

# Gebeliğin Birinci, İkinci ve Üçüncü Trimesterlerinde Oluşturulan Deneysel Hipotiroidinin Nöral Plastisite ve Öğrenmeye Etkisi

## The Effect of Experimentally Induced Hypothyroidism on Neural Plasticity and Memory at First, Second and Third Trimester of Pregnancy

Dr. Emir DÖNDER,<sup>a</sup>  
Dr. Yusuf ÖZKAN,<sup>a,b</sup>  
Dr. Said DAĞ,<sup>a</sup>  
Dr. Gıyaseddin BAYDAŞ<sup>c</sup>

<sup>a</sup>İç Hastalıkları AD,  
<sup>b</sup>Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları BD,  
<sup>c</sup>Fizyoloji AD,  
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elazığ

Geliş Tarihi/Received: 10.06.2009  
Kabul Tarihi/Accepted: 03.01.2010

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Dr. Yusuf ÖZKAN  
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
İç Hastalıkları AD,  
Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları BD, Elazığ,  
TÜRKİYE/TURKEY  
dryusufozkan@hotmail.com

**ÖZET Amaç:** Tiroid hormonu (TH) santral sinir sistemi (SSS) gelişimi için çok önemlidir. Beyin gelişiminin kritik dönemlerinde, TH yokluğu, glial hücrelerin ve nöronların olgunlaşmasını geciktirir. Çalışmalar sinir hücresi adezyon moleküllerinin (NCAM) beyin gelişimi ve sinaptik plastisitede önemli görevleri olduğunu göstermiştir. TH eksikliğinde adezyon moleküllerinin sentez ve salınımında anormallikler olduğu bildirilmektedir. Glial fibriller asidik protein (GFAP)'in astrosit olgunlaşmasında önemli bir belirteç olduğu belirtilmiştir. GFAP seviyesi astrosit olgunlaşmasındaki kusurlarda azalmaktadır. Bu çalışmada gebeliğin birinci, ikinci ve üçüncü trimesterlerde oluşturulan deneysel hipotiroidinin nöral plastisite ve öğrenmeye olan etkisinin araştırılması amaçlandı. **Gereç ve Yöntemler:** Çalışmada birinci, ikinci ve üçüncü trimesterlerde deneysel hipotiroidi oluşturulan sıçanlardan on beş adet yavru sıçan ve kontrol grubu olarak da on beş yavru sıçan alınarak toplam altmış yavru sıçan kullanıldı. Böylece dört grup oluşturuldu. Öğrenme için sıçanlarda yaygın olarak kullanılan Morris Water Maze testi kullanıldı. NCAM ve GFAP düzeyleri ise Western Blot yöntemi ile ölçüldü. **Bulgular:** Her dört grupta öğrenme yeteneği birinci günden beşinci güne doğru giderek arttı. Bu artış kontrol grubu ve birinci trimester hipotiroidi grubunda ikinci ve üçüncü trimester hipotiroidi gruplarına göre daha belirgindi. Annelerinde maternal dönemde hipotiroidi oluşturulan yavru sıçanların erişkin dönemde hipokampuslarında GFAP ve NCAM düzeylerinde kontrol ve birinci trimester hipotiroidi gruplarına göre ikinci ve üçüncü trimester hipotiroidi gruplarında belirgin bir azalma tespit edildi. **Sonuç:** Bu çalışma, ikinci ve üçüncü trimesterlerinde hipotiroidi oluşturulan anne sıçanların yavrularında öğrenme yeteneğinin azaldığını ve hipokampuslarında GFAP ve NCAM düzeylerinin düştüğünü göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Nöral hücre yapışma molekülleri; glial fibriller astrositik protein, fare; hafıza; öğrenme; hipotiroidizm

**ABSTRACT Objective:** Thyroid hormone (TH) is very important for central nervous system (CNS) development. In critical periods of central nervous system development, TH deficiency delays retardation of glial cells and neurons maturation. Studies demonstrated that cell adhesion molecules (NCAM) have important roles on development of brain and synaptic plasticity. It was reported that TH deficiency causes abnormalities in synthesis and release of adhesion molecules. It was shown that glial fibrillar acidic protein (GFAP) was an important marker of astrocyte maturation. GFAP level decreases in astrocyte maturation defects. In this study, we investigated the effect of experimentally induced hypothyroidism at the first, second, and third trimester of pregnancy on neural plasticity and learning. **Material and Methods:** In our study; 15 infant Wistar Albino rats were taken from mothers in which experimentally induced hypothyroidism at the first, second, and third trimester of pregnancy. Fifteen infant rats were taken for the control group, totally 60 infant rats were used. Four groups were constituted in total. As learning test, widely used, the Morris Water Maze test was used. The levels of NCAM and GFAP were studied by the Western Blot method. **Results:** Learning ability was increased gradually from the first to fifth day in four groups. This increase was more significant in control and first trimester hypothyroidism group when compared to second and third trimester hypothyroidism groups. We determined decrease in GFAP levels and all of NCAM isoforms of offspring hippocampus when they become adult in second and third trimester hypothyroid groups when compared to the control and first trimester hypothyroid groups. **Conclusion:** Our study demonstrated that experimentally induced hypothyroidism at the second and third trimester of pregnancy caused decrease in infant rats' learning ability and NCAM and GFAP levels at hippocampus.

**Key Words:** Neural cell adhesion molecules; glial fibrillary astrocytic protein, mouse; memory; learning; hypothyroidism

**T**iroid hormonu (TH: Triiyodotironin-T3 ve Tiroksin-T4) santral sinir sisteminin gelişiminde çok önemli bir rol oynamaktadır.<sup>1-4</sup> Ciddi TH eksikliği insanlarda kretinizm adı verilen mental retardasyon ve nörolojik gelişim geriliği ile seyreden bir hastalığa sebep olmaktadır.<sup>5</sup> Beyin gelişiminin kritik dönemlerinde TH yokluğu glial hücrelerin ve nöronların maturasyonunda gecikmeye, dentritik çıkıntılarının anormal dağılımına, sinaptik dansitenin azalmasına, miyelinizasyon defektine ve olfaktor bulbus ve hipokampusda hücrelerin sayı olarak azalmasına neden olmaktadır.<sup>6</sup> TH eksikliği beyinde serebellar granül hücrelerinin migrasyonunda gecikmeye, purkinje hücrelerinin lokalizasyonunda ve dallanmasında azalmaya ve serebral korteksin normal laminasyonunda değişikliklere neden olmaktadır.<sup>1,7,8</sup>

Santral sinir sistemi'ndeki (SSS) hücre adezyonunda görev alan iki önemli molekülün ekspresyonundaki değişiklikler son zamanlarda yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bunlar sinir hücre adezyon molekülü (neural cell adhesion molecule-NCAM) ve tenascin-C'dir.<sup>9,10</sup> Bu proteinler nöronal migrasyonda çok önemli görevler almaktadırlar<sup>11</sup>. NCAM'ın, beyin gelişimi ve sinaptik plastisite esnasında beyin dokusu gelişimini düzenlediği belirtilmektedir.<sup>12-14</sup>

Glial fibriller asidik protein (GFAP), olgun astrositlerin major intermediyer filaman proteinidir. GFAP ekspresyonunun başlaması astrosit farklılaşmasındaki anahtar olaylardan biridir.<sup>15</sup> Olgunlaşmamış astrositler başlangıçta vimentin salgırlarken, olgun astrositler GFAP salgırlar.<sup>16</sup> Bundan dolayı GFAP astrosit olgunlaşma belirteci olarak tanımlanır.<sup>17</sup> Nöronal-gliyal etkileşimde GFAP'ın rol oynadığı bilinmektedir. Buna bağlı olarak GFAP düzeyindeki değişiklikler nöron-nöron ve nöron-glia arasındaki bağlantının bozulması ile sonuçlanabilmektedir.<sup>15</sup>

Hipokampus, başta öğrenme ve bellek olmak üzere zihinsel süreçlere çok önemli bir şekilde katılır ve yüksek düzeyde işlevsel ve yapısal plastisite gösterir.<sup>18</sup> Plastisite, sinir hücrelerinin içinde buldukları patolojik duruma göre kendilerini yeniden ayarlamaları anlamına gelmektedir. Hipokampus, doğum sonrası ve yetişkin hipotiroidizmine seçici

bir hassasiyet sergilemektedir. Sinaptik etkinliğe bağlı olarak gen ekspresyonu düzenlemesinin yetişkin hipotroid sıçanların hipokampusunda değişiklik oluşturduğu belirtilmiştir.<sup>19</sup>

Bu çalışmada gebelik trimesterlerinde oluşturulan deneysel hipotiroidinin nöral plastisite ve öğrenme üzerindeki etkileri ve konjenital hipotiroidinin yavru sıçanların beyinlerinde erişkin dönemde GFAP ve NCAM proteinlerinin ekspresyonu üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### DENEY HAYVANLARI

Bu çalışma için önce, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurul Başkanlığı'ndan izin alındı (Etik Kurul onay no:05 ve tarihi:14.06.2005): çalışma yapılırken hayvan hakları korundu. Çalışmada, ağırlıkları 210-250 gram arasında değişen, 120-150 günlük anne sıçanlardan her grup için beşer erişkin Wistar Albino cinsi dişi sıçan kullanıldı. Bu sıçanlar, havalandırma sistemine sahip bir ortamda özel olarak hazırlanmış ve her gün altları temizlenen kafeslere yerleştirilerek yem fabrikasında özel olarak üretilen pelletler halindeki sıçan yemleriyle beslendi. Deney hayvanlarının buldukları ortamın sıcaklığı 22-25 °C arasında sabit tutuldu ve hayvanlar on iki saat ışık altında ve on iki saat karanlıkta takip edildi.

Çalışmada hipotiroidi oluşturulacak üç grup için beşer adet ve kontrol grubu için de beş adet olmak üzere toplam yirmi adet dişi sıçan seçildi. Anne adayları sıçanlar, iki siklus boyunca vajinal smear ile takip edildi. Ovulatuvar siklusları belirlendi. Siklus bozukluğu göstermeyen ratlar, ovulasyon zamanları tespit edilerek çiftleştirildi. Vajinal smearde sperm saptanan sıçanların gebe olacakları kabul edildi.<sup>20</sup> Sıçanların normal gebelik süreleri ortalama üç hafta olduğundan her bir trimester yedi gün olarak kabul edildi. Gebeliğin birinci gününde sıçanlar kontrol ve hipotiroidi oluşturulacak üç grup olmak üzere toplam dört gruba ayrıldı.

1. Grup = Kontrol grubu.

2. Grup = Hipotiroidi oluşturulan gruplar.

a. Gebeliğin birinci trimesterinde hipotiroidi oluşturulacak grup.

b. Gebeliğin ikinci trimesterinde hipotiroidi oluşturulacak grup.

c. Gebeliğin üçüncü trimesterinde hipotiroidi oluşturulacak grup.

2a grubuna gebeliğin birinci trimesteri boyunca, 2b grubuna gebeliğin ikinci trimesteri boyunca, 2c grubuna gebeliğin üçüncü trimesterinden doğuma kadar olmak üzere her gruba yedi gün antitiroid tedavi verildi ve kontrol grubu tedavisiz takip edildi.

Hipotiroidi oluşturmak için, annelerin içme sularına 10 mg/kg/gün dozunda propylthiouracil (PTU; Sigma, P 3755) katıldı.<sup>21</sup> Kontrol grubuna sadece sıçan yemi ve normal çeşme suyu verildi.

Çalışma için annelerinde birinci, ikinci ve üçüncü trimesterlerde hipotiroidi oluşturulan yavru sıçanlardan rastgele on beşer adet ve kontrol grubu için de on beş yavru sıçan alınarak toplam dört grup oluşturuldu. Sıçanlar doğumlarından iki buçuk ay sonrasına kadar beslendiler. Bu süre sonunda tüm gruplara Morris Water Maze öğrenme testi uygulandı.

Bu test sıçan ve farelerde yaygın olarak kullanılan bir öğrenme ve bellek testidir<sup>22</sup>. Morris'in su tankı, sirküler bir tank olup, 120 cm çapında galvanizli ve 50 cm yüksekliğindedir. Su tankı 25 cm kadar su ile dolduruldu ve tankın içi siyah renkte boyandı. Suyun 2 cm altına bırakılan 10x10 cm'lik platformun görünmesi engellendi. Suyun ısısı 24±2 C derecede sabit tutuldu. Su günlük değiştirildi. Tankın yerleştirildiği konum ve platformun yeri deney süresince sabit tutuldu. Deneklerin, bulunduğu yerin uzaysal konumunu algılayabilmeleri için görsel bir işaret tank dışına yerleştirildi (visual cues).

Su tankı sanal olarak 4 kısma ayrıldı ve platform bu kadrantlardan birinin ortasına yerleştirildi. Rat diğer 1/4 oranındaki alanlardan birine bırakıldı ve yüzerek 60 sn. içinde platformu bulması beklendi. Platformu bulunca 30 sn. orada dinlenmesine izin verildi, sonra alınıp ayrı bir kafeste 30 sn. bekletildi. Tekrar su tankına bırakılarak aynı işlem her hayvan için dört kez tekrarlanıp platformu bulma süreleri her rat için ayrı ayrı kaydedildi. Altmış sn içinde platformu bulamayan rat alınıp platforma bırakıldı

ve 30 sn dinlenmesine izin verildi. Her hayvan için beş gün süreyle aynı denemeler yapıp süreler kaydedildi.

Belleğin pekiştirilme işlemini test etmek için, beş günlük testten 24 saat sonra probe testi yapıldı. Bu testte, platform tanktan alındı ve denekler yüzdürüldü. Deneklerin doğal olarak platformun önceden bulunduğu tankın dörtte birlik kısmında daha çok arama yapması beklenir. Bu süre belleğin pekiştirilmesini ölçer. Deneklerin eski platformun bulunduğu dörtte birlik alanda yüzdükleri süre kaydedildi.

DeneySEL uygulamalar sonrasında etik kurulun aldığı kararlara uygun olarak dekapite edilen sıçanların total beyinleri alındı, hacimleri belirlendi ve beynin hipokampus bölgesi ayrılarak kuru buzda hemen donduruldu. Örnekler darası alınmış olan eppendorf tüplere aktarıldı. Ağırlıkları hassas terazide tartılarak belirlendi ve analizler yapılmaya kadar -70 °C'de muhafazaya alındı.

Eppendorf tüpleri içinde -60 °C'de bekletilen serumlar oda ısısında çözündürüldü. İmmulite 2000 marka ticari kitler kullanılarak İmmulite 2000 cihazında chemiluminescence yöntemiyle her üç grubun tiroid fonksiyonlarını değerlendirmek için sT3, sT4, TT3 ve TT4 düzeyleri ölçüldü.

Hipokampus örneklerinin (GFAP ve NCAM için) Western Blot Analizi, Baydaş ve ark. tarafından uygulanan metoda göre yapıldı.<sup>23</sup>

### İstatistik

Elde edilen veriler SPSS-12 bilgisayar programında analiz edildi. İstatistiksel analizlerde; biyokimyasal ölçümler ve Western Blot Optik Dansite sonuçlarının değerlendirilmesinde varyans analizi kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uyup uymadığının belirlenmesinde Kolmogorov Smirnov testi kullanıldı ve verilerin normal dağılıma uygun olmadığı gözlemlendi (p<0.05). Kontrol ve hipotiroidi gruplarının tiroid hormon düzeyleri, vücut ağırlığı ve total beyin ağırlığının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Ardışık olarak ölçülen öğrenme testlerinin karşılaştırılmasında Friedman iki yönlü varyans analizi kullanıldı. Grupların ikili karşılaştırılmasında Wilcoxon testi kullanıldı. P<0.05 değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

**TABLO 1:** Çalışma gruplarındaki anne sıçanların tiroid hormon düzeyleri.

		Kontrol	Hipotiroidi	Mann-Whitney U testi
		Ortalama ± Std.sapma (Min-Maks.)	Ortalama ± Std.sapma (Min-Maks.)	p
Birinci trimester	sT3	2.8 ± 0.44 (2.40-3.25)	1.18 ± 0.18 (1.00-1.36)	0.05
	sT4	1.92 ± 0.11 (1.80-2.15)	0.85 ± 0.11 (0.70-0.99)	0.01
	TT3	105.13 ± 10.78 (90-130)	69.63 ± 5.14 (62.60-75.00)	0.01
	TT4	3.04 ± 0.87 (2.10-4.00)	1.81 ± 0.18 (1.60-2.00)	0.01
İkinci trimester	sT3	3.32 ± 0.79 (2.50-4.15)	1.13 ± 0.15 (0.96-1.36)	0.01
	sT4	1.91 ± 0.13 (1.86-2.10)	0.91 ± 0.04 (0.86-0.95)	0.01
	TT3	84.4 ± 8.65 (72.15-93.00)	57.23 ± 4.37 (53.20-62.40)	0.01
	TT4	3.13 ± 0.65 (2.50-3.90)	2.44 ± 0.47 (1.90-3.00)	0.05
Üçüncü trimester	sT3	2.63 ± 0.48 (2.20-3.20)	1.47 ± 0.25 (1.20-1.70)	0.05
	sT4	2.98 ± 0.35 (2.50-3.35)	0.86 ± 0.14 (0.70-1.00)	0.001
	TT3	87.5 ± 9.82 (76.10-100.00)	59.85 ± 4.41 (55.62-65.10)	0.01
	TT4	4.7 ± 0.52 (4.20-5.20)	2.98 ± 0.23 (2.70-3.20)	0.01

Kontrol grubuna göre normal aralıklar; serbest T3:1.5-4.7 pg/ml, serbest T4:0.9-1.7 ng/ml, Total T3:84-172 ng/dl, Total T4:4.5-12.5 µg/dl.

## BULGULAR

Hipotiroidi gruplarındaki anne sıçanların tiroid fonksiyon testlerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu tespit edildi ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 1).

Deneysel hipotiroidi oluşturulan gruplardaki yavru sıçanların ortalama vücut ağırlıkları kontrol grubundaki yavru sıçanlara göre daha fazlaydı ( $p < 0.05$ ). Deney hayvanlarının ortalama vücut ve total beyin ağırlıkları Tablo 2’de görülmektedir.

### Morris Water Maze öğrenme testinin sonuçları

Her dört grupta öğrenme yeteneğinin birinci günden beşinci güne doğru giderek arttığı gözlemlendi, ancak bu artış, kontrol grubu ve birinci trimester hipotiroidi grubunda ikinci ve üçüncü trimester hipotiroidi gruplarına göre daha belirgindi. İlk gün kontrol grubundan bir ve ikinci trimester hipotiroidi grubundan iki sıçan platformu bulamadı.

Gruplar arası platform bulma sürelerinde anlamlılık ilk olarak üçüncü günde gözlemlendi. Beşinci günde ortalama platform bulma sürelerinin kontrol ve birinci trimester hipotiroidi gruplarında ikinci ve üçüncü trimester hipotiroidi gruplarına göre oldukça kısa olduğu gözlemlendi. Sürenin kısa olması öğrenmenin daha iyi olduğu anlamına gelmektedir. Morris Water Maze öğrenme testinin sonuçları Şekil 1’de görülmektedir.

**TABLO 2:** Kontrol ve deneysel hipotiroidi oluşturulan grupların vücut ve total beyin ağırlıkları.

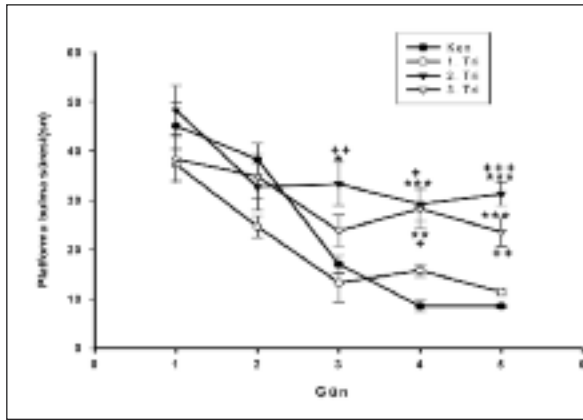
Gruplar	Vücut ağırlığı (g)	Total beyin ağırlığı (g)
Kontrol	190±15.4	1.861±0.18
Birinci Trimester Hipotiroidi	224.7±12.3	1.876±0.17
İkinci Trimester Hipotiroidi	212.5±14.3	1.886±0.16
Üçüncü Trimester Hipotiroidi	222±16.8	1.963±0.18

### Her dört grubun probe testindeki performansları

Probe testi belleğin pekiştirilmesini test eden bir deneydir. Bu testle daha önce platformun bulunduğu alanda deneğin geçirdiği süre ölçülmektedir. Öğrenmenin pekiştirilmesini ölçen probe testi sonuçlarına göre, kontrol ve birinci trimester hipotiroidi gruplarıyla ikinci ve üçüncü trimester hipotiroidi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptandı (Şekil 2).

### Her dört gruptaki sıçanların hipokampus dokusunda GFAP düzeyleri

Kontrol grubuna göre ikinci ve üçüncü trimester hipotiroidi grupları arasında istatistiksel olarak belirgin bir fark vardı ( $p < 0.001$ ). Birinci trimester hipotiroidi grubuyla ikinci ve üçüncü trimester hipotiroidi grupları arasında istatistiksel olarak belirgin bir fark vardı ( $p < 0.001$ ). İkinci ve üçüncü trimester hipotiroidi gruplarının hipokampuslarında GFAP düzeyi belirgin olarak azalmıştı. Şekil 3’te hipokampusta GFAP düzeyleri görülmektedir.



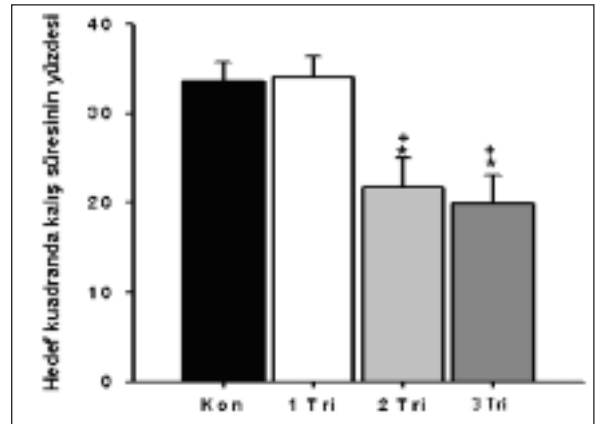
**ŞEKİL 1:** Water Maze Testi: Her dört gruptaki sıçanların günlere göre ortalama platform bulma süreleri: Ortalama saniye olarak; üçüncü günde birinci trimester hipotiroidi grubunun ikinci trimester hipotiroidi grubuna göre  $++p<0.01$  ve kontrol grubunun ikinci trimester hipotiroidi grubuna göre  $*p<0.05$ , beşinci günde birinci trimester hipotiroidi grubunun ikinci trimester hipotiroidi grubuna göre  $+++p<0.001$  ve üçüncü trimester hipotiroidi grubuna göre  $++p<0.01$ , kontrol grubunun ikinci trimester hipotiroidi grubuna göre  $**p<0.001$  ve üçüncü trimester hipotiroidi grubuna göre  $***p<0.001$  anlamlı olduğu gözlemlendi.

### Hipokampusta NCAM düzeyleri

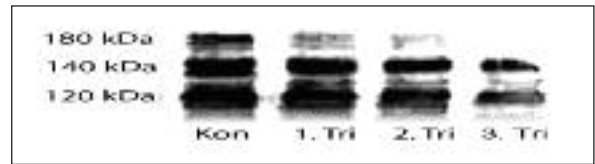
Kontrol grubu ile kıyaslandığında her üç hipotiroidi grubunda da NCAM izoformlarının (NCAM120, NCAM140, NCAM180) azalmış olduğu görüldü. Kontrol grubu ile birinci trimester hipotiroidi gruplarının NCAM120 ve NCAM140 değerleri arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark yokken, NCAM180, birinci trimester hipotiroidi grubunda belirgin olarak azalmıştır. İkinci ve üçüncü trimester hipotiroidi gruplarında her üç NCAM izoformu birinci trimester hipotiroidi grubuna göre azalmıştır. Yine üçüncü trimester hipotiroidi grubunda NCAM'ın her üç izoformunda ikinci trimester hipotiroidi grubuna göre istatistiki olarak anlamlı bir azalma vardı. Şekil 4'te bütün gruplardaki sıçanların hipokampus dokusunda Western Blot yöntemi ile NCAM molekülünün alt izoformlarının ölçümü görülmektedir.

## TARTIŞMA

Bu çalışmada sıçanlarda gebeliğin ikinci ve üçüncü trimesterinde hipotiroidiye maruz kaldıklarında yavru sıçan gruplarının öğrenmelerinin kontrol grubuna ve birinci trimesterde hipotiroidiye maruz kalan gruba göre daha düşük olduğu tespit edildi. Ayrıca astrosit olgunlaşmasının bir belirteci olan GFAP düzeylerinin ve plastisitede önemli rolü bu-



**ŞEKİL 2:** Her dört grubun probe testinde eski platform alanında kalma oranları: Kontrol grubu ile ikinci ve üçüncü trimester hipotiroidi grupları arasında  $*p<0.05$ , birinci trimester hipotiroidi grubu ile ikinci ve üçüncü trimester hipotiroidi grupları arasında  $+p<0.05$  olmak üzere anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi.



**ŞEKİL 3:** Her dört gruptaki ratların hipokampus dokusunda GFAP molekülünün Western Blot yöntemi ile analizi görülmektedir.

lunan NCAM düzeyinin de daha düşük olduğu belirlendi.

GFAP esas olarak astrositlerden eksprese edilen bir intermediyer filamandır. Sıçanlarda yapılan çalışmalarda astrositik intermediyer filamanların reaktif gliozisde çok önemli bir rol oynadıkları belirlenmiştir.<sup>24</sup> SSS'de astrositlerin olgunlaşmasıyla, vimentin ve GFAP ekspresyonu arasında bir geçiş olmaktadır. GFAP bir astrosit olgunlaşma belirteci olarak kabul edilir ve astrositler olgunlaştıkça GFAP ekspresyonu artar.<sup>17</sup>

TH'nin nöronal proliferasyon ve farklılaşmaya etkileri primer olarak asositler üzerinden gerçekleşmektedir. Astrositlerin hücre göçü, matriks proteinleri, adhezyon molekülleri ve büyüme faktörleri üzerine olan etkileri, onların beyin gelişimi ve nöronal faaliyetlerin yerine getirilmesinde sahip olduğu önemli rolü açıklamaktadır.<sup>25</sup> TH büyü-



me faktörü sentez ve sekresyonuna etkisinin yanında hücre iskelet yapılanması üzerine olan etkisi aracılığıyla da astrosit proliferasyonunu, olgunlaşmasını ve farklılaşmasını düzenler.<sup>26,27</sup>

Sampson ve ark. maternal hipotiroidinin fetal beyin gelişimi üzerine olan etkisini araştırmışlardır.<sup>28</sup> Normal dişi sıçanlar ile parsiyel tiroidektomi yapılarak TH seviyesi %25'e kadar azaltılan hipotiroid dişi sıçanlar, erkek sıçanlar ile çiftleştirilmiştir. Sampson ve ark. gebeliğin on altıncı, on dokuzuncu ve yirmi birinci gününde fetüs beyinde GFAP düzeyine bakmışlar ve her iki grupta da gebeliğin on altıncı gününde GFAP tespit edilmezken, on dokuzuncu günde eşit düzeyde GFAP olduğunu tespit etmişlerdir.<sup>28</sup> Maternal hipotiroidi oluşturulan gruptaki sıçanların gebeliğin yirmi birinci gününde GFAP seviyelerinin normal gruptaki sıçanlara göre %44 daha az olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca gebeliğin on dokuzuncu ve yirmi birinci günleri arasında normal grupta GFAP seviyesinde beş kat, maternal hipotiroidi oluşturulan grupta ise üç kat artış olduğunu gözlemişlerdir.

Kısa bir süre önce yaptığımız çalışma ile gebeliğin onuncu, on beşinci günleri ve yeni doğan dönemlerinde oluşturulan deneysel hipotiroidinin fetal beyinde GFAP düzeylerine etkisi araştırılmıştır.<sup>29</sup> Araştırma sonucunda kontrol grubuna göre onuncu, on beşinci günler ve yeni doğan dönemlerinde GFAP seviyelerinde sırasıyla %38, %42 ve %78 oranında azalma olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada gebelik trimesterlerinde deneysel hipotiroidi oluşturulan sıçan yavrularının erişkin dönemde beyinlerinde GFAP seviyelerinde kontrol grubuna göre sırasıyla %5, %38 ve %45 oranında bir azalma olduğu saptanmıştır. Birinci trimester hipotiroidi grubuyla kontrol grubu arasında istatistiki olarak fark yoktu, buna karşın kontrol grubu ve birinci trimester hipotiroidi grubuyla ikinci ve üçüncü trimester hipotiroidi grupları arasında istatistiki olarak belirgin bir fark vardı. Yapılan çalışmalar<sup>28,29</sup> gebeliğin son döneminde deneysel hipotiroidinin beyinde GFAP düzeylerini daha çok azalttığını göstermektedir. Tarafımızdan yapılan çalışmada da birinci trimesterde etkilenmenin daha az olmasının sebebi, astrosit olgunlaş-

ma ve proliferasyonunun gebeliğin sonraki dönemlerinde daha fazla olması ve hipotiroid sürenin (7 gün) daha kısa olmasıyla açıklanabilir.

Li ve ark. doğum sonrası dönemde TH'lerin sıçan sinir sistemi gelişimine etkisini araştırmışlardır.<sup>30</sup> Doğum sonrası dönemde de sıçanlarda astrosit olgunlaşması devam etmektedir. Birinci gruba (n=4) gebeliğin on altıncı gününden başlayarak doğum sonrası yirmi birinci güne kadar PTU vermişlerdir. Diğer gruba (n=6) yine gebeliğin on altıncı gününden itibaren doğuma kadar PTU verilmiş, doğum sonrasında ise bu gruptaki sıçan yavrularına ciltaltı T4 tedavisi başlanmış ve doğum sonrası altıncı, onuncu, on ikinci, on beşinci ve yirmi birinci günlerde fetal beyinde GFAP düzeylerine bakılmıştır. T4 tedavisi uygulanmayan grubun serebellar GFAP düzeylerinde doğum sonrası altıncı ve onuncu günler arasında düşüş, onuncu günden onbeşinci güne kadar da artış tespit etmişlerdir. Diğer taraftan T4 tedavisi uygulanan grupta serebellumda GFAP'ın normal ötiroid sıçanlara benzer şekilde ekspresyonu devam etmiş ve postnatal altıncı ile on ikinci gün arasında %357.5'lik artıştan sonra azaldığı gözlenmiştir. Aktif astrosit proliferasyon dönemi olan doğum sonrası onuncu günde PTU uygulanan grupta T4 uygulanan gruba göre %64 gibi önemli oranda azalma tespit edilmiştir.

Doğum sonrası astrosit proliferasyonu devam ettiği için onuncu ve on beşinci günlerde GFAP seviyesi pik yapar ve daha sonra yirmi birinci güne kadar azalır.<sup>31,32</sup> Li ve ark. yaptıkları çalışmada T4 tedavisi başlanan grupta ötiroid sıçanlara benzer şekilde GFAP pikinin bulunduğunu tespit etmişlerdir.<sup>30</sup> Doğum sonrası PTU devam edilen grupta ise astrosit proliferasyonunun pik yaptığı günlerde GFAP seviyesinin önemli derecede azaldığını izlemişler ve PTU'nun astrosit proliferasyonu ve olgunlaşmasını geciktirdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada, sıçanlarda GFAP seviyelerine bakılan günlerde TH seviyelerine bakılmamış olup hipotiroidi ile GFAP seviyeleri arasında nasıl bir ilişki olduğu konusunda bir yorum yapılmamıştır. Biz de çalışmamızda Li ve ark.'nın yaptıkları çalışmaya benzer olarak PTU'nun astrosit olgunlaşma belirteci olan GFAP üzerine en fazla üçüncü trimesterde olumsuz etkisi olduğunu gözledik.

PTU'nun oluşturduğu maternal hipotiroidiye bağlı olarak fetal beyinde astrosit çoğalması, olgunlaşması ve farklılaşması bozulmaktadır. Maternal hipotiroidizmin SSS'de oluşturduğu ağır klinik tablo astrositlerin SSS gelişimi sürecinde ve organizasyonunda sahip olduğu önemli rol ile açıklanabilir. Gerçekten de çalışmamızda olgun astrositlerden eksprese edilen GFAP miktarı PTU ile maternal hipotiroidi oluşturulan ikinci ve üçüncü trimester hipotiroidi gruplarında daha belirgin olmak üzere her üç grupta da kontrol grubuna göre azalmıştı.

Hipokampusun önemli görevlerinden birisi, primer belleğin (kısa süreli bellek) sekonder belleğe (uzun süreli, sabit bellek) çevrilmesine neden olan yapılanmayı sağlamak ve bazı bilgileri kalıcı deponun yer aldığı uzun süreli belleğin depo alanlarına taşımaktır. Mekanizması tam olarak bilinmemesi de hipokampus olmadan uzun süreli belleğin pekiştirilmesi mümkün olmamaktadır. Ayrıca sağ hipokampus görsel, sol hipokampus ise sözel hafıza ile ilgili fonksiyonlarda daha fazla aktivite göstermekte ve bu bölgelerin lezyonlarında da ilgili hafızalardaki kayıp gelişmektedir.<sup>33,34</sup>

Öğrenme ve hafızanın oluşumunda temel mekanizma olan sinaptik plastisite oluşumuna NCAM moleküllerinin aracılık ettiği bilinmektedir.<sup>35</sup> NCAM molekülleri beyin gelişimi sırasında SSS'nin yapısal organizasyonlarına katkıda bulunduğu gibi, beyinde tahrip olmuş sinaptik modifikasyonların düzeltilmesine de yardımcı olmaktadır. NCAM'ın uzun dönem hafızanın oluşmasında önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. NCAM anti-korlarının intraventriküler enjeksiyonun sıçanlarda, enjeksiyondan 6-8 saat sonra öğrenme ve uzun dönem hafızaya zarar verdiği pasif sakınma cevabı testi ile gösterilmiştir.<sup>36</sup> NCAM'dan yoksun bırakılmış knock-out farelerde uzaysal öğrenme ve bulma yeteneğinin bozulduğu, Morris Water Maze testinde geri kalma olduğu tespit edilmiştir.<sup>37</sup> Tüm bu bulgular bize NCAM'ın beyin gelişimi ve sinaptik plastisitede önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir. Alveroz-Dolado ve ark. hipotiroidinin hücre adezyon moleküllerinin anormal ekspresyonuna neden olduğunu tespit etmişler ve bu durumun miyelinizasyonun belki de hücre migras-

yonunun bozulması veya gecikmesine sebep olabileceğini bildirmişlerdir.<sup>6</sup>

Bazı çalışmalarda TH'nin NCAM izoformları üzerine inhibitör etki oluşturduğunun gösterilmesine rağmen bizim çalışmamızda kontrol grubu ile kıyaslandığında her üç hipotiroidi grubunda da NCAM izoformlarının (NCAM120, NCAM140, NCAM180) azalmış olduğu görüldü.<sup>6,35</sup> Kontrol grubu ile birinci trimester hipotiroidi grubu arasında NCAM120 ve NCAM140 değerleri arasında istatistik olarak anlamlı fark yokken NCAM180 kontrol göre birinci trimester hipotiroidi grubunda belirgin olarak azalmıştı. İkinci ve üçüncü trimester (yeni doğan) hipotiroidi gruplarında her üç NCAM izoformu birinci trimester hipotiroidi grubuna göre azalmıştı. Yine üçüncü trimester hipotiroidi grubunda NCAM'ın her üç izoformunda ikinci trimester hipotiroidi grubuna göre istatistik olarak anlamlı bir azalma vardı. Üçüncü trimester hipotiroidi grubunda NCAM180 ölçülemeyecek kadar düşüktü. Değişik hipotiroidi dönemlerinin hepsinde NCAM izoformlarından NCAM180'deki azalma en belirgin olanıydı. Maternal hipotiroidizmin öğrenme yeteneği ve hafızada tutmayı (Morris Water Maze öğrenme testinde) genç bireylerde anlamlı derecede düşürdüğü gözlenmiştir. Bu azalma NCAM düzeylerindeki azalmaya paralel olarak ikinci ve üçüncü trimester hipotiroidi gruplarında birinci trimester hipotiroidi ve kontrol grubuna göre daha belirgindi. Belleğin pekiştirilmesini ölçen probe testinde kontrol grubu ve birinci trimester hipotiroidi grubuna göre ikinci ve üçüncü trimester hipotiroidi gruplarının platformun bulunduğu alandaki yüzme süreleri daha kısaydı.

Bir bütün olarak değerlendirdiğinde bu çalışmanın sonuçları; maternal TH yetersizliğinin astrosit proliferasyonu ve olgunlaşmasını önlediğini, öğrenme ve hafızayı pekiştirme fonksiyonlarında yetersizliğe neden olduğunu göstermektedir. Hem NCAM hem de GFAP seviyelerinde ikinci ve üçüncü trimester hipotiroidi gruplarında kontrol ve birinci trimester hipotiroidi gruplarına göre belirgin azalma tespit edildi. Maternal hipotiroidinin beyin gelişimi üzerine olan olumsuz etkileri birinci trimester hipotiroidi grubunda belirgin olarak daha az idi.

Sonuç olarak annedeki TH yetersizliğinin yavruların beyin gelişimini ciddi bir şekilde etkileyeceği açıktır. Bu etkilenmenin birinci trimesterde en az olması nedeniyle gebeliği kesinleşen

veya gebelik düşünen annelerin, TH yetersizliği yönünden gebelik öncesi veya en azından birinci trimester bitmeden değerlendirilmesi uygun olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Porterfield SP, Hendrich CE. The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development-current perspectives. *Endocr Rev* 1993;14(1):94-106.
- Dussault JH, Ruel J. Thyroid hormones and brain development. *Annu Rev Physiol* 1987;49:321-34.
- Oppenheimer JH, Schwartz HL. Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. *Endocr Rev* 1997;18(4):462-75.
- Chan S, Kilby MD. Thyroid hormone and central nervous system development. *J Endocrinol* 2000;165(1):1-8.
- DeLong G. The effect of iodine deficiency on neuromuscular development. *IDD Newsl* 1990;6(1):1-9.
- Alvarez-Dolado M, Cuadrado A, Navarro-Yu-berro C, Sonderegger P, Furlley AJ, Bernal J, et al. Regulation of the L1 cell adhesion molecule by thyroid hormone in the developing brain. *Mol Cell Neurosci* 2000;16(4):499-514.
- Legrand J. Effects of thyroid hormones on central nervous system. In: Yanai J, ed. *Neurobehavioral Teratology*. 1<sup>st</sup> ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1984. p.331-63.
- Bernal J, Guadano-Ferraz A. Thyroid hormone and the development of the brain. *Curr Opin Endocrinol* 1998;5(4):296-302.
- Iglesias T, Caubín J, Stunnenberg HG, Zaballos A, Bernal J, Muñoz A. Thyroid hormone-dependent transcriptional repression of neural cell adhesion molecule during brain maturation. *EMBO J* 1996;15(16):4307-16.
- Alvarez-Dolado M, González-Sancho JM, Bernal J, Muñoz A. Developmental expression of the tenascin-C is altered by hypothyroidism in the rat brain. *Neuroscience* 1998;84(1):309-22.
- Alvarez-Dolado M, Ruiz M, Del Río JA, Alcántara S, Burgaya F, Sheldon M, et al. Thyroid hormone regulates reelin and dab1 expression during brain development. *J Neurosci* 1999;19(16):6979-93.
- Bastmeyer M, Schlosshauer B, Stuermer CA. The spatiotemporal distribution of N-CAM in the retinotectal pathway of adult goldfish detected by the monoclonal antibody D3. *Development* 1990;108(2):299-311.
- Bernhardt RR, Tongiorgi E, Anzini P, Schachner M. Increased expression of specific recognition molecules by retinal ganglion cells and by optic pathway glia accompanies the successful regeneration of retinal axons in adult zebrafish. *J Comp Neurol* 1996;376(2):253-64.
- Le Gal La Salle G, Rougon G, Valin A. The embryonic form of neural cell surface molecule (E-NCAM) in the rat hippocampus and its reexpression on glial cells following kainic acid-induced status epilepticus. *J Neurosci* 1992;12(3):872-82.
- McCall MA, Gregg RG, Behringer RR, Brenner M, Delaney CL, Galbreath EJ, et al. Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(13):6361-6.
- Dahl D. The vimentin-GFA protein transition in rat neuroglia cytoskeleton occurs at the time of myelination. *J Neurosci Res* 1981;6(6):741-8.
- Gomes FC, Paulin D, Moura Neto V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res* 1999;32(5):619-31.
- Gould E, Woolley CS, McEwen BS. The hippocampal formation: morphological changes induced by thyroid, gonadal and adrenal hormones. *Psychoneuroendocrinology* 1991;16(1-3):67-84.
- Madeira MD, Sousa N, Lima-Andrade MT, Calheiros F, Cadete-Leite A, Paula-Barbosa MM. Selective vulnerability of the hippocampal pyramidal neurons to hypothyroidism in male and female rats. *J Comp Neurol* 1992;322(4):501-18.
- Linnemann D, Skarsfelt T. Regional changes in expression of NCAM, GFAP, and S100 in aging rat brain. *Neurobiol Aging* 1994;15(5):651-5.
- Emerson CH. Thyroid disease during and after pregnancy. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. *The Thyroid*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Raven; 1996. p.1021-31.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982;297(5868):681-3.
- Baydas G, Nedzvetsky VS, Nerush PA, Kirichenko SV, Demchenko HM, Reiter RJ. A novel role for melatonin: regulation of the expression of cell adhesion molecules in the rat hippocampus and cortex. *Neurosci Lett* 2002;326(2):109-12.
- Gomi H, Yokoyama T, Fujimoto K, Ikeda T, Katoh A, Itoh T, et al. Mice devoid of the glial fibrillary acidic protein develop normally and are susceptible to scrapie prions. *Neuron* 1995;14(1):29-41.
- Morte B, Manzano J, Scanlan TS, Vennström B, Bernal J. Aberrant maturation of astrocytes in thyroid hormone receptor alpha 1 knockout mice reveals an interplay between thyroid hormone receptor isoforms. *Endocrinology* 2004;145(3):1386-91.
- Gavaret JM, Toru-Delbaffle D, Baghdassarian-Chalaye D, Pomerance M, Pierre M. Thyroid hormone action: induction of morphological changes and protein secretion in astroglial cell cultures. *Brain Res Dev Brain Res* 1991;58(1):43-9.
- Aizenman Y, de Vellis J. Synergistic action of thyroid hormone, insulin and hydrocortisone on astrocyte differentiation. *Brain Res* 1987;414(2):301-8.
- Sampson D, Pickard MR, Sinha AK, Evans IM, Leonard AJ, Ekins RP. Maternal thyroid status regulates the expression of neuronal and astrocytic cytoskeletal proteins in the fetal brain. *J Endocrinol* 2000;167(3):439-45.
- Dönder E, Özkan Y, Gençer V, Baydaş G. [The Effect of Experimentally Induced Maternal Hypothyroidism on GFAP and S100B Protein Expression in Fetal Brain Tissue at 10, 15th Gestational Days and Newborn Period]. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2010;30(2): 462-8.
- Li GH, Post J, Koibuchi N, Sajdel-Sulkowska EM. Impact of thyroid hormone deficiency on the developing CNS: cerebellar glial and neuronal protein expression in rat neonates exposed to antithyroid drug propylthiouracil. *Cerebellum* 2004;3(2):100-6.
- Linnemann D, Edvardsen K, Bock E. Developmental study of the cell adhesion molecule L1. *Dev Neurosci* 1988;10(1):34-42.



32. Rathjen FG, Schachner M. Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *EMBO J* 1984;3(1):1-10.
33. Fonksiyonel anatomi. Taner D, editör. [Functional Neuroanatomy]. 1. Baskı. Ankara: ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim AŞ-Metu Press-Yayınları; 1998;231-2.
34. Songur A, Özen OA, Sarsılmaz M. [Hippocampus]. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2001;21(5):427-31.
35. Fields RD, Itoh K. Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 1996;19(11):473-80.
36. Doyle E, Nolan PM, Bell R, Regan CM. Intraventricular infusions of anti-neural cell adhesion molecules in a discrete posttraining period impair consolidation of a passive avoidance response in the rat. *J Neurochem* 1992;59(4):1570-3.
37. Cremer H, Lange R, Christoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, et al. Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 1994;367(6462):455-9.