıştır. Bulguların tam metin olarak yayınlanması için makale yazımları devam etmektedir.

## **5. KAYNAKLAR**

1. ALARID, E.T., PREISLER-MASHEK, M.T., and SOLODIN, N.M., Thyroid Hormone Is an Inhibitor of Estrogen-Induced Degradation of Estrogen Receptor-Alpha Protein: Estrogen-Dependent Proteolysis Is Not Essential for Receptor Transactivation Function in the Pituitary, *Endocrinology*, 144(8), 3469-76, (2003).
2. ARNSTEN, A.F., RAMOS, B.P., BIRNBAUM, S.G., and TAYLOR, J.R., Protein Kinase a as a Therapeutic Target for Memory Disorders: Rationale and Challenges, *Trends Mol Med*, 11(3), 121-8, (2005).
3. ARTIS, A.S., BITIKTAS, S., TASKIN, E., DOLU, N., LIMAN, N., and SUER, C., 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(3), 422-33.
4. ATKINS, C.M., SELCHER, J.C., PETRAITIS, J.J., TRZASKOS, J.M., and SWEATT, J.D., The Mapk Cascade Is Required for Mammalian Associative Learning, *Nat Neurosci*, 1(7), 602-9, (1998).
5. BALDINI, I.M., VITA, A., MAURI, M.C., AMODEI, V., CARRISI, M., BRAVIN, S., et al., Psychopathological and Cognitive Features in Subclinical Hypothyroidism, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 21(6), 925-35, (1997).
6. BEAR, M.F. and MALENKA, R.C., Synaptic Plasticity: Ltp and Ltd, *Curr Opin Neurobiol*, 4(3), 389-99, (1994).
7. BILLON, N., TOKUMOTO, Y., FORREST, D., and RAFF, M., Role of Thyroid Hormone Receptors in Timing Oligodendrocyte Differentiation, *Dev Biol*, 235(1), 110-20, (2001).
8. BLISS, T.V. and LOMO, T., Long-Lasting Potentiation of Synaptic Transmission in the Dentate Area of the Anaesthetized Rabbit Following Stimulation of the Perforant Path, *J Physiol*, 232(2), 331-56, (1973).
9. BLURTON-JONES, M., KUAN, P.N., and TUSZYNSKI, M.H., Anatomical Evidence for Transsynaptic Influences of Estrogen on Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression, *J Comp Neurol*, 468(3), 347-60, (2004).
10. BODO, C. and RISSMAN, E.F., New Roles for Estrogen Receptor Beta in Behavior and Neuroendocrinology, *Front Neuroendocrinol*, 27(2), 217-32, (2006).
11. CAPET, C., JEGO, A., DENIS, P., NOEL, D., CLERC, I., CORNIER, A.C., et al., [Is Cognitive Change Related to Hypothyroidism Reversible with Replacement Therapy?], *Rev Med Interne*, 21(8), 672-8, (2000).
12. CARGNELLO, M. and ROUX, P.P., Activation and Function of the Mapks and Their Substrates, the Mapk Activated Protein Kinases, *Microbiol Mol Biol Rev*, 75(1), 50-83, (2011).

13. CHEN, H.J., ROJAS-SOTO, M., OGUNI, A., and KENNEDY, M.B., A Synaptic Ras-Gtpase Activating Protein (P135 Syngap) Inhibited by Cam Kinase II, *Neuron*, 20(5), 895-904, (1998).
14. CHENG, S.Y., LEONARD, J.L., and DAVIS, P.J., Molecular Aspects of Thyroid Hormone Actions, *Endocr Rev*, 31(2), 139-70, (2010).
15. COHEN, K., ELLIS, M., KHOURY, S., DAVIS, P.J., HERCBERGS, A., and ASHUR-FABIAN, O., Thyroid Hormone Is a Mapk-Dependent Growth Factor for Human Myeloma Cells Acting Via Alpha $\beta$ 3 Integrin, *Mol Cancer Res*, 9(10), 1385-94, (2011).
16. DAVIS, S., VANHOUTTE, P., PAGES, C., CABOCHE, J., and LAROCHE, S., The Mapk/Erk Cascade Targets Both Elk-1 and Camp Response Element-Binding Protein to Control Long-Term Potentiation-Dependent Gene Expression in the Dentate Gyrus in Vivo, *J Neurosci*, 20(12), 4563-72, (2000).
17. ENGLISH, J.D. and SWEATT, J.D., A Requirement for the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade in Hippocampal Long Term Potentiation, *J Biol Chem*, 272(31), 19103-6, (1997).
18. FURUTA, M. and BRIDGES, R.S., Gestation-Induced Cell Proliferation in the Rat Brain, *Brain Res Dev Brain Res*, 156(1), 61-6, (2005).
19. GERGES, N.Z. and ALKADHI, K.A., Hypothyroidism Impairs Late Ltp in Ca1 Region but Not in Dentate Gyrus of the Intact Rat Hippocampus: Mapk Involvement, *Hippocampus*, 14(1), 40-5, (2004).
20. GOLSKI, S., OLDS, J.L., MISHKIN, M., OLTON, D.S., and ALKON, D.L., Protein Kinase C in the Hippocampus Is Altered by Spatial but Not Cued Discriminations: A Component Task Analysis, *Brain Res*, 676(1), 53-62, (1995).
21. GOULD, E., WOOLLEY, C.S., and MCEWEN, B.S., Naturally Occurring Cell Death in the Developing Dentate Gyrus of the Rat, *J Comp Neurol*, 304(3), 408-18, (1991).
22. HAGGERTY, J.J., JR., STERN, R.A., MASON, G.A., BECKWITH, J., MOREY, C.E., and PRANGE, A.J., JR., Subclinical Hypothyroidism: A Modifiable Risk Factor for Depression?, *Am J Psychiatry*, 150(3), 508- 10, (1993).
23. IMPEY, S., OBRIETAN, K., WONG, S.T., POSER, S., YANO, S., WAYMAN, G., et al., Cross Talk between Erk and Pka Is Required for Ca<sup>2+</sup> Stimulation of Creb-Dependent Transcription and Erk Nuclear Translocation, *Neuron*, 21(4), 869-83, (1998).
24. JENSOVSKY, J., RUZICKA, E., SPACKOVA, N., and HEJDUKOVA, B., Changes of Event Related Potential and Cognitive Processes in Patients with Subclinical Hypothyroidism after Thyroxine Treatment, *Endocr Regul*, 36(3), 115-22, (2002).

25. JONES, S.A., JOLSON, D.M., CUTA, K.K., MARIASH, C.N., and ANDERSON, G.W., Triiodothyronine Is a Survival Factor for Developing Oligodendrocytes, *Mol Cell Endocrinol*, 199(1-2), 49-60, (2003).
26. KANG, H. and SCHUMAN, E.M., A Requirement for Local Protein Synthesis in Neurotrophin-Induced Hippocampal Synaptic Plasticity, *Science*, 273(5280), 1402-6, (1996).
27. KIM, J.H., LIAO, D., LAU, L.F., and HUGANIR, R.L., Syngap: A Synaptic Rasgap That Associates with the Psd-95/Sap90 Protein Family, *Neuron*, 20(4), 683-91, (1998).
28. KUDWA, A.E., MICHPOULOS, V., GATEWOOD, J.D., and RISSMAN, E.F., Roles of Estrogen Receptors Alpha and Beta in Differentiation of Mouse Sexual Behavior, *Neuroscience*, 138(3), 921-8, (2006).
29. LEZOUALC'H, F., SEUGNET, I., MONNIER, A.L., GHYSDAEL, J., BEHR, J.P., and DEMENEIX, B.A., Inhibition of Neurogenic Precursor Proliferation by Antisense Alpha Thyroid Hormone Receptor Oligonucleotides, *J Biol Chem*, 270(20), 12100-8, (1995).
30. LIN, H.Y., DAVIS, F.B., GORDINIER, J.K., MARTINO, L.J., and DAVIS, P.J., Thyroid Hormone Induces Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase in Cultured Cells, *Am J Physiol*, 276(5 Pt 1), C1014-24, (1999).
31. MARTI-CARBONELL, M.A., GARAU, A., SALA-ROCA, J., and BALADA, F., Effects of Adult Dysthyroidism on the Morphology of Hippocampal Granular Cells in Rats, *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 72(3), 230-9.
32. MILLER, D.B. and O'CALLAGHAN, J.P., Aging, Stress and the Hippocampus, *Ageing Res Rev*, 4(2), 123-40, (2005).
33. MULLER, B.M., KISTNER, U., VEH, R.W., CASES-LANGHOFF, C., BECKER, B., GUNDELFINGER, E.D., et al., Molecular Characterization and Spatial Distribution of Sap97, a Novel Presynaptic Protein Homologous to Sap90 and the Drosophila Discs-Large Tumor Suppressor Protein, *J Neurosci*, 15(3 Pt 2), 2354-66, (1995).
34. MUTHALIF, M.M., BENTER, I.F., UDDIN, M.R., and MALIK, K.U., Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase I $\alpha$  Mediates Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase and Cytosolic Phospholipase A<sub>2</sub> in Norepinephrine-Induced Arachidonic Acid Release in Rabbit Aortic Smooth Muscle Cells, *J Biol Chem*, 271(47), 30149-57, (1996).
35. OLIVEIRA, C.S., RIGON, A.P., LEAL, R.B., and ROSSI, F.M., The Activation of Erk1/2 and P38 MitogenActivated Protein Kinases Is Dynamically Regulated in the Developing Rat Visual System, *Int J Dev Neurosci*, 26(3-4), 355-62, (2008).

36. ORIKASA, C., MCEWEN, B.S., HAYASHI, H., SAKUMA, Y., and HAYASHI, S., Estrogen Receptor Alpha, but Not Beta, Is Expressed in the Interneurons of the Hippocampus in Prepubertal Rats: An in Situ Hybridization Study, *Brain Res Dev Brain Res*, 120(2), 245-54, (2000).
37. OSTERWEIL, D., SYNDULKO, K., COHEN, S.N., PETTLER-JENNINGS, P.D., HERSHMAN, J.M., CUMMINGS, J.L., et al., Cognitive Function in Non-Demented Older Adults with Hypothyroidism, *J Am Geriatr Soc*, 40(4), 325-35, (1992).
38. PERKINTON, M.S., IP, J.K., WOOD, G.L., CROSSTHWAITE, A.J., and WILLIAMS, R.J., Phosphatidylinositol 3-Kinase Is a Central Mediator of Nmda Receptor Signalling to Map Kinase (Erk1/2), Akt/Pkb and Creb in Striatal Neurones, *J Neurochem*, 80(2), 239-54, (2002).
39. PORTERFIELD, S.P. and HENDRICH, C.E., The Role of Thyroid Hormones in Prenatal and Neonatal Neurological Development--Current Perspectives, *Endocr Rev*, 14(1), 94-106, (1993).
40. RIBEIRO, M.J., SCHOFIELD, M.G., KEMENES, I., O'SHEA, M., KEMENES, G., and BENJAMIN, P.R., Activation of Mapk Is Necessary for Long-Term Memory Consolidation Following Food-Reward Conditioning, *Learn Mem*, 12(5), 538-45, (2005).
41. SALA-ROCA, J., ESTEBANEZ-PERPINA, E., BALADA, F., GARAU, A., and MARTI-CARBONELL, M.A., Effects of Adult Dysthyroidism on the Morphology of Hippocampal Neurons, *Behav Brain Res*, 188(2), 348-54, (2008).
42. SANS, N., PETRALIA, R.S., WANG, Y.X., BLAHOS, J., 2ND, HELL, J.W., and WENTHOLD, R.J., A Developmental Change in Nmda Receptor-Associated Proteins at Hippocampal Synapses, *J Neurosci*, 20(3), 1260-71, (2000).
43. SCHIMANSKI, L.A. and NGUYEN, P.V., Multidisciplinary Approaches for Investigating the Mechanisms of Hippocampus-Dependent Memory: A Focus on Inbred Mouse Strains, *Neurosci Biobehav Rev*, 28(5), 463-83, (2004).
44. SODERLING, T.R. and DERKACH, V.A., Postsynaptic Protein Phosphorylation and Ltp, *Trends Neurosci*, 23(2), 75-80, (2000).
45. SUTCLIFFE, J.S., Female Rats Are Smarter Than Males: Influence of Test, Oestrogen Receptor Subtypes and Glutamate, *Curr Top Behav Neurosci*, 8, 37-56, (2011).
46. TAN, Z.S., BEISER, A., VASAN, R.S., AU, R., AUERBACH, S., KIEL, D.P., et al., Thyroid Function and the Risk of Alzheimer Disease: The Framingham Study, *Arch Intern Med*, 168(14), 1514-20, (2008).

47. TAN, Z.S. and VASAN, R.S., Thyroid Function and Alzheimer's Disease, *J Alzheimers Dis*, 16(3), 503-7, (2009).
48. TARTAR, J.L., WARD, C.P., MCKENNA, J.T., THAKKAR, M., ARRIGONI, E., MCCARLEY, R.W., et al., Hippocampal Synaptic Plasticity and Spatial Learning Are Impaired in a Rat Model of Sleep Fragmentation, *Eur J Neurosci*, 23(10), 2739-48, (2006).
49. TASKIN, E., ARTIS, A.S., BITIKTAS, S., DOLU, N., LIMAN, N., and SUER, C., Experimentally Induced Hyperthyroidism Disrupts Hippocampal Long-Term Potentiation in Adult Rats, *Neuroendocrinology*, 94(3), 218-27, (2009).
50. TOKUMOTO, Y.M., APPERLY, J.A., GAO, F.B., and RAFF, M.C., Posttranscriptional Regulation of P18 and P27 Cdk Inhibitor Proteins and the Timing of Oligodendrocyte Differentiation, *Dev Biol*, 245(1), 224-34, (2002).
51. WALF, A.A. and FRYE, C.A., Erbeta-Selective Estrogen Receptor Modulators Produce Antianxiety Behavior When Administered Systemically to Ovariectomized Rats, *Neuropsychopharmacology*, 30(9), 1598-609, (2005).
52. WINDER, D.G., MARTIN, K.C., MUZZIO, I.A., ROHRER, D., CHRUSCINSKI, A., KOBILKA, B., et al., Erk Plays a Regulatory Role in Induction of Ltp by Theta Frequency Stimulation and Its Modulation by BetaAdrenergic Receptors, *Neuron*, 24(3), 715-26, (1999).
53. XIA, Z., DUDEK, H., MIRANTI, C.K., and GREENBERG, M.E., Calcium Influx Via the Nmda Receptor Induces Immediate Early Gene Transcription by a Map Kinase/Erk-Dependent Mechanism, *J Neurosci*, 16(17), 5425-36, (1996).
54. XU, X., LIU, Y., SADAMATSU, M., TSUTSUMI, S., AKAIKE, M., USHIJIMA, H., et al., Perinatal Bisphenol a Affects the Behavior and Src-1 Expression of Male Pups but Does Not Influence on the Thyroid Hormone Receptors and Its Responsive Gene, *Neurosci Res*, 58(2), 149-55, (2007).