

Dentat girus içerisine infüze edilen T4'ün uzun dönemli etkinleşme yanıtları üzerine etkisi ve mitojen ile aktive olan protein kinazın rolü*

Dentate gyrus T4 infused into activation response effect of long-term, and mitogen-activated protein kinase role*

Burak Tan¹, Ercan Babur¹, Arzu Dilek Güler², Cem Süer¹, Nurcan Dursun¹

¹Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

²Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri

Burak Tan orcid.org/ 0000-0003-0782-7759

Ercan Babur orcid.org/ 0000-0003-1445-6423

Arzu Dilek Güler orcid.org/ 0000-0002-6118-1787

Cem Süer orcid.org/ 0000-0002-6455-6644

Nurcan Dursun orcid.org/ 0000-0001-7560-216X

Öz

Amaç: Bu çalışmada tiroksin hormonunun uzun dönemli güçlenme (UDG) yanıtları, N-metil-D aspartat (NMDA) reseptörü ve P38-Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz (P38 MAPK) üzerine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışma, 2-4 aylık erkek ve dişi Wistar albino sıçanlar üzerinde yapıldı. Sıçanlar ürethan anestezisi altında stereotaksik çatıya yerleştirildi. Alan potansiyelleri perforan yolun uyarılmasına yanıt olarak dentat girustan kaydedildi. Bazal alan potansiyellerini takiben 15 dk süre ile hipokampüse tiroksin infüzyonu yapıldı. İnfüzyonu takiben 100 Hz frekanslı uyarım 5 dakika ara ile 4 kez uygulandı. Son tetanik uyarımdan 60 dakika sonra sıçanların hipokampüsleri çıkarıldı. Hipokampüs örneklerinden NR1, NR2A, NR2B ve P38 MAPK'a ait gen anlatımlarının incelenmesi gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) yöntemi ile yapıldı.

Bulgular: Yüksek frekanslı uyarım verilmesi esnasında tetiklenen populasyon spike (PS) genliği ve eksitator post sinaptik potansiyel (EPSP) eğiminin, tiroksinin hipokampüse infüze edilmesiyle her iki cinsiyette kontrole göre azaldığı belirlendi. Bununla uyumlu olarak, NR2B ve P38 MAPK düzeyleri için her iki cinsiyette kontrole göre artış olduğu belirlendi.

Sonuç: Çalışma bulguları, tiroksin infüzyonunun sinaptik plastisiteyi inhibe ettiği ve bu inhibisyona NR2B ve P38 MAPK ekspresyonundaki değişimlerin aracılık ettiğine dair kanıtlar sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Tiroksin, uzun dönemli güçlenme, hipokampüs

Abstract

Objective: In the present study, it was aimed to investigate the effect of the L-thyroxine hormone on long-term potentiation (LTP) responses, N-methyl-D aspartate (NMDA) receptor and P38-mitogen-activated protein kinase (P38 MAPK).

Material and Method: The study was performed on 2-4 month old male and female Wistar albino rats. Rats were placed onto stereotaxic roof under anesthesia. Field potentials were recorded in dentate gyrus in response to perforant pathway stimulation. Hippocampal thyroxine infusion was performed for 15 min following basal field potentials. Following infusion, 100 Hz frequency stimulation was applied 4 times with 5 min intervals. After 60 minutes from the last tetanic stimulation, the hippocampus of the rats was removed. Examination of gene expression of NR1, NR2A, NR2B and P38 MAPK from hippocampal samples was performed by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) method.

Results: It has been determined that the population spike (PS) amplitude and the excitatory post synaptic potential (EPSP) triggered during high frequency stimulation are reduced in both sexes by hippocampal infusion of thyroxine.

Conclusion: The findings of the study provide evidence that the infusion of thyroxine inhibits synaptic plasticity and that this inhibition is mediated by changes in NR2B and P38 MAPK expression.

Key words: Thyroxine, long term potentiation, hippocampus

Giriş

Bellek ile ilgili olan süreçlerde rol alan beyin bölgelerinin mediyal temporal lobda bulunduğu özellikle de hipokampal formasyon olduğu, cerrahi olarak bu bölgelerin çıkarılmasıyla görülen amnezik semptomlardan anlaşılmıştır (1). Öğrenme ve belleğin temel hücrel mekanizması olarak kabul edilen yapısal plastisiteden, hipokampal sinapslar sorumludur. Hipokampus ve amigdala gibi temporal lob yapılarındaki lezyonlar yeni belleğin oluşturulmasında derin bozukluklara (anterograd amnezi) ve lezyondan hemen önceki zamana ait geçici bellek kaybına (retrograd amnezi) neden olur (2,3). Bu durumlar yeni bilgilerin depolanmasında bu yapıların kritik role sahip olduklarını göstermektedir.

Hipokampüste bilgi akışı genellikle tek yönlüdür ve trisinaptik devre olarak bilinmektedir (4). Bu devredeki ilk bağlantı entorinal korteks (EK) tabaka-II'den kaynaklanır ve perforan yolak olarak bilinen bir dizi lifler aracılığıyla dentat girus (DG)'a uzanır. Dentat girus hücrelerinin aksonları hipokampüsün CA3 bölgesinde piramidal hücrelerine uzanır. Bu yolak akson demetlerinin miyelinsiz olması nedeniyle benzersizdir ve bu nedenle yosunsu lifler olarak bilinir. Trisinaptik devredeki üçüncü bileşen Schaffer kollateralleri olarak bilinen CA3 bölgesinden CA1 bölgesine olan uzantılardır. CA3-CA1 bağlantısı merkezi sinir sistemi (MSS)'nde en çok çalışılan bağlantıdır ve bilginin çoğu çalışılan bu yolağın gelen sinaptik iletim ve plastisiteye ilişkindir. CA1 daha sonra subikulum bilgileri gönderir ve hem CA1 hem de subikulum lifleri kortikal bilgi döngüsünü tamamlamak üzere EC tabaka-V ve tabaka VI'ya geri döner. Bu nedenle uzun dönemli güçlenme (UDG) kayıtları, perforan yolağın uyarılmasına yanıt olarak DG granül hücre tabakasından kaydedilmektedir (5-7).

Sinaptik plastisite, önceki etkinliğine bağlı olarak sinapsların aktivitesinin değişikliğe uğramasıdır. Bu değişiklik kısa dönemli (saniyeler ya da dakikalar sürer) ya da uzun dönemli (bazı in vivo modellerde saatler hatta günler boyunca sürer) olabilir. Bir sinapsın aktivitesini değiştirme

yeteneğinin, öğrenme ve bellek oluşumunda önemli bir süreç olduğuna inanılmaktadır. Sinaptik plastisitenin en yaygın çalışılan tipi olan UDG 1973'te tanımlanmıştır. Genel olarak, UDG spesifik uyarım paradigmaları uygulanmasını takip eden sinaptik yanıtta sürekli bir artış olarak tanımlanmaktadır. Uzun dönemli güçlenme presinaptik hücreye yüksek frekanslı tetanik bir uyarı uygulayarak indüklendiğinde, hücrelerin spesifik girdilere yanıtlarındaki uzun süreli bir artıştır (8).

Sinirler, sinaptik plastisitesini değiştirerek uzun süreli zaman periyotlarında bilgi depolayabilirler (9). Uzun dönemli güçlenme'nin belirgin zamansal fazlarında farklı hücrel ve moleküler mekanizmalar yatar. Uzun dönemli güçlenme indüksiyonu Ca^{2+} 'un post-sinaptik akışını ve protein kinazların aktivasyonunu gerektirirken, daha sonraki fazlar gen transkripsiyonu ve protein sentezine bağlı uzun süreli değişikliklere bağlıdır (10). İyon kanallarının aktivasyonu; hem reseptör aracılı hem de voltaj ile kontrol edilen iyonların akışına yol açar ve intrasellüler sinyal proteinlerinin fosforile olmasını sağlar ve sonuçta gen ekspresyonunun indüksiyonu mümkün olur (11).

Tiroid hormon seviyesindeki değişiklikler, bilişsel fonksiyonların elektrofizyolojik ve davranışsal göstergelerinde bozulmanın arttığını göstermektedir. Son zamanlarda bu hormonun yetişkinlerde merkezi sinir sistemi üzerine olan etkileri araştırılmakta ve özellikle hipokampal işlevlerdeki rolü aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Tiroksin veya propiltiourasil (PTU)'in kronik uygulandığı deney modellerinde yapılan çalışmalar, tiroit hormon düzeylerindeki değişikliklerin hipokampal öğrenmeyi ve hipokampal elektrofizyolojik yanıtları bozduğunu göstermektedir. Uzun süreli uygulamaların etkisinin yanında hipokampus dokusuna doğrudan uygulanan tiroit hormonunun kısa süreli ve hormon-hücre içi reseptör etkileşimi ile başlatılmayan, non-genomik etkilerinin anlaşılması da önemlidir. Bu konuda oldukça kısıtlı sayıda çalışma vardır (12, 13).

Tiroid hormonları yaşlanmaya veya patolojik etkenlere bağlı gelişen demansların açıklanmasında yeni bir hedef

olabilir. Daha önce yapılan araştırma sonuçları hipertroidili yetişkin sıçanların hipokampal öğrenme ve bellek işlevindeki azalmanın hipokampal elektrofizyolojide ve NMDA reseptör ifadenmesindeki bozulma ile birlikte olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada, tiroksin hormonunun kısa süreli (non-genomik) etkilerinin hipokampal formasyonun dentat girusunda UDG yanıtlarını değiştirip değiştirmediği; eğer değiştiriyor ise bu etkiden sorumlu yolağın Mitojen ile Aktive olan Protein Kinaz (MAPK/ERK) sinyal yolağı olup olmadığının ortaya konulması amaçlanmıştır. Böylelikle tiroksin hormonunun salgılanma bozukluğunun olduğu durumlarda görülen öğrenme ve bellek bozukluklarının mekanizmasının açıklanması hedeflenmiştir. Eğer çalışma bulguları tiroid hormonun NMDA reseptör ekspresyonu üzerine etkisi olduğunu gösterirse, başta Alzheimer hastalığı olmak üzere hipokampüsteki bozulmalara bağlı gelişen demans ile karakterize hastalıkların patogenezinin açıklanmasında yeni yaklaşımların ortaya çıkması mümkün olabilecektir (14).

Gereç ve Yöntem

Deney Hayvanları

Bu çalışmada, 16 erkek 16 dişi olmak üzere 2-4 aylık Wistar albino türü sıçan kullanıldı. Sıçanlar, Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)'nde üretildi. Ağırlıkları 107-194 gr arasında olan sıçanlar, musluk suyu ve standart sıçan yemi ile kısıtlama yapılmaksızın beslendi. Çalışmada gereksiz deney hayvanı kullanılmamak ve deney hayvanlarına acı vermemek için özen gösterildi. Bu çalışma, Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan 13/11 sayılı onay alındıktan sonra gerçekleştirildi.

Elektrofizyoloji

Çalışma kapsamında deneylerde kullanılan sıçanlarda UDG yanıtları, hipokampus DG'de gerçekleştirildi. Bu deneylerde sıçanlar uretan (1,2 g/kg) ile anestezi altına alındı ve stereotaksi çatısına, kulak ve ağız çubukları vasıtasıyla sabitlenerek yerleştirildi. Bregma referans alınarak uyarıcı elektrot anteroposterior (AP):6.5; mediolateral (ML):3.8 mm koordinatlarına, kayıt elektrodu ise AP: 3 mm ML: 2.13 mm koordinatlarına, içi 3 M NaCl ile doldurulmuş iki kanallı cam mikropipet tipik yanıt görülene kadar hipokampüsün içine doğru indirildi. Daha sonra

uyarı elektrodu vasıtasıyla uyarı şiddeti 0.1-1.5 mA şiddeti aralığında değişen uyarılar ile perforan yolak uyarıldı ve kayıt elektrodu aracılığı ile DG granül hücrelerinden alınan yanıtlardan oluşan maksimum şiddetin yarısını oluşturan uyarı şiddeti input/output (girdi/çıkı) deneyleri ile ayarlanarak deneyin bazal kaydı 15 dakika boyunca kaydedildi. Bazal kayıt süresince perforan yolak bu belirlenen uyarı şiddeti ile her 30 saniyede bir uyarılıp DG yanıtları kaydedildi. Bazal kaydın ardından 5'er dakika aralıklar ile 4 defa yüksek frekanslı uyarım (YFU: 1 sn'de 100 Hz frekans) ile UDG indüklendi. Yüksek frekanslı uyarımın indüklenmesi esnasında 15 dk süresince 15 µl hacimde hazırlanan 100 pmol L-tiroksin veya serum fizyolojik (SF) hipokampus dokusuna infüze edildi. Son YFU'yu takiben 60 dakika süresince 30 saniyede bir test uyarımı ile uyarıma devam edildi. Elektrofizyoloji deneylerini takiben sıçanların hipokampusleri izole edildi ve RT-qPCR ile gen ekspresyonlarının tespit edileceği zamana kadar RNA later içerisine konularak -80 oC' de saklandı.

RT-qPCR

NMDA reseptör 1, NMDA reseptör 2A, NMDA reseptör 2B, p38 MAPK genlerine ait gen anlatımlarının incelenmesi RT-qPCR ile hizmet alımı şeklinde yapıldı. İncelenen genlerin, gen bölgelerine ait sekanslar kullanılarak primer seçimleri, NCBI web sayfası üzerinde bulunan program vasıtasıyla yapıldı. Gen ekspresyonunu belirlemek amacıyla, önce her bir deney grubundaki sıçan hipokampus dokularından Exiprep™ Plus Tissue Total RNA Kit (Bioneer, South Korea) kullanılarak total RNA izolasyonu yapıldı. Nükleik asit kaliteleri kontrol edildikten sonra, Accu Power Green Star™ qPCR PreMix (Bioneer, South Korea) (ve çalışmadığımız gen hedeflerine uygun primer çiftleri) ile birlikte örnek RNA'ları kullanılarak amplifikasyon eğrileri elde edildi. Referans kullanılarak elde edilen standart doğrulara göre örneklerin kopya sayıları (kantasyonu) belirlendi ve ekspresyon seviyeleri değerlendirildi.

Veri Analizi ve İstatistik

EPSP dalgasının eğimi, dalganın başlangıcı ve PS dalgasının başlangıcı arasındaki voltaj farkın % 20-80'i olacak şekilde hesaplandı. PS genliği ilk pozitif yükseltiden sonraki negatif yükseltinin başlangıcı ve sonu arasındaki farktan hesaplandı. Başlangıçtaki 15 dakikalık sürede tetiklenen 30 alan potansiyelinin EPSP ve PS' lerinden oluşan orta-

lama eğitim ve genlik değerleri 100 kabul edildi; YFU sonrasındaki her EPSP ve PS bunun yüzdesi cinsinden hesaplandı. Uzun dönemli güçlenme'nin indüksiyonu için YFU sırasında oluşan eğitim ve genliklerin; idame dönemi için ise son YFU'dan deney sonuna kadarlık bölümde oluşan eğitim ve genlik değerlerinin ortalamaları alındı. İstatistiksel karşılaştırmalar için, iki yönlü tek değişkenli ANOVA testi ile tiroksin ve cinsiyet faktörü arasındaki değişimler analiz edildi. Çoklu karşılaştırmalar için tek yönlü ANOVA ve ardından post hoc Tukey testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak seçildi. Tüm istatistiksel analizler SPSS yazılımı (SPSS, Chicago, IL) kullanılarak yapıldı.

Bulgular

Input/Output (Girdi/Çıktı) Eğrilerinin Analizi

Elektriksel uyarımla aktive olan sinaptik plastisite gücünü etkileyen faktörlerden birisi, sinapsın bazal etkinliğidir. Yapılan çalışmada bu bazal etkinlik, yüksek frekanslı uyarımdan önce, 0,1 mA- 1,5 mA arasında değişen şiddete sahip puls'lar uygulanarak elde edilen I/O eğrileri ile incelendi.

Tekrarlayan ölçümler ile ANOVA testi, uyarı şiddeti arttıkça PS genliğinin arttığını ($F_{7,224}=11,77$; $p < 0,001$); tiroksin infüzyonunun ($F_{7,133}=0,27$; $p > 0,05$) bu artışı etkilemediğini ortaya koydu. Bu bulgular, yüksek frekanslı uyarım ile UDG'nin tetiklenmesinden önce perforan yol-dentat girus sinapslarındaki etkinlik gücünün gruplar açısından benzer olduğuna işaret etmektedir. Ancak, anlamlı uyarı şiddeti X cinsiyet etkileşimi ($F_{7,224}=0,16$; $p=0,012$) cinsiyetler arasındaki farklılığın, bazal koşullardaki farklılıklara bağlı olabileceğini göstermektedir.

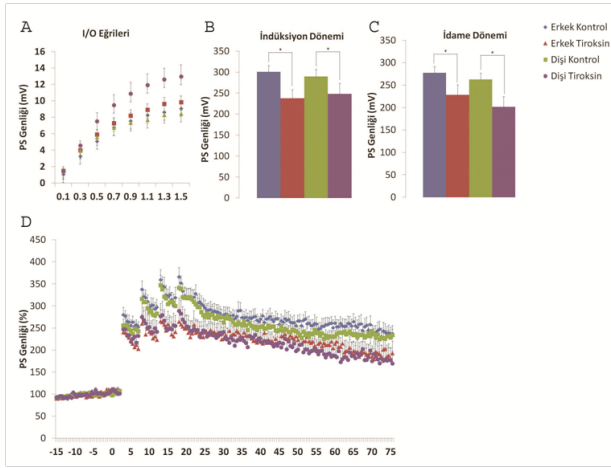
Tekrarlayan ölçümler ile ANOVA testi, uyarı şiddeti arttıkça EPSP eğiminin arttığını ($F_{7,357}=15,66$; $p < 0,001$); tiroksin infüzyonunun ($F_{7,357}=0,44$; $p > 0,001$) ve cinsiyetin ($F_{7,357}=0,60$; $p > 0,001$), bu artışı etkilemediğini ortaya koydu. Bu bulgular, yüksek frekanslı uyarım ile UDG'nin tetiklenmesinden önce perforan yol-dentat girus sinapslarındaki etkinlik gücünün gruplar ve cinsiyetler açısından benzer olduğuna işaret etmektedir.

Uzun Dönemli Güçlenme Yanıtlarının Analizi

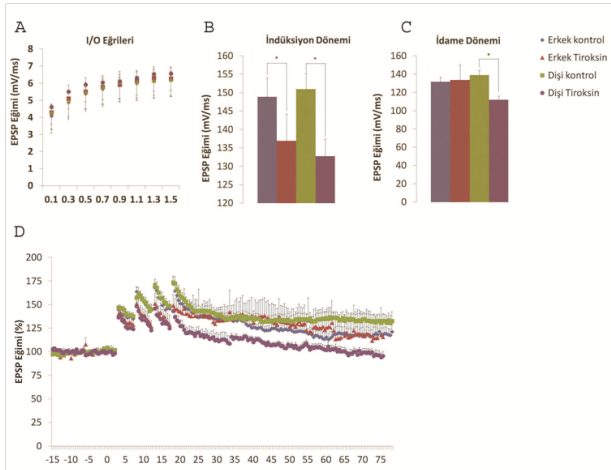
Uzun dönemli güçlenme yanıtları, hem PS genliği hem de EPSP eğimi kullanılarak ölçüldü. İndüksiyon dönemi için, uyarımın verildiği 15 dakikalık dönemdeki potansiyellerin; idame dönemi için ise 15-60'ıncı dakikalar arasındaki potansiyellerin genlik ve eğitim ortalamaları hesaplandı.

İki yönlü tek değişkenli ANOVA testi ile yapılan karşılaştırmalar sonucunda, tiroksin infüzyonunun PS genliğini hem indüksiyon döneminde ($F_{1,54}=6,808$; $p=0,012$) hem de idame döneminde ($F_{1,54}=7,142$ $p=0,010$) anlamlı düzeyde azalttığı, cinsiyetler arasında ise anlamlı farklılık olmadığı bulunmuştur ($p > 0,05$). Tekrarlayan ölçümler ile ANOVA testi, yüksek frekanslı uyarımın PS genliğini, bazal genliğe göre anlamlı şekilde artırdığını ($F_{3,54}=1,36$; $p < 0,001$); bu artışın cinsiyetten etkilenmediğini ($F_{3,54}=1,0$; $p > 0,05$); ancak tiroksin infüzyonundan anlamlı düzeyde etkilendiğini ($F_{3,54}=1,32$; $p < 0,001$) ortaya koydu. Bu bulgular, yüksek frekanslı uyarım verilmesi sırasında tiroksin infüze edilmesinin, PS genliğindeki artışı her iki cinsiyette de azalttığını göstermektedir (Şekil 1).

İki yönlü tek değişkenli ANOVA testi ile yapılan karşılaştırmalar sonucunda, tiroksin infüzyonunun EPSP eğimini indüksiyon döneminde ($F_{1,51}=7,688$; $p=0,008$) anlamlı düzeyde azalttığı, cinsiyetler arasında ise anlamlı farklılık olmadığı bulunmuştur ($p > 0,05$). Tekrarlayan ölçümler ile ANOVA testi, yüksek frekanslı uyarımın EPSP eğimini, bazal genliğe göre anlamlı şekilde artırdığını ($F_{3,53}=0,73$; $p < 0,001$); bu artışın cinsiyetten etkilenmediğini ($F_{3,53}=0,62$; $p > 0,05$); ancak tiroksin infüzyonunun anlamlı düzeyde etkilediğini ($F_{3,54}=0,48$; $p < 0,001$) ortaya koydu. Bu bulgular, yüksek frekanslı uyarım verilmesi sırasında tiroksin infüze edilmesinin tetiklenen EPSP eğimindeki artışı her iki cinsiyette de azalttığını göstermektedir (Şekil 2).



Şekil 1. Populasyon spike (PS) Genlikleri. PS genlikleri tiroksin infüze edilen grupta SF infüze edilen gruba göre hem erkek hem de dişi sıçanlarda indüksiyon ve idame döneminde anlamlı ölçüde azaldı* ($p<0,001$). Bu azalmanın cinsiyet durumundan etkilenmediği gözlemlendi. A: PS genliklerine ait Input/Output eğrileri, B: İndüksiyon dönemine ait PS genlikleri C: İdame dönemine ait PS genlikleri D: Deney süresince kayıtlanan PS genlikleri.



Şekil 2. Eksitator post-sinaptik (EPSP) Eğimleri. EPSP eğimleri tiroksin infüze edilen grupta SF infüze edilen gruba göre hem erkek hem de dişi sıçanlarda indüksiyon döneminde anlamlı ölçüde azaldı* ($p<0,001$). İdame döneminde ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sadece dişi sıçanlarda anlamlı bir farklılık bulundu ($p<0,05$). Tiroksin infüzyonuna bağlı olarak gelişen UDG'deki azalma cinsiyet durumundan etkilenmediği gözlemlendi. A: EPSP eğimlerine ait Input/Output eğrileri, B: İndüksiyon dö-

nemine ait EPSP eğimleri C: İdame dönemine ait EPSP eğimleri D: Deney süresince kayıtlanan EPSP eğimleri

Real Time-qPCR sonuçlarının analizi

Tiroksin infüzyonunun gen ekspresyonuna etkisi

Real time-qPCR deneylerinde elde edilen kontrol grubu ve tiroksin infüze edilen (erkek ve dişi) grubun hipokampuslerine ait NR1, NR2A, NR2B ve P38MAPK'a ait mRNA seviyeleri şekil 3'te gösterilmiştir.

İki yönlü tek değişkenli ANOVA testi kullanılarak, NR2B alt ünitesi ($F_{1,9}=17,271$; $p=0,002$) ve P38 MAPK ($F_{1,9}=16,608$; $p=0,003$) için tiroksin infüzyonunun anlamlı etkisinin olduğunu, cinsiyetin ise etkisinin olmadığını ortaya koydu. Tekrarlayan ölçümler ile ANOVA testi, NR2B alt ünitesinin erkek tiroksin grubunda erkek kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığını ($p=0,006$), dişi tiroksin grubunda ise dişi kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığını ($p=0,040$) ortaya koydu. Tekrarlayan ölçümler ile ANOVA testi, P38 MAPK mRNA düzeyinin erkek tiroksin grubunda erkek kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığını ($p=0,025$), dişi tiroksin grubunda ise dişi kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığını ($p=0,013$) ortaya koydu. Gruplar arası karşılaştırmada NR1 ve NR2A için anlamlı bir değişiklik bulunmadı ($p>0,05$).

Tartışma ve Sonuç

Uzun dönemli güçlenme gibi elektrofizyolojik aktiviteler, öğrenme ve bellek ile ilgili süreçlerin hücresel temelini oluşturduğu bilinmektedir. Kemirici hipokampusünde UDG, uzun süreli belleği oluşturma ve geri çağırma önemli rol oynayan iki nöron arasındaki sinyal geçişini uzun süreli artıran ya da azaltan (sinaptik plastisite) ifade olarak tanımlanmaktadır. Pek çok hormonal sistemin hipokampal sinaptik plastisiteyi modüle ettiği gösterilmiştir. Fakat erişkin hipokampusü üzerine tiroid hormon etkisi yeterince açıklanmamıştır.

Tiroid hormonları nörogenin erken ve geç fazlarında, saatlerden günlere kadar uzayabilen sürede pek çok nöral geni regüle ederler. Bu etkisi kabul edilen genomik etkisidir, fakat bu erişkin beyin fonksiyonları için daha az

önemlidir. Daha önemli olan etkisi tiroid hormonlarının non-genomik etkileridir. Erişkin dönem tiroid hormon hastalıkları orta ya da ağır derecede öğrenme ve bellek fonksiyonlarını ve bu fonksiyonlarla ilişkili olarak UDG'yi bozabilmektedir.

Tiroksin İnfüzyonunun I/O Eğrileri Üzerine Etkileri

Mevcut çalışma bulgularına göre, tiroksin infüze edilen dişi ve erkek sıçanlar, aynı uyarı şiddetine sahip elektriksel uyarana kontrol grubu sıçanlarla benzer PS ve EPSP oluşturdular. EPSP, hepsi aynı anda ve aynı yönde uyarılar alan bütün postsinaptik nöronların geçici depolarizasyonun birbirine eklenen bir yanıtıdır. Çalışmada dişi ve erkek tiroksin infüze edilen hayvanlarda hem PS hem de EPSP I/O eğrilerinin kontrol grubundan farklı bulunmaması, artan tiroid hormon seviyesinin uyarılan hücre popülasyonundaki hücrelerin uyarılabilirliği üzerinde herhangi bir etki göstermediğini ve o popülasyondaki uyarılan hücre sayısını azaltmadığını göstermektedir. Eğer membrandaki depolarizasyon bir aksiyon potansiyeli doğurursa, bu aksiyon potansiyellerinin birikmiş hali PS olarak kaydedilir. Ne kadar çok nöron aksiyon potansiyeli oluşturursa o kadar büyük PS kaydedilmiş olur. Böylece, I/O bulguları, tiroksinin sıçanlarda elektriksel uyarım ile depolarize edilen nöral popülasyonun sayısı üzerine bir etkisi olmadığı şeklindedir.

Tiroksinin UDG Yanıtları Üzerine Olan Etkisi

Mevcut çalışma bulguları tiroksinin, erişkin sıçanlarda DG nöronlarının plastisitesinde değişikliklere yol açan etkisini açıkça ortaya koymaktadır. Literatürde aşırı tiroid hormonunun etkilerini inceleyen elektrofizyolojik çalışmalar bulunmakla birlikte kısıtlıdır. Çalışma bulgularımız, tiroksin verilerek oluşturulmuş deneysel hipertiroidili sıçanlarda UDG yanıtlarının azaldığına işaret eden çalışma bulguları ile benzerlik göstermektedir. Aynı zamanda, bu bulgu hipertiroidili sıçanların ötiroid sıçanlara göre uzamsal görevlerde daha kötü performans sergilediğini gösteren çalışma bulgularını da desteklemektedir (15). Bağlantılı olarak, DG'a uygulanan lokal tiroksin mikroenjeksiyonu ötiroid sıçanlarda ve piropiltiyourasil verilen sıçanlarda mediyal perforan yolun uyarılması ile kaydedilen popülasyon spike genişliğinde hızlı ve uzun süreli azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (16). İlginç bir şekilde, hipotiroidili sıçanlarda I/O ilişkisinin baskılandığı ve UDG'nin bozulduğu (17-19) ortaya konmuştur. Hipotiroidili hayvanlara

uygulanan tiroid hormon tedavisinin bu iki nörofizyolojik anormalliği normale döndürmede başarısız olduğu gösterilmiştir (17). Aynı şekilde bizim bulgularımızda da beklenildiği gibi tiroksinin dentat girus hücrelerinin elektriksel cevaplarını baskıladığı gözlemlendi. Mevcut çalışmada, bozulmuş UDG yanıtlarını açıklayabilecek muhtemel mekanizmalar arasında NR2B-mRNA ekspresyonu gibi NMDA reseptörü alt yapısındaki farklı ekspresyon değişimleri olduğu konusunda görüş birliği vardır (20, 21). NMDA reseptörleri ve alt birimleri hipokampüste farklı şekilde eksprese edilir ve bu reseptörlerin UDG ile olan ilişkileri iyi bir şekilde tanımlanmıştır. Buna ek olarak, tiroksin infüze edilen sıçanların hipokampal P38-MAPK düzeylerindeki artışın, UDG yanıtlarındaki azalmaya aracılık eden hücre içi mekanizmalar arasında yer alabileceği düşünülmektedir. Tiroksin hormonunun MAPK sinyal yolağını aktive ettiğine dair kanıtlar mevcuttur (22). Tiroksin hormonu bu etkisini hücre membran reseptörü olan ve üzerinde tiroid hormonu bağlama bölgesi içeren integrin $\alpha V\beta 3$ reseptörü aracılığı ile gerçekleştirir (23). Integrin $\alpha V\beta 3$ esas olarak makrofajlar ya da fagositoz için dendritik hücreler üzerinde eksprese edilmesine rağmen (24), nöronlarda ve glia hücrelerindeki varlığı, sinaptik plastisitede çok önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (25). Tiroid hormonunun bu reseptöre bağlanması, MAPK sinyal transdüksiyon kaskadının aktivasyonuna yol açar (26). Böylece, bu etkileşim hormonun genomik olmayan, membran tarafından başlatılan bir eylemi olarak sınıflandırılabilir. Birbirine paralel olarak işleyen en az 3 ayrı MAPK sinyal yolağı vardır: ekstrasellüler sinyal ile regüle olan kinaz (ERK), c-Jun amino-terminal kinaz (JNK) ve P38-MAPK yolağı (27). Yüksek kalsiyum seviyelerinin tercihen UDG'ye yol açan ERK sinyal yolağını aktive ettiği konusunda genel bir fikir birliği vardır, oysaki düşük frekanslı uyarım, UDB'yi destekleyen p38-MAPK'ı harekete geçirir. Kas hücrelerinde, P38-MAPK'ın tiroid hormonu ile hızlı bir şekilde fosforile edildiği bildirilmiştir. Bununla uyumlu olarak, mevcut çalışma bulguları doğrultusunda tiroksin hormonunun hipokampüste P38-MAPK'yı aktive edebileceği düşünülmektedir (28-33). Böylece, tiroksin hormonunun lokal etkisi ile sonuçlanan UDG yanıtlarındaki azalmaya P38-MAPK ekspresyonundaki artışın aracılık edebileceği düşünülmektedir.

Elde edilen bu sonuç, gözlemlenen elektrofizyolojik değişikliklerin, sadece artmış tiroksine ve tiroid hormon re-

septörünün azlığına bağlı olamayabileceğini göstermiştir. Tiroid hormon reseptörü immünreaktif hücreler CA2 ve CA3'ün piramidal ve granüler tabakalarında ve dentat girusun ventral kısımlarında belirlenmiştir (34). Tiroid hormon reseptörünün CA3 bölgesinde UDG'yi artırma kabiliyeti biliniyorken sinaptik plastisite üzerine olan önemli etkisi hala bilinmemektedir (35). Glutamaterjik EPSP'lerin NMDA reseptör aracılı bileşenini artırarak CA2 piramidal nöronlarının uyarılabilirliğini düzenlediğinden (36) bu çalışma hipokampal THR nöronlarının bu sürece katılımını desteklemektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma tiroksinin yetişkin sıçanlarda dentat girus nöronlarındaki plastisiteyi inhibe ettiğine ve bu inhibisyona NR2B ve P38 MAPK ekspresyonundaki değişimlerin aracılık ettiğine dair kanıtlar sunmaktadır. Bu bulgular, hipertirodili hastalardaki bilişsel fonksiyon bozukluklarını açıklayabilir.

Kaynaklar

- Herron CE, Lester RA, Coan EJ, et al. Frequency-dependent involvement of NMDA receptors in the hippocampus: a novel synaptic mechanism. *Nature* 1986; 322: 265-8.
- Blitzer RD, Connor JH, Brown GP, et al. Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science* 1998; 280: 1940-3.
- Castro-Alamancos MA, Calcagnotto ME. Presynaptic long-term potentiation in corticothalamic synapses. *J Neuroscience* 1999; 19: 9090-7.
- Andersen P, Bliss TV, Skrede KK. Lamellar organization of hippocampal pathways. *Exp Brain Res* 1971; 13: 222-38.
- McNaughton B. Evidence for two physiologically distinct perforant pathways to the fascia dentata. *Brain Res* 1980; 199: 1-19.
- Bramham CR, Milgram NW, Srebro B. Activation of AP5-sensitive NMDA receptors is not required to induce LTP of synaptic transmission in the lateral perforant path. *Eur J Neurosci* 1991; 3: 1300-8.
- Colino A, Malenka RC. Mechanisms underlying induction of long-term potentiation in rat medial and lateral perforant paths in vitro. *J Neurophysiol* 1993; 69: 1150-9.
- Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973; 232: 331-56.
- Rygh LJ, Tjølsen A, Hole K, et al. Cellular memory in spinal nociceptive circuitry. *Scandinavian journal of psychology* 2002; 43: 153-9.
- Jones M, Errington M, French P, et al. A requirement for the immediate early gene *Zif268* in the expression of late LTP and long-term memories. *Nature neuroscience* 2001; 4: 289-96.
- Pláteník J, Kuramoto N, Yoneda Y. Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life sciences* 2000; 67: 335-64.
- Soderling TR, Derkach VA. Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends in neurosciences* 2000; 23: 75-80.
- Arnsten AFT, Ramos BP, Birnbaum SG, et al. Protein kinase A as a therapeutic target for memory disorders: rationale and challenges. *Trends in molecular medicine* 2005; 11: 121-8.
- Songur A, Özen OA, Sarsılmaz M. Hipokampus. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 2001; 21: 427-31.
- Pavlidis C, Westlind-Danielsson A, Nyborg H, et al. Neonatal hyperthyroidism disrupts hippocampal LTP and spatial learning. *Experimental brain research* 1991; 85: 559-64.
- Colicos MA, Dash PK. Apoptotic morphology of dentate gyrus granule cells following experimental cortical impact injury in rats: possible role in spatial memory deficits. *Brain research* 1996; 739: 120-31.
- Fernández-Lamo I, Montero-Pedrazuela A, Delgado-García JM, et al. Effects of thyroid hormone replacement on associative learning and hippocampal synaptic plasticity in adult hypothyroid rats. *European Journal of Neuroscience* 2009; 30: 679-92.
- Gilbert M, Paczkowski C. Propylthiouracil (PTU)-induced hypothyroidism in the developing rat impairs synaptic transmission and plasticity in the dentate gyrus of the adult hippocampus. *Developmental Brain Research* 2003; 145: 19-29.
- Gilbert M, Sui L. Dose-dependent reductions in spatial learning and synaptic function in the dentate gyrus of adult rats following developmental thyroid hormone insufficiency. *Brain research* 2006; 1069: 10-22.
- Lee PR, Brady D, Koenig JI. Thyroid hormone regulation of N-methyl-D-aspartic acid receptor subunit mRNA expression in adult brain. *Journal of neuroendocrinology* 2003; 15: 87-92.
- MacDonald JF, Jackson MF, Beazely MA. G protein-coupled receptors control NMDARs and metaplasticity in the hippocampus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bio membranes* 2007; 1768: 941-51.
- Barbakadze T, Natsvlishvili N, Mikeladze D. Thyroid hormones differentially regulate phosphorylation of ERK and Akt via integrin $\alpha\beta 3$ receptor in undifferentiated and differentiated PC-12 cells. *Cell biochemistry and function* 2014; 32: 282-6.
- Yonkers MA, Ribera AB. Molecular components underlying nongenomic thyroid hormone signaling in embryonic zebrafish neurons. *Neural development* 2009; 4: 20-32.
- Hermann P, Armant M, Brown E, et al. The vitronectin receptor and its associated CD47 molecule mediates pro-

inflammatory cytokine synthesis in human monocytes by interaction with soluble CD23. *The Journal of cell biology* 1999; 144: 767-75.

25. Wu X, Reddy DS. Integrins as receptor targets for neurological disorders. *Pharmacology & therapeutics* 2012; 134: 68-81.
26. Davis PJ, Davis FB. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Thyroid* 1996; 6: 497-504.
27. Giese KP, Mizuno K. The roles of protein kinases in learning and memory. *Learning & memory* 2013; 20: 540-52.
28. Brown TC, Tran IC, Backos DS, et al. NMDA receptor-dependent activation of the small GTPase Rab5 drives the removal of synaptic AMPA receptors during hippocampal LTD. *Neuron* 2005; 45: 81-94.
29. Gisabella B, Rowan MJ, Anwyl R. Mechanisms underlying the inhibition of long-term potentiation by preconditioning stimulation in the hippocampus in vitro. *Neuroscience* 2003; 121: 297-305.
30. Huang YY, Pittenger C, Kandel ER. A form of long-lasting, learning-related synaptic plasticity in the hippocampus induced by heterosynaptic low-frequency pairing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004; 101: 859-64.
31. Krapivinsky G, Medina I, Krapivinsky L, et al. Syn-GAP-MUPP1-CaMKII synaptic complexes regulate p38 MAP kinase activity and NMDA receptor-dependent synaptic AMPA receptor potentiation. *Neuron* 2004; 43: 563-74.
32. Li S, Tian X, Hartley DM, et al. Distinct roles for Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1) and Ras-GRF2 in the induction of long-term potentiation and long-term depression. *Journal of Neuroscience* 2006; 26: 1721-9.
33. Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, et al. Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* 2002; 110: 443-55.
34. Smith JW, Evans AT, Costall B, et al. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2002; 26: 45-60.
35. Hökfelt T, Tsuruo Y, Ulfhake B, et al. SECTION II. SYNAPTIC ROLE OF TRH: Distribution of TRH-like Immunoreactivity with Special Reference to Coexistence with Other Neuroactive Compounds a. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1989; 553: 76-105.
36. Ishihara K, Katsuki H, Kawabata A, et al. Effects of thyrotropin-releasing hormone and a related analog, CNK-602A, on long-term potentiation in the mossy fiber-CA3 pathway of guinea pig hippocampal slices. *Brain research* 1991; 554: 203-8.